

TP DE MICROBIOLOGIE – 2^{ème} ANNEE de l'ISARA-LYON

Le programme se compose 4 TP pour les objectifs suivants :

- Acquérir l'expérience du travail aseptique, différents type de milieux et des techniques de dénombrement des bactéries
- Identifier les bactéries par l'étude des caractères phénotypiques :
 - Morphologiques : observation microscopique et macroscopique
 - Type respiratoire ou fermentaire
 - Biochimiques : Métabolisme du carbone, de l'azote et des lipides
 - Technique de la galerie d'API

TP 1 : Initiale de microbiologie

1. Présentation du laboratoire de microbiologie et consignes de travail
2. Techniques d'ensemencement
3. Technique de coloration de Gram
4. Observation microscopique et macroscopique, Gram
5. Facteurs de croissances l'O₂ et (pH, T°, pression osmotique, désinfectants) (une condition/binôme)

TP 2 : Métabolisme énergétique

6. Mise en évidence du type de respiratoire
7. Recherche des enzymes respiratoires (oxydase, catalase et nitrate réductase)
8. Métabolisme de carbon
 - 8.1. Test fermentaire ou Oxydatif (3 bactéries dont Staphylococcus)
 - 8.1.1. Fermentation les différents sucres : Maltose (avec la cloche) et lactose sur le milieu Kligler
 - 8.2. Fermentation mixte
 - 8.3. Utilisation une source de carbone autre que glucide

TP 3 : Métabolisme de protéines et de lipides

9. Métabolisme de protéines :
 - 9.1. Test de protéolyse (gélatine et caséines)
 - 9.2. Dégradation des acides aminés
 - 9.3. Dégradation du tryptophane et de l'urée
10. Métabolisme de lipides :
 - 10.1. recherche l'enzyme : estérase (Sierra),
 - 10.2. recherche l'enzyme : lipase (tributyryne)
 - 10.3. recherche l'enzyme lécithinase/lipase (Baird Parker)

TP 4 : Synthèse de plusieurs testes par la galerie

11. Identification les bactéries par la galerie d'API et les tests de confirmation (recherche l'enzyme de coagulasse libre et liée, l'ADNase et l'antibiogramme)

TP1 : Initiale de microbiologie

TP n°1 : 1^{ère} séance

1. PRÉSENTATION DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE ET CONSIGNES DE TRAVAIL

♦ GROS MATERIEL

Autoclave

120°C pendant 20 mn – pression 1 Bar – chaleur humide : pour milieux de culture.

Four Pasteur ou étuve universelle :

180°C – 30 mn – chaleur sèche : pour instruments et verrerie vide.

Etuves bactériologiques

Thermostatées : température ambiante à 70°C.

Précision : $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$,

Elles ne peuvent servir qu'à l'incubation

Bain-marie d'eau thermostatée :

En général à 37°C, il peut être utilisé pour incuber pendant une courte durée et mettre en évidence un caractère biochimique.

Jarres à anaérobiose pour les bactéries anaérobies strictes

Récipients cylindriques transparents avec couvercle étanche pouvant contenir tubes et boîtes de Pétri

L'atmosphère est privé d'oxygène grâce à des comprimés générateurs de H_2 et CO , il y a alors formation de vapeur d'eau. Un indicateur d'anaérobiose permet de contrôler l'atmosphère. Ces récipients sont ensuite mis à incuber dans une des étuves précédentes.

© MATERIEL SPECIFIQUE POUR LA CULTURE

Récipients :

Boîtes de Pétri en polystyrène stérile à usage unique.

Diamètres 5 mm, 9 mm, 10 mm ou 12 mm ; pour milieux de culture solides (10 à 20 ml).

Tubes en verre Pyrex à bouchon de bakélite vissé ou à capuchon, stérilisables.

Diamètre 16 mm, 18 mm ; 20 mm ou 22 mm.

- pour liquides : { milieu de dilution (9 ml)
 { milieu de culture (10 à 20 ml)
- pour milieux de culture solides : 10 à 20 ml
 - { en culot
 - { en culot + tranche

Ensemenceurs :

1. Pipettes graduées stériles en polystyrène à usage unique sous emballage individuel : pour prélever des volumes précis de liquide et faire des *dénombrements de germes* : 1 ml, 2 ml ; 5 ml, 10 ml.
2. Pipettes Pasteur en verre à extrémité effilée et boutonnée, pour *repiquage* à partir d'un milieu liquide (prélèvement de petite quantité mais sans précision de volume).
3. Ensemenceur Pasteur : composé d'un manche, d'un mandrin et d'un fil métallique en Nickel/Chrome amovible dont l'extrémité peut être :
 - droite : fil droit pour ensemencement par piqûre
 - bouclée : anse ou œse pour repiquage
 - triangulaire : étaloir pour étaler un dépôt de liquide à la surface d'un milieu en boîte de Pétri.

♦ MATERIEL D'OBSERVATION

Loupe binoculaire :

Elle permet d'observer des objets ou des cultures avec un grossissement x10. L'éclairage peut se faire par dessus ou par dessous l'objet.

Un appareil photo polaroïd (Microcam.) peut s'adapter sur l'oculaire.

Microscope :

Il permet d'observer des préparations microscopiques à l'état frais (entre lame et lamelle) ou des colorations de frottis fixé sur lame.

Il possède : - 2 oculaires de grossissement x10

et 4 objectifs de grossissements x 4 x 10 x 60 et x 100.

L'objectif x 100 doit être utilisé avec de l'huile à immersion (1 goutte entre lame et objectif).

Le grossissement total est égal au produit \times oculaire \times objectif .

Un appareil photo polaroïd (Microcam) peut s'adapter sur l'oculaire.

Compteurs de colonies :

Ils permettent le comptage des colonies en boîtes de Pétri.

2 types de compteurs :

♦ *compteur semi-automatique* : avec éclairage par dessous, loupe grossissante et crayon électronique. Le nombre de colonies s'affiche automatiquement à l'écran après chaque pression du crayon.

♦ **Compteur automatique** : Une caméra vidéo analyse l'image de la boîte de Pétri et affiche à l'écran le nombre de colonies visionnées.

♦ PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Définition : Milieux liquides ou solides renfermant l'eau et les éléments nutritifs nécessaires à la croissance et à la multiplication des germes.

Composition :

Tous les milieux renferment les substances de base :

- eau
- source d'N et de C organique
- ions minéraux

Les milieux solides sont obtenus par ajout de 10 à 15 g d'agar (polysaccharide extrait d'algues). Ces milieux sont dits « gélosés ».

Certains milieux renferment en plus d'autres substances :

- soit parce que les germes recherchés sont plus exigeants,
- soit parce qu'on veut mettre en évidence un *caractère biochimique* particulier,
- soit parce qu'on désire rendre le *milieu sélectif* pour un seul type de germe.

1. Source particulière de carbone organique : glucides, acides organiques (germes exigeants ou mise en évidence d'un caractère biochimique).

2. Indicateur de pH : pour mettre en évidence l'acidification ou l'alcalinisation du milieu dû à un métabolisme fermentaire (1^{er} cas) ou à une réaction de désamination (2^{ème} cas).

3. Des substances inhibitrices : pour rendre le milieu sélectif. Ces substances inhibent le développement de la plupart des germes, sauf celui que l'on veut favoriser.

Commercialisation des milieux de culture :

- la plupart des milieux sont conditionnés en tubes, boîtes de Pétri ou flacons prêts à l'emploi mais ils existent également sous forme déshydratée.
- dans le cas de milieux déshydratés, il faut peser le milieu sec et rajouter le volume d'eau nécessaire.

Pour les milieux gélosés, il faut porter à ébullition pour dissoudre l'agar. La solution homogène est ensuite répartie en tubes ou en flacons bouchés.

- Ces milieux liquides ou gélosés sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120°C sous une pression de 1 Bar pendant 20 mm. La durée de conservation dépend de la température et de la composition du milieu.

POSTE DE TRAVAIL DU MICROBIOLOGISTE

© CONDITIONS DE TRAVAIL ASEPTIQUE

Avant manipulation :

- ◆ L'opérateur doit désinfecter le plan de travail (eau de Javel ou alcool), il doit porter une blouse propre, se laver soigneusement les mains puis les désinfecter (alcool ou mercryl laurylé).
- ◆ Tout le matériel nécessaire doit être à proximité de l'opérateur dans un arc de cercle entourant le bec Bunsen. Il est préférable de marquer ou étiqueter les tubes et boîtes avant manipulation.
- ◆ Les milieux à ensemercer étant stériles, il faudra travailler aseptiquement pour éviter toute contamination.

Pendant les manipulations :

- ◆ Le bactériologiste travaille assis, le bec bunsen allumé créant un cylindre d'air stérile (il existe des hottes à flux laminaire qui permettent de filtrer l'air en continu et le rendre stérile).
- ◆ les récipients sont ouverts à proximité de la flamme :
 - ✓ l'orifice des *tubes* est flambé avant ensemencement, le bouchon étant maintenu par le petit doigt de la main qui tient l'ensemenceur .
 - ✓ les *boîtes de Pétri* sont ouvertes près de la flamme le temps de couler le milieu ou de faire l'ensemencement en surface.
- ◆ Les ensemenceurs doivent être stériles :
 - ✓ le fil métallique des ensemenceurs est chauffé au rouge dans la flamme plusieurs dizaines de secondes et la tige supérieure est flambée pour détruire les germes ambiants. Le fil est ensuite refroidi non loin de la flamme avant le prélèvement.
 - ✓ les pipettes graduées sont débarrassées de leur emballage stérile et utilisées telles quelles (sans passage dans la flamme).
 - ✓ les pipettes Pasteur sont flambées rapidement avant ouverture. On casse l'extrémité boutonnée avec une pince métallique flambée.

Après manipulation :

- les orifices des tubes sont flambés avant bouchage,
- les boîtes de Pétri sont refermées près de la flamme ;
- les ensemenceurs métalliques sont chauffés au rouge pour détruire les germes restants,
- les pipettes à usage unique sont désinfectées dans un récipient haut renfermant de l'eau de Javel, pendant plusieurs heures avant élimination.
- Les milieux étant mis à incuber à l'étuve, la paillasse est débarrassée, puis désinfectée à nouveau par flambage.
- Lorsque les analyses sont terminées, tous les récipients renfermant des micro-organismes (tubes, boîtes, flacons, etc...) doivent être stérilisés à l'autoclave avant d'être vidés, lavés ou jetés.

© LES CONSIGNES DE SECURITE

La manipulation des souches bactérienne et le dénombrement des micro-organismes divers, présente des risques pour le manipulateur et son entourage, ainsi que des risques pour l'environnement en cas de dissémination.

Un bonne prévention de ces risques repose sur :

1. la formation et l'information des manipulateurs,
2. la connaissance des risques,
3. le respect des bonnes pratiques de laboratoire des consignes de sécurité et particulièrement au niveau de la protection individuelle (port de blouse, gant...)

1 – La formation et l'information des manipulateurs :

Les manipulateurs sont formés pour obtenir de bonnes bases en microbiologie et manipuler avec les bonnes règles de sécurité.

2 - Connaissances des risques :

On se trouve en présence de microorganismes présentant un risque modéré pour le manipulateur, limité et faible pour la communauté.

3 – Le respect des bonnes pratiques de laboratoire, des consignes de sécurité :

Les bonnes pratiques de laboratoire doivent être connues de tous et les consignes générales affichées dans la salle de T.P.

MESURES PREVENTIVES POUR EVITER LES CONTAMINATIONS

1 – Tenue vestimentaire :

- habits de ville laissés sur les portes manteaux (sas ou vestiaire),
- port de la blouse (obligatoirement fermée et propre)
- port de la charlotte,
- ongles coupés,
- cheveux attachés,
- bijoux enlevés.

2 – Hygiène des mains avant et après manipulation :

- lavage des mains avec du savon liquide antiseptique,
- essuyage des mains avec du papier usage unique.

3 – Nettoyage des paillasses avant et après manipulation :

- nettoyage des paillasses à l'aide de papier imprégné de javel (pissette jaune), jeter le papier dans les corbeilles prévues sous les paillasses et sécher avec du papier.

4 – Désinfection en cas de contamination :

- en cas de casse ou de projection de culture bactérienne, prévenir le responsable du laboratoire qui procédera à la désinfection (voir procédure : « personnel du laboratoire).

Il est important de surveiller les opérations de nettoyage et de désinfection pour prévenir les risques pour les manipulateurs

LES INTERDITS PENDANT LA MANIPULATION

Interdiction :

- **de toucher les objets personnels** pendant les manipulations
- **de porter ses mains à la bouche**
- **de manger, boire, fumer, se maquiller, de stocker des aliments et des boissons**
- **de pipeter à la bouche** (utilisation de pipette automatique)
- **d'ouvrir les fenêtres** (courants d'air)
- **de jeter les cultures bactériennes** dans les éviers et la poubelles.
 - ♦ Le *matériel usage unique* (pipette plastique, pipette pasteur), ayant contenu une culture microbienne sera jeté dans un bocal ou bécher rempli d'eau de javel
 - ♦ Les *boîtes de Pétri de culture microbienne* non utilisées après manipulations sont jetées dans des sacs d'autoclave marqués du sigle international du risque biologique. Ceux-ci sont placés à chaque extrémité de pailleasse pour éviter les déplacements.
 - ♦ Les *pipettes* placées dans le bécher rempli d'eau de javel doivent être enlevées avant la séance. Ces pipettes ont été placées 24 H dans l'eau de javel donc les germes sont détruits.
- **de mettre des papiers dans les bécchers d'eau de javel.**

TP n°1 : 1^{ère} séance

2. TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

Définitions :

L'isolement permet l'obtention de colonies à la surface d'un milieu solide par ensemencement à partir d'un produit alimentaire ou d'un prélèvement biologique ou par repiquage à partir d'un milieu de culture solide ou d'un milieu liquide d'enrichissement.

Le milieu d'isolement peut être non sélectif (flore totale) ou sélectif.(flore particulière)

Le repiquage peut se faire à partir d'une colonie prélevée sur milieu solide et ensemencement sur milieu solide ou sur milieu liquide pour obtenir une **culture pure**. Une culture pure ne renferme qu'une seule espèce bactérienne (**souche**)

Ces techniques sont appliquées pour ensemer pour l'**observation microscopique et coloration de Gram (partie 3 et 4)**

3 souches bactériennes en cultures pures sur boîte de **gélose nutritive (GN)**

- *Staphylococcus epidermidis* : **SE**
- *Bacillus subtilis* : **BS**
- *Escherichia coli* : **EC**

On prélève aseptiquement un fragment de colonie avec l'**öese ou anse Pasteur** et on enseme un milieu neuf. :

1) en milieu liquide en tube: l'öese chargée de germes est agitée dans le **bouillon nutritif BN** de façon à les remettre en suspension. Après incubation à 37°C à l'étuve leur développement se traduit par l'apparition d'un trouble plus ou moins important.

2) sur milieu solide :

Préparer des boîtes : le milieu GN en surfusion est coulé en boîte de Pétri (environ 15 ml) , après refroidissement et solidification à plat la boîte est retournée et ouverte dans l'étuve pour sécher la surface du milieu (quelques minutes)

On pratique un isolement à partir de colonies isolée sur un milieu solide, plusieurs méthodes sont utilisées, dont celle des cadrans : une pipette Pasteur boutonnée est déchargée progressivement de ses germes par application à la surface du milieu selon un mouvement en « zig zag ». Le dépôt est très important au départ, mais à la fin, il n'y aura plus que quelques bactéries qui donneront des colonies bien isolées.

Les boîtes sont incubées dans l'étuve à 37°C (à l'envers couvercle en bas pour éviter la condensation sur le milieu)

TP n°1 : 1^{ère} séance

5. FACTEURS DE CROISSANCE (SÉANCE D'ENSEMENCEMENT)

1- Influence de la température sur E. coli

Ensemencer une goutte de suspension d'E. coli sur quatre tubes de bouillon nutritif.

Incuber à quatre températures différentes :

- 1 tube à 5°C (réfrigérateur),
- 1 tube à 20°C (laboratoire),
- 1 tube à 37°C (étuve),
- 1 tube à 55°C (étuve).

Après 48 heures, observer l'importance du trouble s'il y a eu développement, ou noter l'absence de développement.

2- Influence du pH sur E.coli

Ensemencer une goutte de suspension d'E. coli sur cinq tubes de bouillon nutritif de pH variable, pH2,6, pH3,6, pH6,8, pH8,6, pH10.

Incuber tous les tubes à 37°C pendant 48 heures.

Observer l'importance du trouble ou l'absence de développement.

3- Influence de la pression osmotique sur E. coli

Ensemencer une goutte de suspension d' E. coli sur trois tubes de bouillon nutritif de concentration croissante en chlorure de sodium (le témoin sera un tube de bouillon nutritif incubé à 37° C renfermant 0,5 % de Nacl).

- Bouillon 5 (0,5 % + 5 % Na cl)
- Bouillon 10 (0,5 % + 10 % Na cl)
- Bouillon 20 (0,5 % + 20 % Na cl)

Incuber à 37°C pendant 48 heures.

Observer l'importance du trouble ou l'absence de développement.

4- Influence de l'oxygène Sur Pseudomonas, E. coli, Clostridium.

Ensemencer en stries à l'anse Pasteur chaque souche sur deux boîtes de Pétri (gélose nutritive pour E. coli et Pseudomonas, gélose viande Foie solide pour Clostridium).

Incuber une boîte de chaque souche à 37°C en aérobiose et les trois autres boîtes à 37°C dans une jarre à anaérobiose après avoir mis une double couche de milieu.

Comparer le développement de chaque souche dans les deux conditions d'aération (aérobiose et anaérobiose)

3. TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

Principe :

La coloration de GRAM est la coloration de base de la bactériologie. C'est une coloration double qui permet de différencier les bactéries, non seulement d'après leur forme mais également d'après leur affinité pour les colorants. Ce procédé de coloration différentielle divise les bactéries en deux classes : **GRAM - ou GRAM +**

Matériel :

- lames pour microscope
- bec bunsen
- oese
- microscope avec objectif à immersion et huile
- colorants pour GRAM
- support pour lame

Technique :

- Effectuer un **frottis** sur lame à partir de cultures de 18 à 24 heures. A l'aide d'une anse ou d'une pipette Pasteur, faire un dépôt en évitant de trop étaler sur toute la lame. Laisser sécher pour que le frottis adhère à la lame.
- **Fixer** le frottis à l'aide de quelques gouttes d'alcool, flamber et laisser refroidir.
- Couvrir de colorant (**cristal violet** pour Gram) le frottis fixé et laisser en contact pendant **1 minute**.
- **Laver** à l'eau.
- Recouvrir la lame de mordant (**lugol** pour Gram) et laisser en contact pendant **1 minute**.
- **Laver** à l'eau.
- **Décolorer** à l'aide **d'alcool/acétone** ou avec le décolorant pour Gram jusqu'à ce que le solvant n'entraîne plus de colorant (**30-60 secondes**, solvant incolore).
- **Laver** à l'eau
- **Couvrir** la lame de colorant de contraste (**safranine** pour Gram ou **fuschine** basique) et laisser agir pendant 30-60 secondes.
- **Laver** à l'eau
- **Sécher** à l'air.
- **Observer à l'objectif 100** en mettant une goutte d'huile à immersion (entre lame et objectif, monter le condensateur, ouvrir le diaphragme).

Résultats : Observer la forme l'arrangement et le gram

- Coloration **violette** : gram +
- Coloration **rose** : gram -

TP n°1 : 2^{ème} séance

4. OBSERVATIONS MICROSCOPIQUE ET MACROSCOPIQUE DES CULTURES EN MILIEU LIQUIDE ET SOLIDE

Groupe :

Noms :

Caractères macroscopiques et microscopiques des 3 souches :

Souche	Aspect des colonies sur milieu solide en boîte de Pétri GN	Aspect du développement en milieu liquide BN	Coloration de gram	Examen microscopique Forme et arrangement des bactéries
Staphylococcus epidermidis				
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>Escherichia coli</i>				

5. FACTEURS DE CROISSANCES

1- Influence de la température

Température d'incubation	5°C	20°C	37°C	55°C
Développement d'E. coli				

Conclusion :

2- Influence du pH

Influence du pH	2,6	3,6	6,8	8,6	10
Développement d'E. coli					

Conclusion :

3- Influence de la pression osmotique

Pression osmotique	Témoin BN	BN +5 % de NaCl	BN +10 % de NaCl	BN +20 % de NaCl
Développement d'E. coli				

Conclusion :

4- Influence de l'O₂

Développement de colonies	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Clostridium</i>
En aérobiose			
En anaérobiose			

Conclusion :

TP n°2 : Métabolisme énergétique et de carbone

TP n°2 : 1^{ère} séance

6- MISE EN ÉVIDENCE DU TYPE RESPIRATOIRE : affinité vis-à-vis de l'oxygène.

Trois souches seront testées à partir de cultures sur bouillon : *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*.

Composition du milieu de culture : la gélose viande levure à 6 g de gélose par litre (VL 6 ‰) est un milieu semi solide, renfermant 5 g/l de glucose comme source d'énergie, de la peptone, de l'extrait de levure et de l'extrait de viande comme source de facteurs de croissance. Il ne renferme ni nitrate, ni nitrite, ni sulfite, ni thiosulfate.

Régénération des milieux : Porter les trois milieux à 100°C pendant 30 mn pour chasser l'O₂ dissout (Créer un gradient de rH). Refroidir à 48°C (température de surfusion).

Ensemencement du milieu :

- Stériliser l'effilure d'une pipette Pasteur boutonnée par passage dans la flamme
- Refroidir quelques secondes à côté de la flamme
- Tremper dans le bouillon de culture et ensemer le milieu VL en surfusion de bas en haut selon un mouvement de vrille.

Refroidir le milieu sous l'eau froide pour le solidifier.

Incubation : Dévisser légèrement les bouchons pour laisser les milieux en aérobiose en surface pendant l'incubation à l'étuve à 37°C pendant 48 heures.

Noter la zone de développement des colonies et en déduire le type respiratoire.

7- RECHERCHE DES ENZYMES RESPIRATOIRES (OXYDASE, CATALASE ET NITRATE RÉDUCTASE)

Trois souches seront testées à partir de cultures sur bouillon : *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*

➤ *Préparation pour la recherche de l'oxydase et de la catalase*

- Couler trois boîtes de gélose nutritive et laisser solidifier.
- Ensemencer en stries serrées à l'anse Pasteur une boîte de gélose nutritive avec chaque souche à tester (méthode des cadrans).
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.

➤ *Préparation pour la recherche de la nitrate réductase*

- Ensemencer une goutte de chaque suspension bactérienne sur bouillon nutritif nitraté (1 g/l de KNO₃).
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.

8. MÉTABOLISME DU CARBONE

8.1. Test Oxydative ou Fermentaire vis à vis du glucose

Quatre souches seront testées : **E.Coli, Staphylococcus, Bacillus, Pseudomonas** (culture liquide).

1 – Milieux d'étude

- Milieu de Hugh et Leifson (milieu semi solide renfermant du glucose et un indicateur de pH) et milieu MEVAG staphylocoque.
 - * Faire fondre et régénérer 6 tubes de milieu de Hugh et Leifson au bain marie, à 100°C pendant 20 mn pour enlever l'oxygène dissout.
 - * Refroidir les milieux à 50°C (surfusion).
 - * Ajouter dans chaque tube de milieu 7 gouttes de solution stérile de glucose à 30 % pour avoir une concentration finale de 1 % (10g/l).
 - * Homogénéiser sans incorporer d'air.
- Dans le milieu \Rightarrow Mevag pour staphylocoque : ne rien ajouter ; le glucose est déjà dans le milieu.
 - * Solidifier sous l'eau. Les milieux sont prêts à ensemenecer.

2 – Ensemencement

- * Avec chaque souche à tester, ensemenecer 2 tubes de milieu par piqûre centrale au fil droit.
- * Couvrir l'un des milieux avec 1 cm d'huile de paraffine stérile (tube en anaérobiose).

3 – Incubation à 37°C pendant 48 heures.

Laisser les bouchons dévissés pour permettre l'arrivée d'O₂ dans le tube sans paraffine (tube en aérobiose).

4 – Lecture (*voir fiche technique - 2 ème séance*)

Le virage de l'indicateur du vert ou violet au jaune traduit l'acidification du milieu donc l'utilisation du glucose.

Selon la zone de virage dans le tube en aérobiose (surface ou profondeur), on visualise le type métabolique, le résultat étant confirmé par le tube en anaérobiose.

8.2. Fermentation les différents sucres : Maltose et Lactose

a) Maltose :

Milieu liquide : eau peptonée au rouge de phénol avec cloche

Deux souches et deux sucres seront testés : **E.coli et Proteus vulgaris, Fructose et maltose** (culture liquide).

* Milieux : quatre tubes de milieu de base liquide renfermant un indicateur de pH et une cloche renversée.

Ajouter à deux tubes d'eau peptonée, 1 ml de solution stérile de fructose à 10 % et à deux autres tubes 1 ml de maltose à 10% pour que la concentration finale en sucre soit de 1 % (10g/l).

Homogénéiser et vérifier que la cloche ne renferme pas de bulle d'air.

* Ensemencement : déposer avec une pipette Pasteur une goutte de suspension d'E.coli ou de Proteus vulgaris sur chaque milieu sucré. Agiter.

* Incubation : à 37°C pendant 48 heures.

* Lecture : le virage au jaune de l'indicateur et le gaz dans la cloche traduit la fermentation du sucre avec production de gaz.

b) Lactose :

Deux souches seront testées sur milieu de Kligler : **E.coli et Proteus vulgaris** (culture liquide)

1 – Milieu : deux tubes de milieu de Kligler, solide en tube incliné (culot + tranche) renfermant du glucose, du lactose et un indicateur de pH.

2 – Ensemencement : ensemencer chaque souche dans le culot par piqûre centrale au fil droit et sur la tranche en stries serrées avec l'anse Pasteur.

3 – Incubation : à 37°C pendant 48 heures bouchon dévissé

4 – Lecture (*voir fiche technique*)

La β galactosidase est un endoenzyme qui hydrolyse le lactose en galactose + glucose. Elle est fabriquée par certaines bactéries en présence de lactose.

Le réactif est l'orthonitrophényl galactoside (ONPG) qui est hydrolysé par la β galactosidase en orthonitrophénol jaune.

Remarque : sur le même milieu, on lit directement la fermentation du glucose (culot jaune) et l'utilisation du lactose (tranche jaune).

8.3. Mise en évidence de la fermentation mixte

Teste la dégradation le glucose par les entérobactéries

Il y a deux voies possibles mises en évidence sur le milieu de CLARK et LUBS : la voie acide mixte et la voie butylène glycolique.

On testera deux souches **E.coli et Entérobacter** (culture liquide)

- 1 – Milieu : deux tubes de milieu liquide de CLARK et LUBS renfermant du glucose.
- 2 – Ensemencement : ensemercer chaque milieu avec une goutte de suspension bactérienne à tester (E.coli et Entérobacter).
- 3 – Incubation à 37°C pendant 48 heures.
- 4 – Lecture (*voir fiche technique*)
Après incubation, on met en évidence la voie acide mixte par la réaction au rouge de méthyle (RM) et la voie butylène glycolique par la réaction de Vosges Proskauer (VP).

Les entérobactéries se classent en deux catégories :
 - * RM + VP- (**Voie acide mixte**),
 - * RM - VP+ (**Voie butyléneglycolique**).

8.4 Mise en évidence de l'utilisation une source de carbone autre que glucide.

Utilisation du citrate de sodium.

On testera deux souches : **E.coli** et **Salmonella** (culture en milieu solide).

- 1 – Milieu : deux tubes de milieu de Simmons (milieu solide incliné) contenant du citrate de sodium comme seule source de carbone et un indicateur de pH.
- 2 – Ensemencement : ensemercer chaque milieu à l'obèse avec une seule strie longitudinale sur la tranche à partir d'une colonie prélevée sur un milieu solide.
- 3 – Incubation à 37°C pendant 48 heures bouchon dévissé
- 4 – Lecture (*voir fiche technique*)
L'utilisation de citrate se traduit par un développement et par le virage au bleu de la tranche.

TP N° 2 - 2^{ème} séance : Lecture

NOM/Prénom :

Groupe :

6 - - MISE EN ÉVIDENCE DU TYPE RESPIRATOIRE

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Zone de développement			
Type respiratoire			

7 – RECHERCHE DES ENZYMES RESPIRATOIRES (après incubation)

a) Recherche de l'oxydase : présence du cytochrome C

Sur une plaque contenant quatre supports imprégnés de réactif oxalate de N diméthyl paraphénylène diamine, déposer et étaler à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, un fragment de colonie.

Coloration violet foncé : Oxydase +

Pas de coloration ou coloration rose ou mauve : Oxydase -

(Ne pas utiliser l'anse Pasteur)

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après dépôt d'une colonie sur la plaque			
Résultat de l'oxydase			

b) Recherche de la catalase

Catalase : Déposer une goutte d'H₂O₂ à 10 volumes sur une colonie.

Dégagement de gaz : Catalase +

Pas de bulles de gaz : Catalase -

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
Observation après dépôt d'une goutte d'H ₂ O ₂ sur une colonie			
Résultat de la catalase			

c) Recherche de la nitrate réductase :

- Ajouter dans le milieu une goutte de réactif 1 et une goutte de réactif 2.

Ces deux réactifs constituent le réactif de Griess.

1 : Acide parasulfanylique en milieu acétique.

2 : α naphtylamine en milieu acétique.

Ce réactif donne une coloration rose en présence de nitrites.

– Si coloration rose : présence de nitrites dans le milieu donc
 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ nitrate réductase +.

– Si pas de coloration rose : absence de nitrites, recherche des nitrates par addition de poudre de zinc. (Réducteur)
 $\text{NO}_3^- + \text{Zn} \rightarrow \text{NO}_2^-$

– Si la coloration rose apparaît par action de la poudre de Zn, le milieu après incubation contenait toujours des nitrates.
 NO_3^- Nitrate réductase -

- Si la coloration rose n'apparaît pas par action de la poudre de Zn, le milieu, après incubation ne contenait ni nitrates, ni nitrites. Ceux-ci ont été réduits en ammoniac ou azote.

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3 \text{ ou } \text{N}_2$

Nitrate réductase +

Nitrate réductase

Souche	<i>E. coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Staphylococcus</i>
--------	----------------	--------------------	-----------------------

Observation après ajout du réactif de Griess			
Observation après ajout			
Résultat de la Nitrate réductase			

Conclusion :

Pour chacune de ces trois souches, précisez les voies utilisées pour produire de l'énergie en aérobie et en anaérobie sur milieu non nitraté et sur milieu nitraté.

– **E. coli** :

– **Pseudomonas** :

– **Staphylococcus** :

8. MÉTABOLISME DU CARBONE

8.1. Test Fermentaire ou Oxydatif : milieu de Hugh et Leifson

	E.coli	Staphylocoque sur milieu MEVAG	Bacillus	Pseudomonas
Aspect des cultures sur milieu de Hugh et Leifson				
Type métabolique				

8.2 – Fermentation les différents sucres : Maltose et Lactose

a) Maltose: eau peptonée au rouge de phénol avec cloche

	Maltose	
	Milieu	Résultat
E.coli		
Proteus vulgaris		

b) Maltose: milieu de Kligler – Recherche l'enzyme (β galactosidase)

	Aspect du milieu de Kligler	Utilisation du lactose et du glucose	Test à l'ONPG (β galactosidase)
E.coli			
Proteus vulgaris			

8.3. Mise en évidence de la fermentation mixte : milieu de Clark et Lubs

a) Test au rouge de méthyle : voie acide mixte.

	Couleur du mélange milieu CL + rouge de méthyle	Test RM
E.coli		
Entérobacter aérogènes		

b) Test de Vosges Proskauer : voie butylène glycolique.

	Couleur du mélange milieu CL + réactifs VP ₁ et VP ₂	Test de Vosges Proskauer
E.coli		
Entérobacter aérogènes		

8.4 Mise en évidence de l'utilisation une source de carbone autre que glucide : milieu du Simmons

	Développement	Couleur de la tranche	Utilisation du citrate de sodium
E.coli			
Salmonella arizonae			

Conclusion :

Métabolisme du carbone pour les souches testées ?

TP n°3 : Métabolisme de protéines et de lipides

TP n°3 – 1^{ère} Séance

9. MÉTABOLISME DE PROTÉINES

9.1. Test de protéolyse (gélatine et caséines)

a) Hydrolyse de la gélatine : Méthode de Köhn.

Deux souches seront testées : (*Pseudomonas aeruginosa* et *Hafnia alvei* en culture solide) pour mettre en évidence la gélatinase.

* Milieu d'étude : dans deux tubes d'eau peptonée, introduire avec une pince flambée, un disque de gélatine au charbon ou un film recouvert de gélatine imprégnée de sel d'argent.

* Ensemencement : ensemencer chaque milieu à partir d'une culture en milieu solide (suspension dense).

* Incubation : 37°C de 48 heures à 5 jours.

* Lecture (*Voir fiche technique*) : l'utilisation de la gélatine provoque la libération de particules noires de charbon ou de sel d'argent qui se déposent au fond du tube.

b) Hydrolyse de la caséine :

Sur un milieu liquide ou solide contenant du lait écrémé.

Deux souches seront testées (*Pseudomonas* et *Hafnia alvei* en culture solide) pour mettre en évidence une protéase.

* Milieus d'étude :

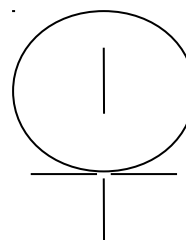
- Deux tubes de lait écrémé au tournesol stérile : ajouter 3 gouttes de solution de tournesol dans 10 ml de lait stérile (pipette Pasteur).

- Deux boîtes de Pétri renfermant du lait gélosé (10 ml d'eau gélosée à 3 % d'agar + 10 ml de lait écrémé stérile à mélanger à chaud en tube et à couler en boîte de Pétri).

* Ensemencement :

- lait écrémé : Ensemencer avec une colonie de la souche bactérienne à tester.

- lait gélosé : ensemencer une colonie de chaque souche à tester en stries rayonnantes avec l'anse Pasteur.



* Incubation : à 37°C de 48 heures à 5 jours.

* Lecture :

- lait écrémé au tournesol : on peut observer quatre phénomènes.

** coagulation du lait : acidification par fermentation du lactose et virage au rose du tournesol.

** protéolyse de la caséine :

. éclaircissement du lait non coagulé, partiel ou total.

. ou digestion partielle ou totale du caillot qui devient spongieux.

** décoloration du tournesol dûe à la présence d'une réductase

** Alcalinisation du lait et virage au bleu par production d'ammoniaque ou d'acides aminés alcalins.

- lait gélosé : La digestion de la caséine se traduit par un éclaircissement du milieu autour de la strie.

9.2. Dégradation des acides aminés

a) Dégradation de la lysine :

Deux enzymes sont recherchées : LDC (lysine décarboxylase) et LDA (lysine désaminase).

Deux souches seront testées : *Proteus vulgaris* et *Hafnia alvei* en culture solide.

* Milieux utilisés : trois sortes de milieux peuvent être utilisés pour la recherche de la LDC (Milieu de Kligler et Milieu Lysine Fer), dont un seul permettant la recherche simultanée de LDC et LDA (Lysine-fer).

* Ensemencements :

- Ensemencer deux tubes de milieu de Kligler en stries sur la tranche et en piqûre centrale dans le culot avec chaque souche à étudier. Ne pas visser les bouchons.

- Ensemencer deux tubes de milieu Lysine Fer en stries serrées sur la tranche et en piqûre dans le culot avec chaque souche à étudier. Ne pas visser les bouchons.

- Ensemencer deux tubes de bouillon LDC avec une colonie de chaque souche à tester. Couvrir d'huile de paraffine (anaérobiose).

* Incubations : à 37°C pendant 48 heures.

* Lecture (voir fiches techniques correspondantes) :

- **Milieu de Kligler** : la LDC libère de la cadavérine à partir de la lysine. La lecture n'est pas directe. Après extraction de la cadavérine par le chloroforme en milieu alcalin, on la révèle par une réaction colorée (violet) à la ninhydrine.

- **Milieu Lysine-Fer** : la lecture est directe car le milieu contient du pourpre de bromocrésol. La LDC se lit dans le culot, la LDA sur la tranche (activité maximum en aérobiose car c'est une désamination oxydative).

LDC : le culot s'acidifie d'abord (culot jaune) par fermentation du glucose puis s'alcalinise par production de cadavérine (culot violet).

LDA : la tranche vire au rouge par formation d'un complexe entre le fer ferrique du milieu et l'acide cétonique résultant de la désamination de la lysine.

Remarque : Une coloration noire du culot sur milieux LDC et Kligler traduit la présence d' H_2S (Complexe noir de sulfure de fer par réaction entre H_2S et le citrate ferrique du milieu).

b) Acides aminés soufrés : Cystéine, Cystine et Méthionine.

Leur catabolisme produit un dégagement d' H_2S . Si le milieu de culture renferme du fer, il se formera du sulfure de fer.

Mais la production d' H_2S peut aussi être due à la réduction des sulfites ou des thiosulfates.

*** Milieux pour la mise en évidence d' H_2S**

- Milieu de Kligler (ensemencé précédemment) renfermant du citrate ferrique ensemencé par piqûre centrale.

- Milieu Lysine-Fer (ensemencé précédemment) renfermant du citrate ferrique, ensemencé par piqûre centrale.

* Lectures : (*voir fiches techniques après incubation à 37°C pendant 48 heures*).

La production d' H_2S se traduit par le noircissement du culot des milieux Lysine Fer et Kligler.

9.3- Dégradation du tryptophane et de l'urée

a) Dégradation du tryptophane

On recherche deux voies de dégradation possibles :

- la désamination oxydative par la TDA (tryptophane désaminase) conduisant à la production d'acide indole pyruvique.
- la production d'indole et d'acide pyruvique par la Tryptophanase.

Deux souches seront testées : *Proteus vulgaris* et *Hafnia alvei* en culture solide.

* Milieux :

- Deux milieux urée indole (1 ml en tube à hémolyse) : pour la recherche de la TDA, de l'uréase et de la Tryptophanase.
- Deux milieux eau peptonée pour la recherche de la tryptophanase (indole).

* Ensemencement : faire une suspension épaisse dans les deux milieux urée indole et eau peptonée.

* Incubation : à 37°C pendant 48 heures.

* Lecture (*Voir fiches techniques*)

- Tryptophane désaminase : sur milieu urée indole l'acide indole pyruvique provenant de la désamination par la TDA réagit avec le perchlorure de fer pour donner un complexe brun-rouge.

- Tryptophanase : la production d'indole sur milieu urée indole et sur eau peptonée est mise en évidence par une réaction colorée avec le réactif de Kovacks ou de James.

b) Dégradation de l'urée

L'urée est un produit de dégradation des acides aminés. Elle est utilisée par les bactéries possédant une uréase.

* Milieu : Les milieux urée-indole précédemment ensemencés avec *Proteus vulgaris* et *Hafnia alvei* servent à la recherche simultanée de l'uréase, TDA et indole.

* Lecture : (*voir fiche technique après incubation à 37°C pendant 48 heures*).

On lit d'abord directement l'uréase (virage au rose par alcalinisation du milieu) avant d'ajouter le réactif de la TDA (perchlorure de fer) puis le réactif de l'indole. (Kovacks)

10. MÉTABOLISME DES LIPIDES

Les bactéries lipolytiques appartiennent entre autres, aux genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Serratia*. Il existe plusieurs sortes d'activités lipolytiques.

10.1. Recherche l'enzyme : estérase

C'est une exoenzyme qui hydrolyse un ester en acide gras et alcool. On testera trois souches : *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas* et *Serratia*.

* **Milieu** : on utilise le milieu de Sierra renfermant entre autres du Tween 80 (monooléate de sorbitol) et du CaCl_2 .

- Faire fondre 100 ml de milieu de base.
- Ajouter 1 ml de Tween 80 au milieu en surfusion. Homogénéiser.
- Couler un peu de milieu dans trois boîtes de Pétri. Laisser solidifier. Sécher à l'étuve.

Le milieu est translucide car le monooléate est soluble dans l'eau.

* **Ensemencement** : ensemencer chaque souche par une seule strie à la surface du milieu et incubé pendant 48 heures à 37°C.

* **Lecture** (voir fiche technique) : l'hydrolyse de l'ester libère de l'acide oléique qui précipite en présence de CaCl_2 sous forme d'oléate de calcium insoluble autour de la strie.

10.2. Recherche l'enzyme : lipase

C'est une exoenzyme qui hydrolyse les trois liaisons ester de la tributyrine. On testera trois souches : *Pseudomonas*, *Staphylococcus epidermidis* et *Serratia*.

* **Milieu** : gélose à la tributyrine et au rouge de phénol.

- Faire fondre 100 ml de milieu de base.
- Ajouter 1 ml de tributyrine au milieu en surfusion. Homogénéiser.
- Couler un peu de milieu dans trois boîtes de Pétri. Laisser solidifier. Sécher. Le milieu est rouge et opaque à cause de la tributyrine en émulsion.

* **Ensemencement** : ensemercer chaque souche par une strie médiane à la surface du milieu et incuber à 37°C pendant 48 heures.

* **Lecture** (*voir fiche technique*) : l'hydrolyse de la tributyrine entraîne un virage au jaune du milieu autour de la strie.

10.3. Recherche l'enzyme : lécithinase et de la lipoprotéinase

Ce sont deux exoenzymes. La lécithinase hydrolyse les liaisons esters ou ester phosphorique de la lécithine du jaune d'oeuf. La lipoprotéinase hydrolyse la lipoprotéine du jaune d'oeuf. On testera deux souches :

- *Staphylococcus aureus*.

- *Staphylococcus epidermidis*.

* **Milieu** : le milieu de Baird Parker est un milieu complexe peu sélectif renfermant entre autres du jaune d'oeuf et du tellurite de potassium.

- Faire fondre 100 ml de milieu de base.

- Ajouter 5 ml de jaune d'oeuf au tellurite de potassium et 2,5 ml de sulfaméthazine (inhibiteur de Proteus).

- Couler un peu de milieu dans deux boîtes de Pétri. Laisser solidifier. Sécher. Le milieu est opaque à cause du jaune d'oeuf.

* **Ensemencement** : ensemercer chaque souche par une strie médiane à la surface d'une boîte et incuber à 37°C pendant 48 heures.

* **Lecture** (*voir fiche technique*) :

- La lipoprotéinase provoque un éclaircissement du milieu autour de la strie (digestion de la lipoprotéine du jaune d'oeuf) qui apparaît après 24 heures.

- La lécithinase provoque une précipitation des acides gras autour de la strie qui apparaît après 48 heures.

Les germes qui peuvent se développer sur ce milieu sont : *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, Levures.

Pour rechercher ces enzymes, on peut aussi utiliser un milieu non sélectif comme la gélose à l'oeuf.

TP n°3 : Métabolisme de protéines et de lipides

TP N° 3 - 2^{ème} séance - Lecture

Fiche de lecture et d'interprétation des résultats

NOM/Prénom :

Groupe :

9. METABOLISME DE PROTÉINES

9.1 – Protéolyse

a) Hydrolyse de la gélatine : film noir et blanc en Bouillon nutritif

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Aspect du film de gélatine		
Gélatinase		

b) Hydrolyse de la caséine :

- lait écrémé au tournesol

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Aspect du milieu		
Fermentation du lactose		
Réductase		
Protéolyse de la caséine		

- lait gélosé

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Aspect du milieu		
Protéolyse de la caséine		

9.2 – Dégradation des acides aminés

a) Dégradation de la lysine

- Milieu de Kligler

<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Coloration à la ninhydrine après extraction chloroformique	
L.D.C.	

- Milieu Lysine-Fer

<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du culot	
L.D.C.	
Couleur de la tranche	
L.D.A.	

b) Acides aminés soufrés : (à combiner avec LDC)

- Milieu de Kligler

<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du culot	
H ₂ S	

- Milieu Lysine-fer

<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du culot	
H ₂ S	

9.3. Dégradation du tryphophane et de l'urée

a) **Dégradation du tryphophane et de l'urée**

- Milieu urée indole

<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Coloration du milieu avec le perchlorure de fer	
T.D.A.	
Coloration après addition du réactif de James ou Kovacks	
Indole	

- Eau peptonée

<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur de l'anneau après addition du réactif de Kovacks	
Indole	

b) **Dégradation de l'urée**

- Milieu urée indole

<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Hafnia alvei</i>
Couleur du milieu urée indole	
Uréase	

Conclusion sur le métabolisme de l'azote :

10. METABOLISME DES LIPIDES

10. 1. Mise en évidence de l'estérase

	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas	Serratia
Aspect du milieu de Sierra			
Estérase			

10. 2. Mise en évidence de la lipase :

	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas	Serratia
Aspect du milieu à la tributyryne			
Lipase			

10. 3. Mise en évidence de la lécithinase

	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Aspect des colonies sur milieu de Baird Parker		
Lipoprotéinase		
Lécithinase		

Conclusion sur le métabolisme de lipides :

TP n°4 : Identification bactérienne par la galerie d'API

TP n°4- séance 1

11.1. IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES ET DES ENTEROBACTERIES PAR GALERIES API (voir fiches)

Ensemencer deux galeries API.

- une galerie API STAPH ou ID 32 STAPH avec une souche de staphylocoque (souche 1).

- une galerie API 20 E avec une souche d'entérobactérie (souche 2).

Exemple : comment on ensemence une galerie API

A - MATÉRIEL

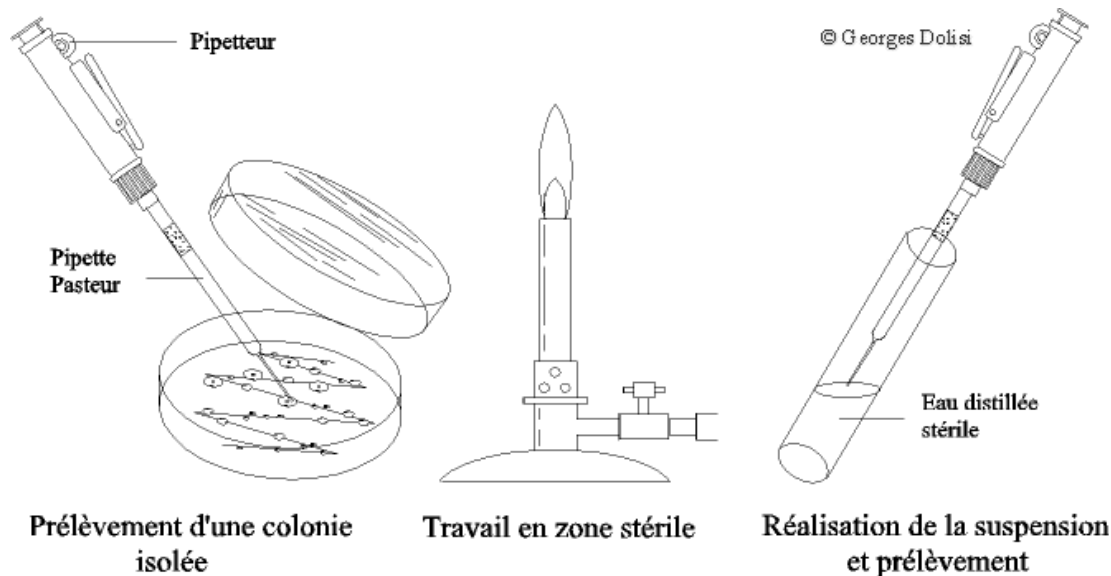
- ☐ Galerie API 20 E (réf. 20 100) + boîte + couvercle, tableau de détermination.
- ☐ Bec Bunsen, galerie avec un tube à vis stérile, marker, pipettes Pasteur, pipetteur, une pipette graduée 0 à 10 ml, huile de paraffine, eau distillée stérile (ou « Suspension Medium » 5 mL - Réf. bioMérieux 20 110).

B - PRÉPARATION DE LA GALERIE API

- o Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 mL d'eau dans les alvéoles (avec pipette graduée et pipetteur) pour créer une atmosphère humide.
- o Incrire les références de la souche bactérienne sur la languette latérale de la boîte (+ date et initiales de l'opérateur).
- o Déposer la galerie dans la boîte d'incubation.

C - PRÉPARATION DE L' INOCULUM

ATTENTION : il faut préalablement avoir développé une bactérie en colonies isolées dans une boîte de Pétri.



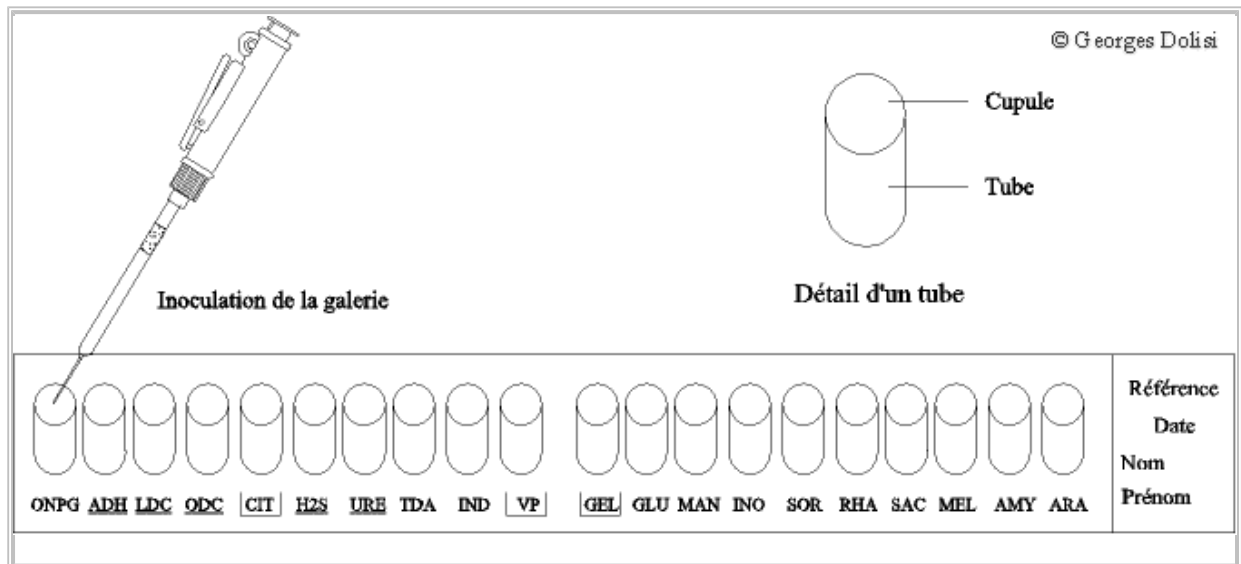
- ☐ Ouvrir une ampoule de « Suspension Medium » ou introduire quelques ml d'eau distillée stérile (avec une pipette Pasteur) dans un tube à vis stérile.
- ☐ Avec la pipette Pasteur, prélever **une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé**.
- ☐ Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.
- Vérifier la densité

D - INOCULATION DE LA GALERIE API 20 E

- ☐ Avec la suspension bactérienne et la pipette ayant servi au prélèvement, **remplir tubes et cupules** des tests

CTI **VP** **GEL**

- ☐ Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- ☐ Créer une anaérobiose dans les tests **ADH**, **LCD**, **ODC**, **URE**, **H₂S** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- ☐ Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 35 - 37° C pendant 18 à 24 heures.



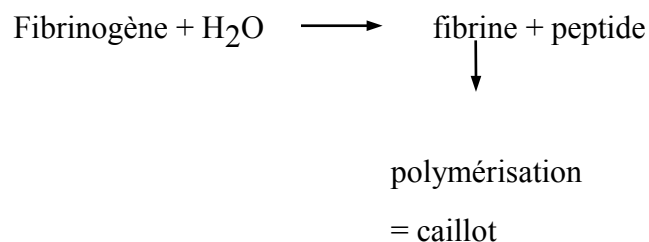
E - LECTURE ET DÉTERMINATION : Elle se fait avec le tableau API 20 E.

11.2. TESTS DE CONFIRMATION POUR IDENTIFIER LE STAPHYLOCOCCUS AUREUS par la recherche d'enzymes toxiques.

La lécithinase a déjà été mise en évidence sur milieu de Baird Parker. On recherchera d'autres enzymes toxiques pour confirmer le caractère pathogène.

1) Recherche de la coagulase libre : Tester Staph.aureus et Staph. Epidermidis.

C'est une exoenzyme responsable de la coagulation du plasma selon la réaction :



* **Milieu** : on utilise un milieu liquide, le bouillon cerveau-cœur pour qu'il n'y ait pas d'interférence avec la coagulase liée (*voir schéma ci-joint*).

* **Ensemencement** : ensemencer une goutte de suspension bactérienne sur le bouillon cerveau-cœur, et incuber à 37°C pendant 48 heures.

* **Lecture** (*voir fiche technique*) : la coagulation du plasma de lapin doit avoir lieu entre 2 heures et 24 heures d'incubation à 37°C.

2) Recherche de la coagulase liée ou "Clumping factor" : Tester Staph. Aureus et Staph. Epidermidis.

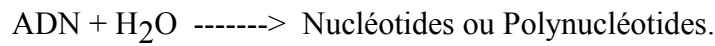
* **Principe** : des particules de polymère monodispersées de 3 µm, enduites de façon covalente avec du fibrinogène humain purifié et des IgG agglutineront en

présence de coagulase cellulaire et/ou de protéine A, produites par S. Aureus. Il y a fixation spécifique de la coagulase cellulaire au fibrinogène et de la protéine A au fragment Fc de l'immunoglobuline G.

Afin d'obtenir une fiabilité maximum, le kit Monostaph comprend un contrôle négatif contenant des particules monodispersées recouvertes d'albumine bovine.

3) **Recherche de l'ADNase** : Tester Staph. Aureus et Staph.epidermidis.

C'est une exoenzyme qui catalyse la réaction :



* **Principe** : Staphylococcus aureus hydrolyse l'ADN en 24 heures à 37°C. La présence ou l'absence d'ADN est mise en évidence par l'addition d'un réactif, le bleu de toluidine.

* **Technique** : faire une strie à la surface d'une gélose à l'ADN. Incuber à 37°C de 24 à 48 heures.

* **Lecture** : verser un peu de réactif sur la strie (bleu de toluidine).

-> le bleu de toluidine vire au rose en présence de nucléotides, mais reste bleu en présence d'ADN.

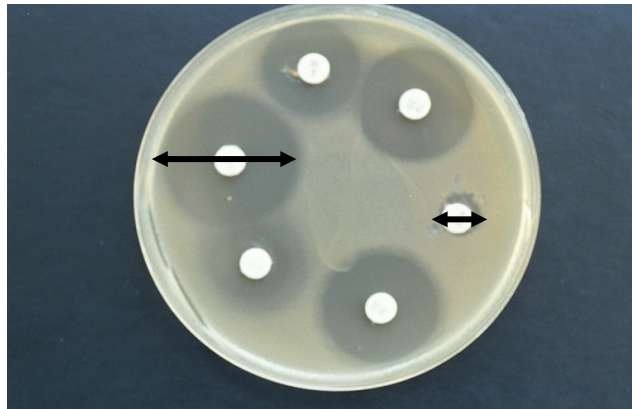
11.3. TESTS D'UN ANTIBIOGRAMME

Ensemencement en nappe à la surface d'un milieu en boîte de Pétri et réalisation d'un antibiogramme :

On testera une souche de *E. coli* ou *S. aureus* et six antibiotiques (**Pénicilline, néomycine, tétracycline, streptomycine, érythromycine, chloramphénicol**)

- * Couler le **milieu de MUELLER-HINTON** en surfusion dans une boîte de Pétri : laisser solidifier à plat.
- * Prélever une goutte de bouillon de culture d' *E. coli* et la mettre en suspension dans 10 ml d'eau stérile.
- * Inonder la surface de la boîte de Pétri renfermant le milieu de MUELLER-HINTON avec 2 ml de la dilution d' *E. coli* et aspirer l'excès de liquide
- * Laisser sécher la boîte environ 15 mn à 37°C à l'étuve.
- * Répartir les six disques à la surface de la boîte selon le schéma ci-dessous. Appliquer stérilement des disques d'antibiotique en utilisant une pince flambée.

Antibiogramme méthode "Institut Pasteur".



TP 4 : IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR LA GALERIE D'API

Fiche de lecture et d'interprétation des résultats

NOM/Prénom :

Groupe :

11.1. GALERIES EFFECTUEES SUR UN STAPHYLOCOQUE ET UNE ENTEROBACTERIE

Coller les bulletins d'interprétation sans oublier de mentionner les numéros d'identification des souches et les noms des espèces.

11.2. TEST DE CONFIRMATION DE L'IDENTIFICATION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

1. Coagulase libre

Bactéries	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Temps de coagulation du plasma de lapin		
Coagulase		

2. Coagulase liée : "clumping factor"

Bactéries	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Aspect du mélange suspension de latex + suspension bactérienne		
Récepteur du fibrinogène ou protéine A		

3. ADNase :

Bactéries	Staphylococcus aureus	Staphylococcus epidermidis
Aspect de la gélose à l'ADN après addition de bleu de toluidine		
ADNase		

11.3. TESTS D'UN ANTIBIOGRAMME

Action des antibiotiques

Pénicilline (P)
,

Néomycine (N)

Tétracycline (T)

Streptomycine (S)
ol (C).

Erythromycine (E)

Chloramphénicol (C).

* Antibiogramme de la bactéries :

Antibiotique	P	N	T	S	E	C
Présence d'une zone d'inhibition						
Diamètre de la zone d'inhibition						
Interprétation des zones d'inhibition						

Conclusion :