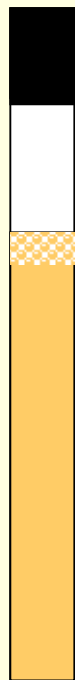


6- MISE EN ÉVIDENCE DU TYPE RESPIRATOIRE

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



1



2



3



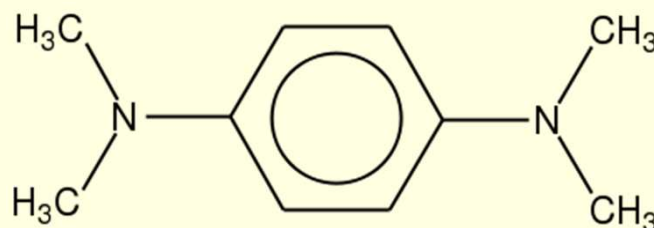
4

7 - MISE EN EVIDENCE DU METABOLISME ENERGETIQUE

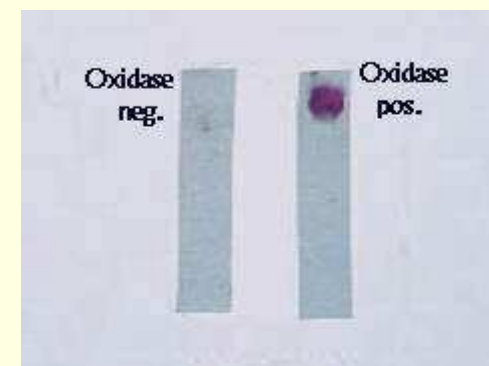
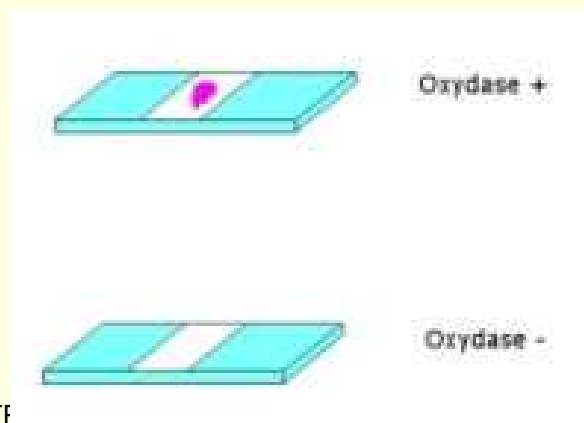
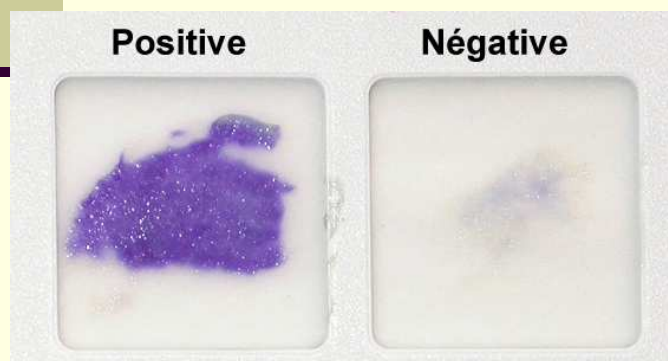
- **Oxydase**
- **Catalase**
- **Nitrate réductase**

Mise en évidence du cytochrome c par le test de « l'oxydase » »

N-diméthyl-paraphénylene diamine



En effet, en présence de dioxygène, la cytochrome-oxydase est capable de catalyser l'oxydation de la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylènediamine en semi-quinone (rose violacé).



Tf

mhchatain@isara.fr

Catalase : enzyme de détoxification

- en présence d'O₂ l'oxydation ou l'oxygénation de nombreux substrats produit du FADH₂
- une partie du FADH₂ peut être réoxydée par O₂ à l'air, avec formation de 2 produits très toxiques qui doivent être détruits par des enzymes de détoxification :
 - l'eau oxygénée H₂O₂
 - l'ion superoxyde O₂⁻

Catalase : enzyme de détoxification

■ Test de la catalase:

- verser une goutte d'eau oxygénée sur une colonie
- observer le dégagement de gaz en présence d ' H_2O_2



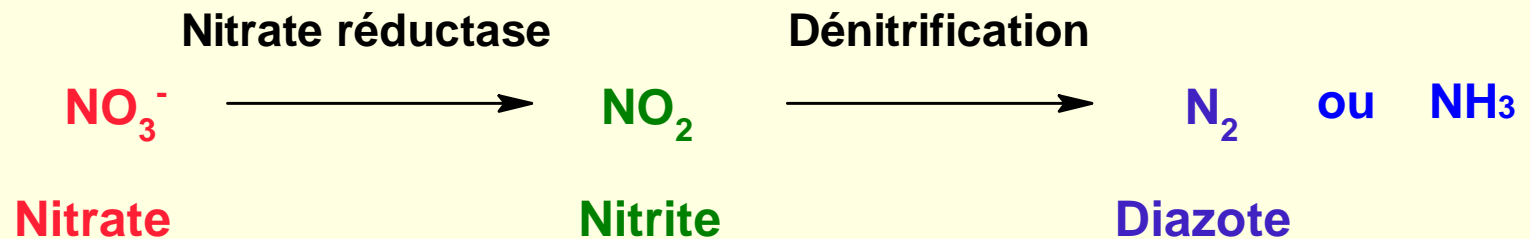
Pas d'effervescence :
catalase "-"



Effervescence :
catalase "+"

Nitrate Réductase

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction , jusqu'à une dénitrification.

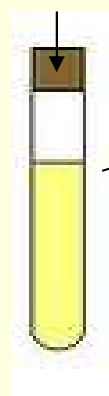


Nitrate Réductase

Test

Étape 1 : Vérification le nitrite

une goutte de réactifs :
réactif Nitrites 1 (acide sulfanilique)
réactif Nitrites 2 (α -naphthylamine)



A

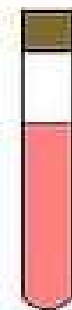
Réductase +

Étape 2 : Vérification le nitrate



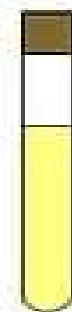
B

Ajout de Zinc



C

Réductase -



D

Réductase +

TP

8 - MÉTABOLISME DU CARBONE

8.1 – Test Oxydative ou Fermentaire

Voie oxydative ou fermentaire de 4 souches seront testées : E.Coli, staphylococcus (MEVAG), bacillus, pseudomonas dans (culture liquide) Hugh et Leifson.

8.2 – Fermentation les différents sucres : Maltose et Lactose

8.3. Mise en évidence de la fermentation mixte

Deux souches E.coli et Entérobacter sur milieu de **CLARK et LUBS**

8.4 – Mise en evidence de l'utilisation d'une source de carbone organique autre que les glucides

Deux souches : E.coli et Salmonella sur milieu de **Simmons** (milieu solide incliné) contenant du citrate de sodium comme seule source de carbone et un indicateur de pH

Les indicateurs colorés

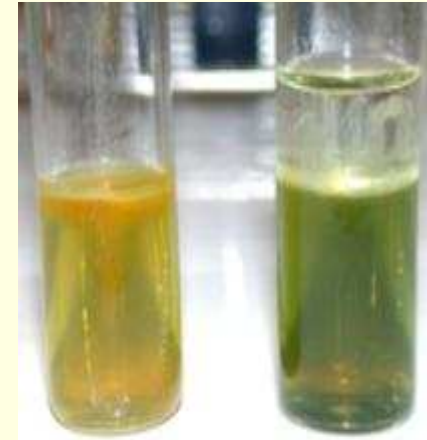
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
JAUNE						VIOLET							Bromocrésol pourpre (BCP)
JAUNE						OR	ROUGE						Rouge de phénol (RP)
JAUNE						VERT	BLEU						Bleu de bromothymol (BBT)
ROUGE							INCOLORE (couleur du milieu)						Rouge neutre (RN)
ROUGE						JAUNE							Rouge de méthyle (RM)

8.1 – Test Oxydative ou Fermentaire

Aspect du milieu avant utilisation

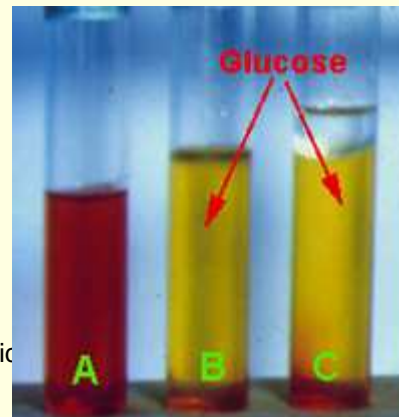


Aspect du milieu après utilisation



Milieu : Hugh et Leifson

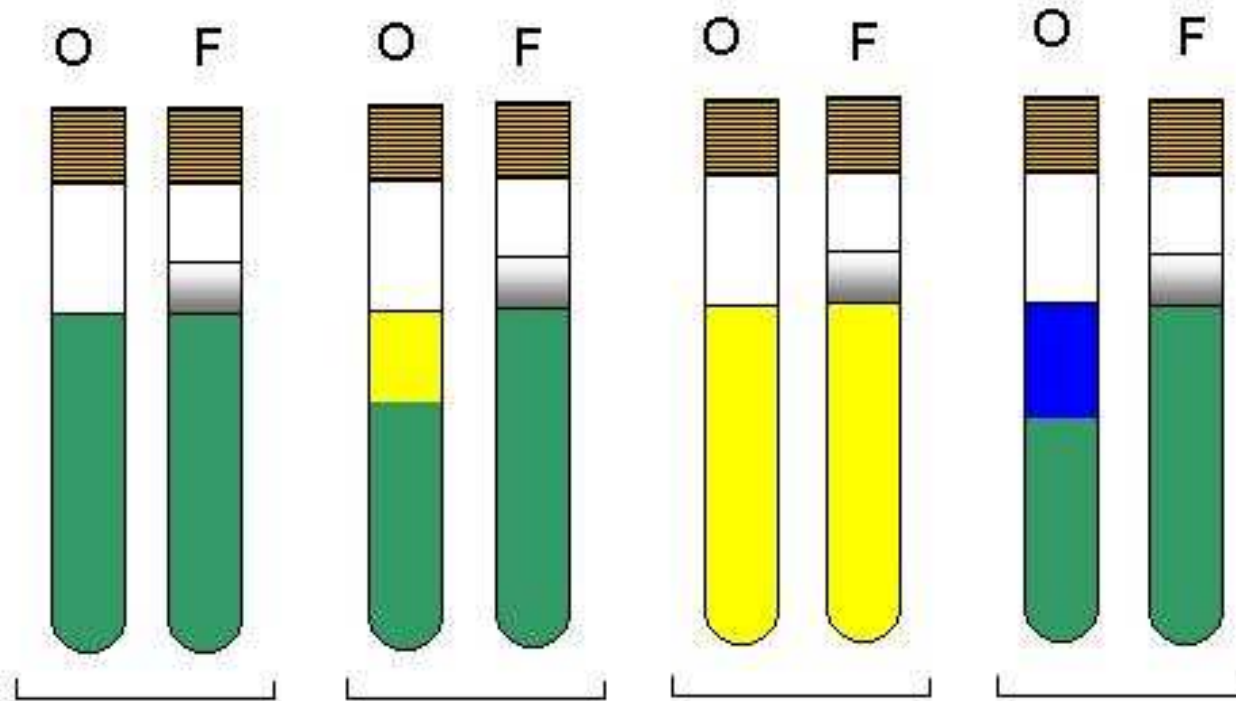
milieu MEVAG



TP3-Mic

ARA

Hugh et Leifson



Lecture

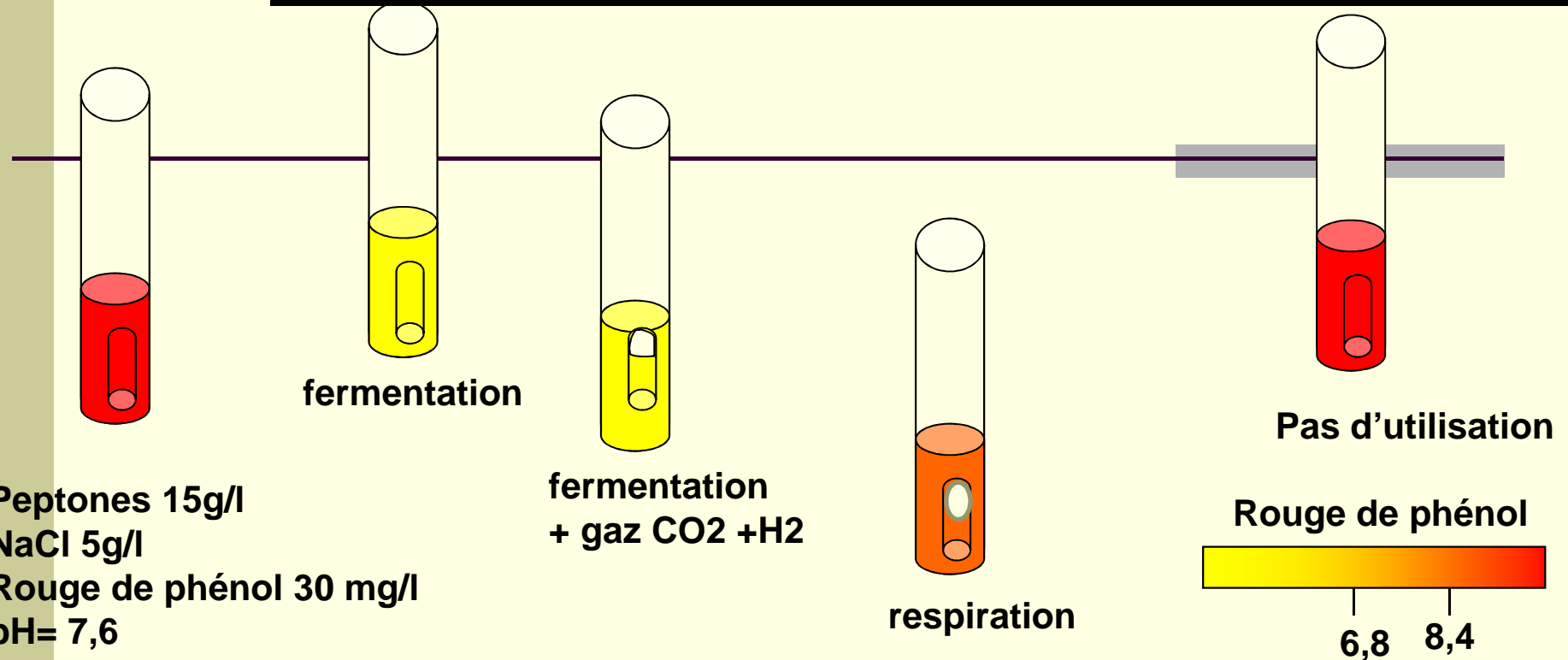
1 Tubes tel qu'ils doivent être après ensemencement

2 Haut du Tube O jaune → il y a eu un changement de couleur du à l'acidification dans le haut du tube O uniquement : les bactéries ont besoin d'oxygène pour dégrader le glucose. Les bactéries sont oxydatives.

3 Tubes O et F entièrement jaunes → il y a eu virage de l'indicateur coloré à cause de la production d'acide dans tout le tube : les bactéries ont utilisé le glucose en présence et en absence d'oxygène. Les bactéries sont donc fermentatives.

4 Haut du tube O bleu → bactéries inertes au glucose : utilisation des peptides comme source d'énergie.

8.2 – Mise en evidence des fermentations surees



Peptones 15g/l

NaCl 5g/l

Rouge de phénol 30 mg/l

pH= 7,6

Sucre X 5 à 10g/l

Inoculum provenant d'un milieu solide ou liquide sans sucre

Galactose

Lactose, saccharose, maltose, cellobiose

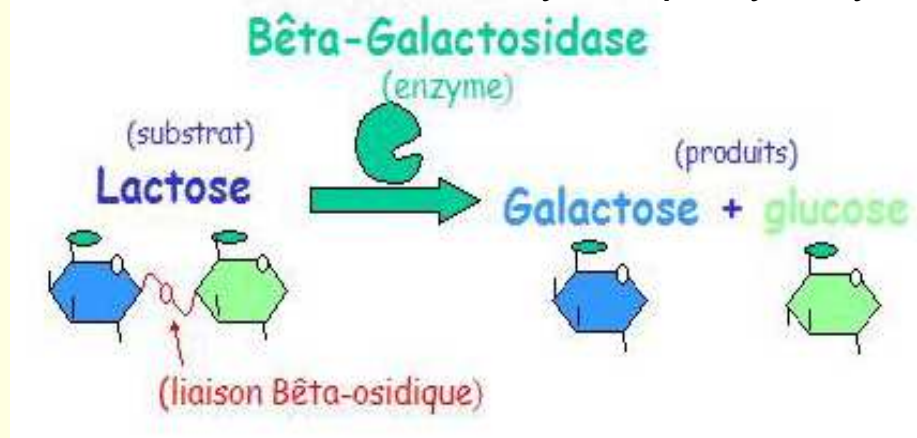
Arabinose, xylose

Inositol, mannitol, sorbitol

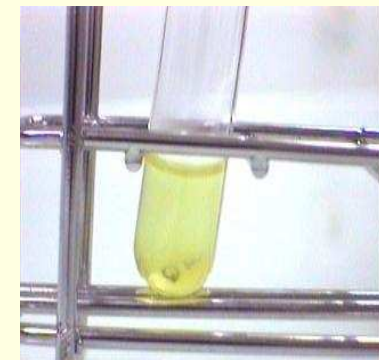
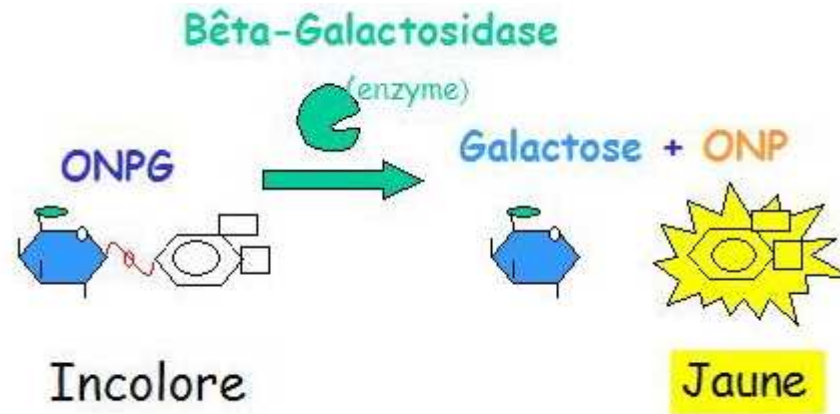
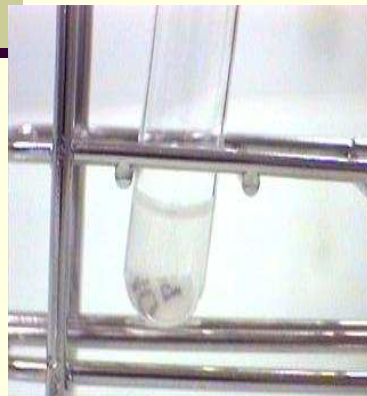
dextrines

Lactose - enzyme galactosidase

La β -galactosidase est un endoenzyme qui hydrolyse le lactose en galactose + glucose



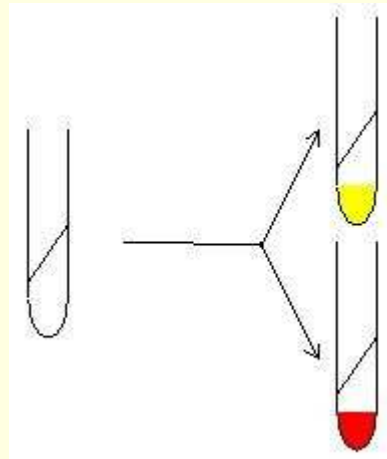
ONPGest hydrolysé par la β galactosidase en orthonitrophénol jaune



Lactose - Enzyme galactosidase

Le milieu Hajna Kligler

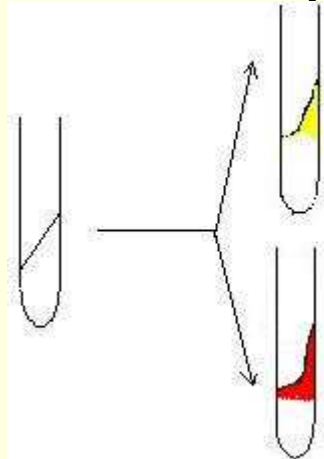
Fermentation du glucose : observer le culot



Glucose +

Glucose -

Fermentation du lactose: observer la pente



Lactose +

Lactose -

Lactose - Enzyme galactosidase

Le milieu **Hajna Kligler**



**glucose + et
lactose +**



**glucose + et
lactose -**



**glucose - et
lactose -**



**glucose - et
lactose +**

Détection la galactosidase par ONPG

La réaction est la suivante : ONPG $\xrightarrow{\beta\text{-gal}}$ ONP + galactose

Faire une suspension dense en eau stérile (tube à hémolyse)

- ✓ Déposer un ½ disque d'ONPG
- ✓ Placer au bain-marie à 37°C
- ✓ Lire après 30 minutes

Observation	Interprétation	Conclusion
 Coloration jaune	La bactérie a hydrolysée l'ONPG en ONP (produit coloré jaune)	La bactérie possède la β -galactosidase elle est dite ONPG +
 Incolore	Il n'y a pas d'ONP dans le milieu, la bactérie n'a pas hydrolysé l'ONPG	La bactérie ne possède pas la β -galactosidase elle est dite ONPG -

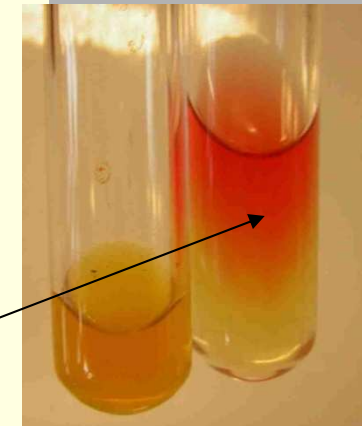
8.3. Mise en évidence de la fermentation mixte

Le milieu **Clark et Lubs**

Aspect du milieu avant utilisation



Aspect du milieu après utilisation



⇒ Test VP : rouge : VP+, jaune : VP-
⇒ Test RM, rouge : RM+, jaune : RM-

test RM : ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle, la lecture est immédiate.

✓ soit de nombreux acides par la voie des fermentations acides mixtes qui sont mis en évidence par le test RM (au rouge de méthyle),

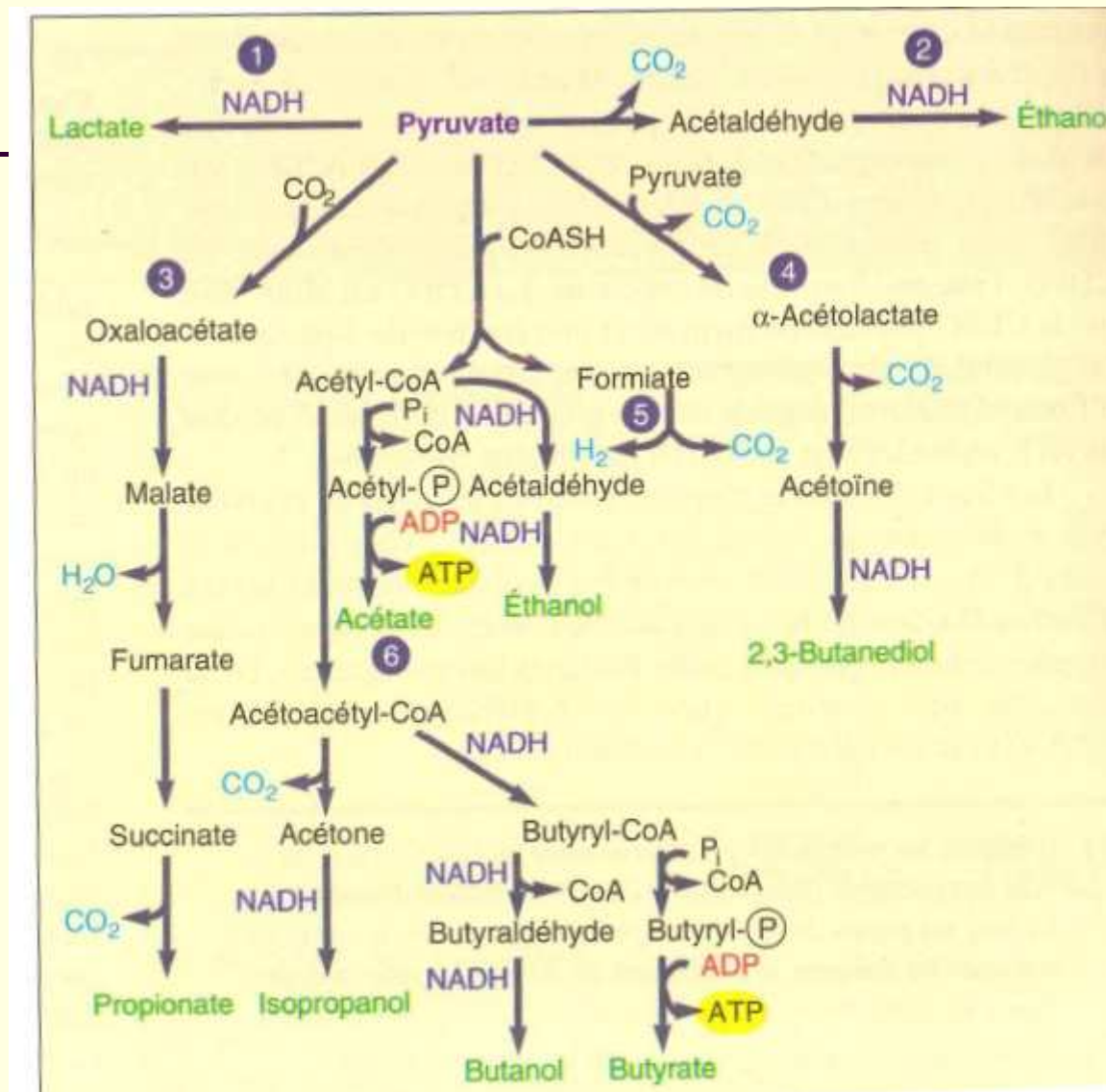
ROUGE	acide	JAUNE	base	Rouge de méthyle (RM)
-------	-------	-------	------	-----------------------

test VP : ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de soude concentrée (ou de potasse). incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation. attendre quelques min à 1 heure.

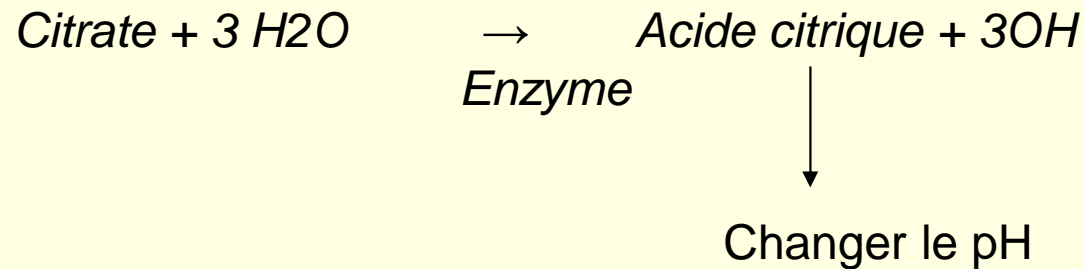
✓ soit d'acétoïne produit par fermentation butanediolique qui est mise en évidence par le test VP (Voges-Proskauer)

acétoïne + base forte + alpha naphthol + O₂ rouge

Le devenir du pyruvate : Résumé Fermentation



L'utilisation d'une source de carbone organique autre que les glucides : citrate de sodium.



Milieu citrate de Simmons



37°C – 48 h



Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate +