

## TP MGM : ÉTUDE DES MÉTABOLISMES RESPIRATOIRES ET FERMENTATIFS

### 1. COMPARAISON DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DE DEUX SOUCHES BACTÉRIENNES

#### 1.1. MANIPULATIONS

Vous disposez d'une souche « A » (*Escherichia coli*) ou « B » (*Pseudomonas aeruginosa*) présentée sur gélose nutritive ordinaire inclinée :

- Effectuer la recherche de l'oxydase.
- ensemencer les milieux suivants à partir d'une suspension bactérienne préparée en eau physiologique stérile (0,5 Mac Farland) :
  - une gélose Viande-Foie (VF).
  - une gélose Viande-Foie nitraté (VFN).
  - une gélose Viande-Foie chloraté VFC + VF témoin (VFT), pour la souche A seulement.
  - un milieu Hugh & Leifson, à incuber en aérobie.
  - un milieu Hugh & Leifson, à incuber en anaérobie.
  - un bouillon nitraté.
  - un milieu Hajna-Kligler.
  - une gélose nutritive ordinaire, à incuber en aérobie.
  - une gélose nutritive ordinaire, à incuber en anaérobie.
- Incuber 24 heures à 37°C.
- Réaliser les tests complémentaires (si nécessaire) et lire les résultats obtenus.

#### 1.2. COMPTE-RENDU

**Q1.** Reproduire et compléter le tableau de résultats suivant :

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Recherche de l'oxydase</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>GNO en aérobiose</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>GNO en anaérobiose</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>Gélose VF</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>Gélose VF nitraté</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>Milieux Hugh &amp; Leifson</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>Milieu Hajna-Kligler</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>Bouillon nitraté</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	Observation(s) : Conclusion(s) :
<b>Géloses VF chloratées</b>	Observation(s) : Conclusion(s) :	X

**Q2.** Rappeler les caractéristiques des cytochromes.

**Q3.** Le réactif utilisé pour la recherche de l'oxydase est une molécule réduite de N,N-diméthyl-paraphénylène-diamine qui a un potentiel redox identique à celui du cytochrome c. Lors de son oxydation, elle donne un composé violacé. Proposer une hypothèse quant à l'élément de la chaîne respiratoire qui pourrait correspondre à l'« oxydase » recherchée en microbiologie.

**Q4.** Pour chaque souche, vérifier la cohérence des résultats obtenus pour la gélose Viande-Foie, les deux milieux Hugh & Leifson et les deux géloses nutritives ordinaires.

- Q5.** La réduction des nitrates peut résulter de deux mécanismes :
- la **réduction assimilatrice** des nitrates catalysée par la **nitrate réductase B**.
  - la **réduction dissimilatrice** des nitrates catalysée par la **nitrate réductase A**.
- Expliquer la différence entre ces deux types de mécanismes.
- Q6.** Déterminer le type de nitrate réductase de la souche A. Justifier.
- Q7.** Analyser la différence de comportement de *Pseudomonas aeruginosa* en VF simple et en VF nitraté. Préciser le métabolisme utilisé dans chaque cas ainsi que l'accepteur final d'électrons. En déduire le type de nitrate réductase chez ce micro-organisme. Justifier.
- Q8.** Rappeler le principe de la recherche de la réduction des sulfates. Indiquer le(s) type(s) de métabolisme(s) mis en évidence par cette recherche.
- Q9.** Indiquer les raisons d'une non métabolisation du lactose par une bactérie.

## **2. EXPLORATION DU MÉTABOLISME FERMENTATIF**

### **2.1. DIFFÉRENCIATION DU TYPE FERMENTATIF D'ENTÉROBACTÉRIES**

#### **2.1.1. MANIPULATIONS**

À partir de la souche « E + numéro » présentée en bouillon :

- Ensemencer un bouillon Clark & Lubs.
- Incuber 24 à 48 heures à 37°C.
- Réaliser le(s) test(s) complémentaire(s) (si nécessaire) et lire le(s) résultat(s) obtenu(s).

#### **2.1.2. COMPTE RENDU**

- Q10.** Rappeler les caractères distinctifs d'un métabolisme respiratoire et d'un métabolisme fermentatif.
- Q11.** Donner l'intérêt de la dernière étape des fermentations.
- Q12.** Déduire des résultats expérimentaux le(s) type(s) de fermentation rencontré(s) chez la souche E. Justifier.

## **2.2. DIFFÉRENCIATION DE TYPES FERMENTATIFS CHEZ *Lactobacillus***

### **2.2.1. MANIPULATIONS**

À partir de la souche « L + numéro » présentée en bouillon MRS :

- Ensemencer un bouillon MRS + cloche de Durham.
- Incuber pendant 2 à 7 jours à 30°C.
- Réaliser le(s) test(s) complémentaire(s) (si nécessaire) et lire le(s) résultat(s) obtenu(s).

### **2.2.2. COMPTE RENDU**

- Q13.** Établir les bilans moléculaire et énergétique de la fermentation homolactique et de la fermentation hétérolactique. On suppose dans les deux cas que le substrat de départ est une molécule de glucose.
- Q14.** Les lactobacilles peuvent fermenter le glucose grâce à la fermentation lactique homofermentaire (ou homolactique) ou hétérofermentaire (ou hétérolactique).  
Comment distinguer ces deux cas de figure avec la technique utilisée ? Justifier.  
Conclure pour la souche L.

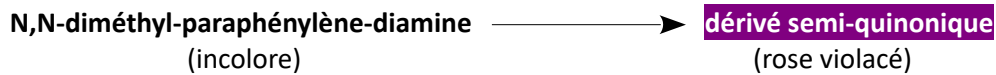
**TP MGM : ÉTUDE DES MÉTABOLISMES RESPIRATOIRES ET FERMENTATIFS****DOSSIER SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE**

- Fiche n°1 : Recherche de l'oxydase
- Fiche n°2 : Chaînes respiratoires des bactéries Oxydase + et Oxydase -
- Fiche n°3 : Gélose Viande-Foie
- Fiche n°4 : Milieu Hugh & Leifson
- Fiche n°5 : Mise en évidence de la nitrate réductase
- Fiche n°6 : Détermination du type de nitrate réductase
- Fiche n°7 : Milieu Hajna-Kligler
- Fiche n°8 : Recherche de la  $\beta$ -galactosidase - Test à l'oNPG
- Fiche n°9 : Vue d'ensemble de certaines fermentations bactériennes
- Fiche n°10 : Bouillon Clark & Lubs
- Fiche n°11 : Fermentations homo et hétérolactiques
- Fiche n°12 : Milieu MRS (Man-Rogosa-Sharpe) et différenciation des fermentations homo et hétérolactiques

## FICHE N°1 : RECHERCHE DE L'OXYDASE

### 1. PRINCIPE ET INTÉRÊT DE LA MISE EN ÉVIDENCE DE L'OXYDASE

Le terme d'oxydase ne désigne pas véritablement une enzyme particulière mais la **capacité que possède une souche bactérienne à oxyder la N,N-diméthyl-paraphénylène-diamine réduite** et incolore en un dérivé semi-quinonique rose violacé.



La recherche de l'oxydase présente un intérêt dans la classification et la taxonomie des **bactéries Gram -** :

- **Bacille Gram -**, **Oxydase +** : genres *Pseudomonas* et genres apparentés, famille des *Vibrionaceae* sauf le genre *Vibrio*, genre *Alcalingenes*, etc...
- **Bacille Gram -**, **Oxydase -** : famille *Enterobacteriaceae* (entérobactéries), genres *Acinetobacter* et *Xanthomonas*.
- **Bacilles Gram -**, **Oxydase + ou - selon les souches** : les genres *Brucella*, *Actinobacillus* et *Haemophilus*.

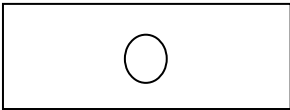
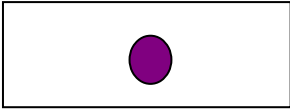
### 2. RÉACTIF UTILISÉ

N,N-diméthyl-paraphénylène-diamine sous différentes formes (solution, disques imprégnés, bâtonnets imprégnés).

### 3. TECHNIQUE

- ➔ Sur une lame propre et sèche, déposer à l'aide de pince flambée, un disque pour la recherche d'oxydase.
- ➔ Humidifier le disque avec une goutte de la solution stérile de N,N-diméthyl-paraphénylène-diamine (DMPPDA). Veiller à ne pas mettre trop de liquide, et évier de déborder.
- ➔ Avec une pipette Pasteur boutonnée stérile (**pas l'anse !!!**), prélever des bactéries sur un milieu solide et les déposer (les "écraser") sur le disque.
- ➔ Attendre quelques secondes pour lire le résultat.

### 4. LECTURE DES RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

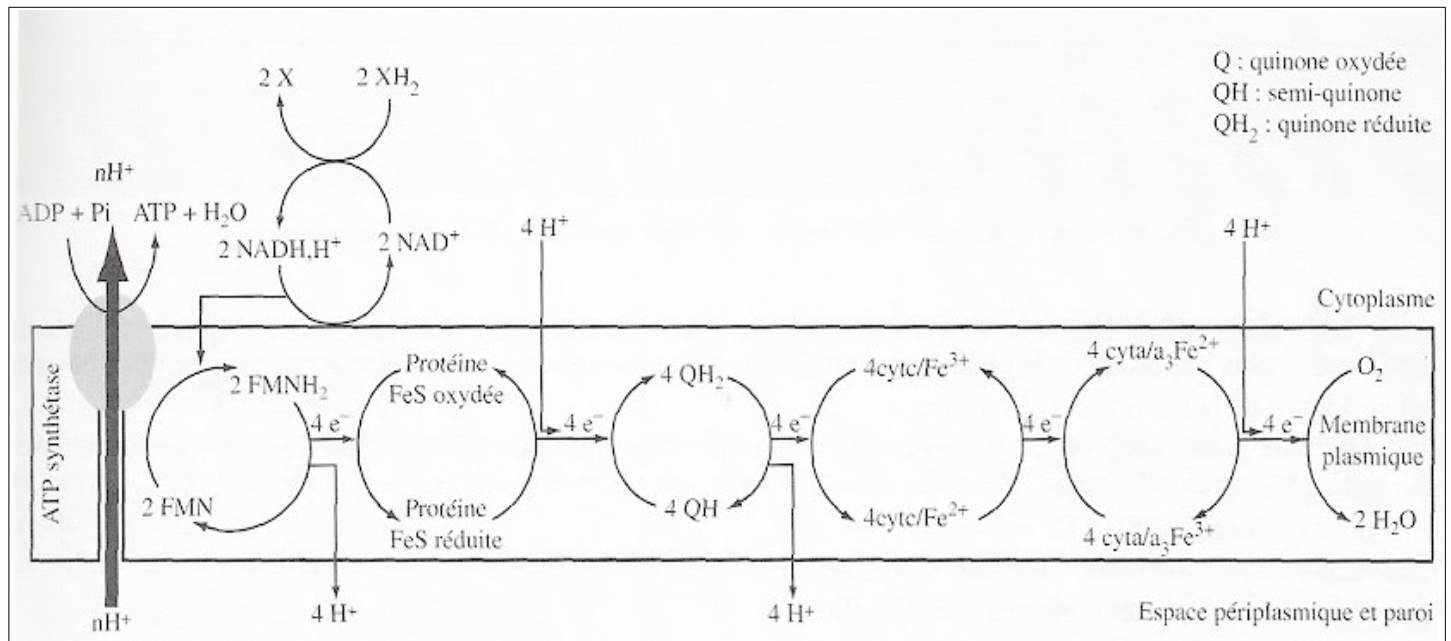
OBSERVATION	INTERPRÉTATION
 <p>La couleur du disque, au niveau du dépôt des bactéries, est inchangée.</p>	<p>La souche bactérienne est incapable d'oxyder la N,N-diméthyl-paraphénylène-diamine réduite en un dérivé semi-quinonique</p> <p style="text-align: center;">➔ <b>Souche Oxydase -</b></p>
 <p>Le disque devient rose foncé puis violet au niveau du dépôt des bactéries.</p>	<p>La souche bactérienne est capable d'oxyder la N,N-diméthyl-paraphénylène-diamine réduite en un dérivé semi-quinonique</p> <p style="text-align: center;">➔ <b>Souche Oxydase +</b></p>

### 5. CAUSES D'ERREURS

- Prélèvement des bactéries sur un milieu contenant un sucre fermentescible.
- Quantité insuffisante de bactéries.
- Humidification trop importante du disque entraînant une élimination du réactif (oxydase faussement négative).
- Réactif périmé (le tester avec une souche oxydase + et une souche oxydase -).
- Utilisation d'un instrument oxydase + (anses métalliques).
- Lecture trop tardive : au-delà de 30 s. Si la réaction est positive après 10 secondes, rendre oxydase lente.

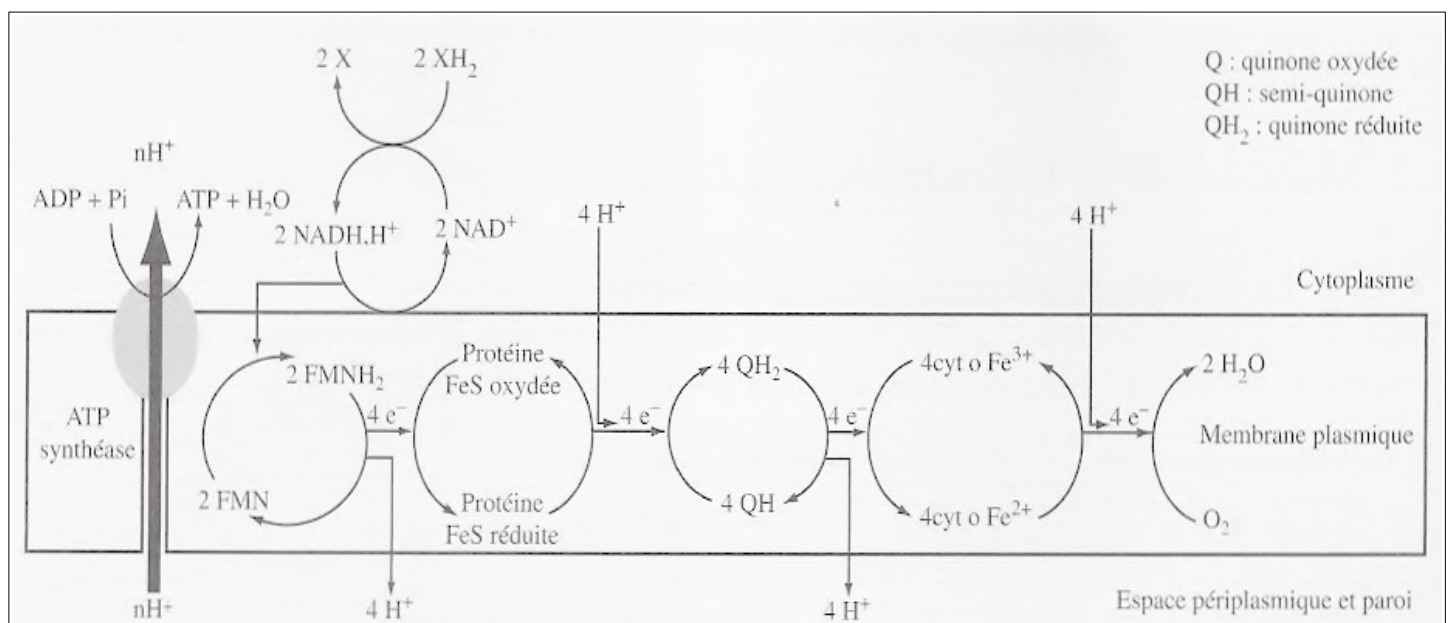
## FICHE N°2 : CHAÎNES RESPIRATOIRES DES BACTÉRIES OXYDASE + ET OXYDASE -

### 1. CHAÎNE RESPIRATOIRE DE BACTÉRIES OXYDASE +



Le potentiel rédox standard du couple Cyt c<sub>ox</sub>/Cyt c<sub>red</sub> est proche de celui de DMPPDA<sub>ox</sub>/DMPPDA<sub>red</sub>.  
 (DMPPDA = N,N-diméthyl-paraphénylène-diamine)

### 2. CHAÎNE RESPIRATOIRE DE BACTÉRIES OXYDASE -



## FICHE N°3 : GÉLOSE VIANDE-FOIE

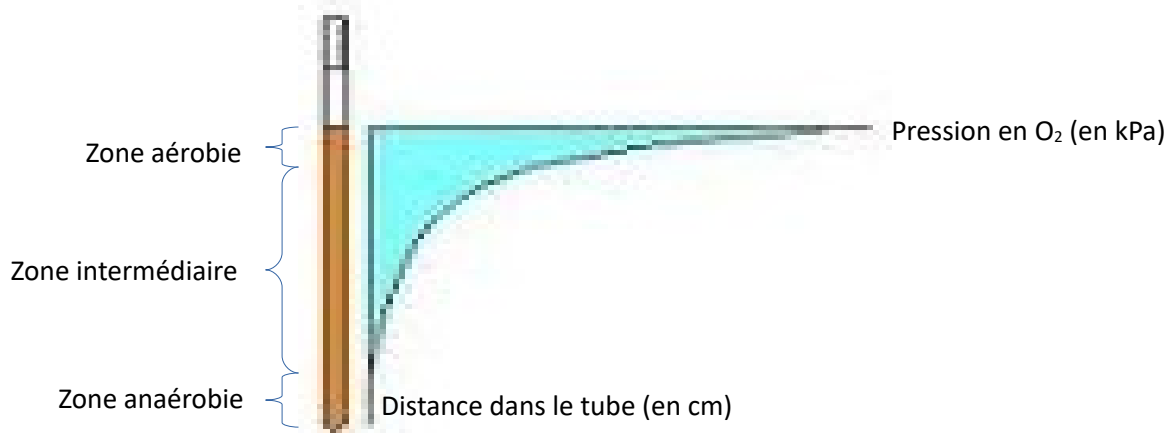
Le type respiratoire décrit le rapport de la souche bactérienne vis-à-vis du dioxygène ( $O_2$ ) :

- certaines souches bactériennes **exigent sa présence** : elles sont **aérobies strictes**.
- certaines souches bactériennes **exigent son absence** : elles sont **anaérobies strictes**.
- Certaines souches bactériennes sont **indifférentes** : elles sont **aéro-anaérobies**.

### 1. PRINCIPE DE LA DÉTERMINATION DU TYPE RESPIRATOIRE

La **gélose Viande-Foie (VF)**, du fait de sa composition et de son conditionnement, présente deux zones différentes dans lesquelles la composition en oxygène n'est pas la même :

- une **zone aérobie** : présence d' $O_2$  (quelques millimètres en haut du tube).
- une **zone anaérobie** : absence d' $O_2$  (le culot du tube).



Les bactéries, en fonction de leur type respiratoire, vont se développer dans une zone ou dans les deux.

### 2. COMPOSITION DE LA GÉLOSE VIANDE-FOIE

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Base Viande-Foie	30,0 g.L <sup>-1</sup>	Source d'acides aminés et de vitamines
Glucose	2,0 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'énergie
Agar	6,0 g.L <sup>-1</sup>	Solidication
Eau	qsp 1 L	Hydratation
pH ≈ 7,4		

### 3. PRÉPARATION DE LA GÉLOSE VIANDE-FOIE

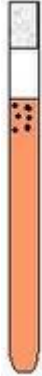



- ➔ Régénérer 10 minutes au bain marie bouillant (pour éliminer l'oxygène), puis laisser refroidir jusqu'à 45°C.
- ➔ Maintenir en surfusion (45°C) jusqu'à utilisation.

### 4. ENSEMENCEMENT DE LA GÉLOSE VIANDE-FOIE

- ➔ Ensemencer le milieu en surfusion (liquide mais refroidi) à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et chargée en bactéries, en « piquant » jusqu'au fond du tube.
- ➔ Remonter lentement la pipette Pasteur en décrivant des mouvements de spirales jusqu'en haut du tube.
- ➔ Refroidir immédiatement.
- ➔ Ne pas visser totalement le bouchon, et incuber.



**5. LECTURE DES RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION**

OBSERVATION	INTERPRÉTATION
 <p>Culture sur quelques millimètres en haut du tube</p>	<p>La souche bactérienne ne cultive qu'en présence d'O<sub>2</sub>.</p> <p>→ <b>Souche aérobie stricte</b></p>
 <p>Culture uniquement au fond du tube</p>	<p>La souche bactérienne ne cultive qu'en absence d'O<sub>2</sub>.</p> <p>→ <b>Souche anaérobie stricte</b></p>
 <p>Culture sur toute la hauteur du tube</p>	<p>La souche bactérienne cultive aussi bien en présence qu'en absence d'O<sub>2</sub>.</p> <p>→ <b>Souche aéro-anaérobie</b></p>
 <p>Culture uniquement dans une zone intermédiaire supérieure du tube</p>	<p>La souche bactérienne cultive en présence d'O<sub>2</sub> mais avec des pressions faibles.</p> <p>→ <b>Souche micro-aérophile</b></p>

La présence de « bulles » dans la gélose après incubation indique que la souche bactérienne est **productrice de gaz en présence de glucose**.

## FICHE N°4 : MILIEU HUGH & LEIFSON

### 1. BUT ET PRINCIPE

Le milieu Hugh & Leifson est utilisé pour **déterminer la voie d'attaque du glucose** d'une souche bactérienne. L'**utilisation du glucose** par les bactéries est visualisée grâce à la présence d'un indicateur coloré de pH : le **bleu de bromothymol**.

### 2. COMPOSITION DU MILIEU HUGH & LEIFSON

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Tryptone	2 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'azote organiques
Bleu de bromothymol	30 mg.L <sup>-1</sup>	Indicateur coloré de pH
Chlorure de sodium	5 g.L <sup>-1</sup>	- Source d'ions minéraux
Hydrogénophosphate de potassium	0,3 g.L <sup>-1</sup>	- Équilibre électrique et osmotique
Glucose	1 %	Source de carbone et d'énergie
Agar	2,5 g.L <sup>-1</sup>	solidification
Eau	qsp 1L	Hydratation

### 3. PRÉPARATION DU MILIEU HUGH & LEIFSON


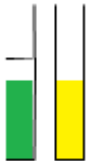
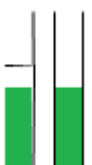
Régénérer le milieu 10 minutes au bain-marie bouillant (élimination de l'O<sub>2</sub> dissous).

Si le milieu ne contient pas le glucose, l'ajouter stérilement dans le milieu encore liquide de façon à avoir une concentration finale à 1 %.

### 4. ENSEMENCEMENT DU MILIEU HUGH & LEIFSON

- Ensemencer à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée par piqûre centrale et remonter en spires.
- Ensemencer un tube en aérobiose et un tube en anaérobiose (utilisation d'huile de paraffine).
- Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

### 5. LECTURE DES RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

OBSERVATION	INTERPRÉTATION
 <p>Tube en anaérobiose : jaune Tube en aérobiose : jaune</p>	<p>La souche bactérienne utilise le glucose en présence et en absence de O<sub>2</sub>. Il y a production importante d'acides.</p> <p style="text-align: center;"><b>→ Voie d'attaque du glucose fermentative</b></p>
 <p>Tube en anaérobiose : vert Tube en aérobiose : jaune (en surface)</p>	<p>La souche bactérienne utilise le glucose en présence de O<sub>2</sub>. Il y a une faible production d'acide (pas de diffusion dans la totalité du tube).</p> <p style="text-align: center;"><b>→ Voie d'attaque du glucose oxydative</b></p>
 <p>Tube en anaérobiose : vert Tube en aérobiose : vert / bleu-vert</p>	<p>La souche bactérie n'utilise pas le glucose, d'où l'absence d'acidification. En présence d'O<sub>2</sub>, elle peut se développer aux dépens des peptones, d'où l'alcalinisation à la surface de la gélose.</p> <p style="text-align: center;"><b>→ Souche inerte vis-à-vis du glucose</b></p>

## FICHE N°5 : MISE EN ÉVIDENCE DE LA NITRATE-RÉDUCTASE

### 1. PRINCIPE DE LA MISE EN ÉVIDENCE DE LA NITRATE-RÉDUCTASE

La Nitrate-Réductase est une enzyme qui catalyse la **réduction des nitrates  $\text{NO}_3^-$  en nitrites  $\text{NO}_2^-$** .

Ces derniers peuvent être réduits en **diazote  $\text{N}_2$**  dans le cas de la Nitrate-Réductase A (NR-A) qui intervient dans la **respiration nitrate**.



L'étude de la réduction des nitrates par la Nitrate-Réductase utilise un milieu de culture **contenant des nitrates**, type **bouillon nitraté**. Le milieu doit permettre des conditions d'anaérobiose car la synthèse de l'enzyme est réprimée par l'oxygène.

Cette étude consiste à **mettre en évidence le métabolite nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )** ou la **disparition des nitrates initiaux ( $\text{NO}_3^-$ )**

### 2. RÉACTIFS UTILISÉS

On utilise le **réactif de Griess** qui est constitué de deux solutions qui sont respectivement :

- Solution d'**acide parasulfanilique** en milieu acétique (NIT 1).
- Solution de **diméthyl- $\alpha$ -naphtylamine** en milieu acétique (NIT 2).

Ce réactif met en évidence la **présence de nitrites** par une **coloration rouge**.

On utilise également, selon le résultat obtenu avec le réactif de Griess, de la **poudre de zinc**, qui permet la **réduction des nitrates en nitrites**.

### 3. TECHNIQUE

- ➔ À partir d'un milieu nitraté ensemencé et étuvé, ajouter 2 gouttes des réactifs NIT 1 et NIT 2.
- ➔ Observer l'apparition d'une coloration rouge. Sinon, additionner de la poudre de zinc (une pointe de spatule).

### 4. LECTURE DES RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

Lire après addition de la solution d'acide parasulfanilique et de la solution de diméthyl- $\alpha$ -naphtylamine :

- le milieu est **rouge** : il y a présence de nitrites provenant de la réduction des nitrates par la souche bactérienne  
→ **Souche Nitrate-Réductase + au stade nitrite.**
- le milieu n'est **pas rouge** (incolore ou jaunâtre) : **absence de nitrites.**

- Le milieu est **jaune** :

Pas de nitrites donc le zinc n'a pas réduit les nitrates en nitrites : il n'y avait donc plus de nitrates dans le milieu. La souche bactérienne les a donc réduits en diazote ( $\text{N}_2$ ).

→ **Souche Nitrate-Réductase + au stade diazote**

Ajout de poudre de zinc  
↓

- Le milieu est **rouge** :

Présence de nitrites, donc le zinc a réduit les nitrates qui étaient présents dans le milieu. La souche bactérienne n'a pas réduit les nitrates du milieu.

**Souche Nitrate-Réductase -**

### 5. CAUSES D'ERREURS

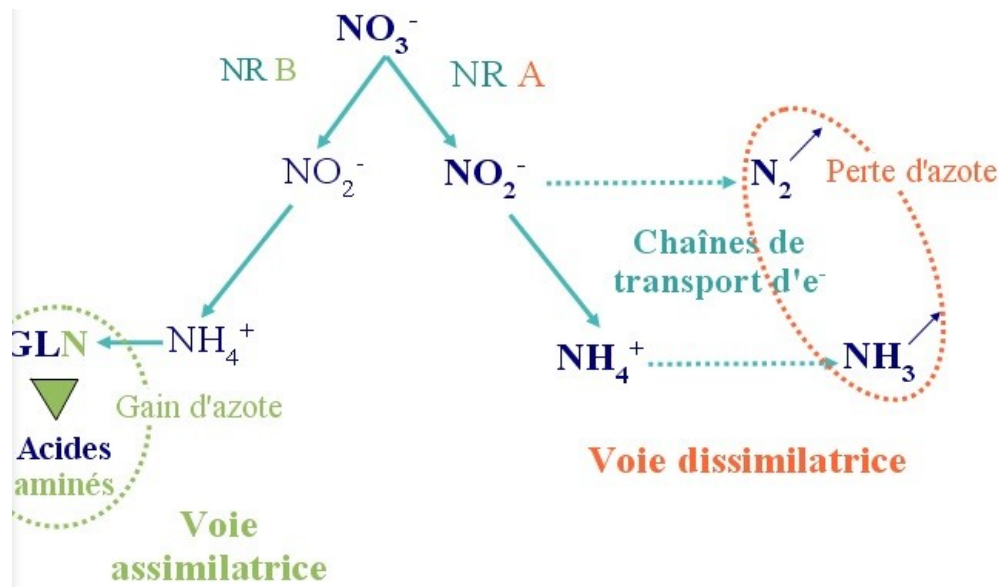
- Utilisation de milieu ne contenant pas de nitrates.
- Réalisation du test à partir d'un milieu glucidique, un glucide ayant été dégradé une fermentation peut cacher une respiration nitrate (ce problème se pose sur la galerie API 20E)

## FICHE N°6 : DÉTERMINATION DU TYPE DE NITRATE RÉDUCTASE

### 1. PRINCIPE DE LA DÉTERMINATION DU TYPE DE NITRATE RÉDUCTASE

Il existe deux types de nitrate réductase utilisés à des fins différentes dans les cellules :

- une nitrate réductase assimilatrice, ou nitrate réductase B.
- une nitrate réductase dissimilatrice, ou nitrate réductase A.



Pour les bactéries à métabolisme fermentatif, on peut déterminer le type de nitrate réductase en milieu VF additionné de chlorate de potassium..

Pour les bactéries possédant une NR A, le chlorate est un substrat qu'elles réduisent en chlorite.

Il s'agit d'un sel toxique expliquant l'absence de culture dans la gélose VF + chlorate, excepté en surface où l'oxygène agit comme un inhibiteur de la NR. Quelquefois l'observation de quelques colonies isolées peut correspondre à des mutants sans NR de type A.

Pour les bactéries possédant une NR B, le chlorate n'est pas un substrat, d'où une culture normale (c'est-à-dire dans tout le tube puisque la bactérie a un métabolisme fermentatif).

### 2. MISE EN ÉVIDENCE DU TYPE DE NITRATE RÉDUCTASE

- Rechercher la présence d'une nitrate réductase par la technique classique à l'aide des réactifs de Griess dans un bouillon nitraté.
- Confection d'une gélose au chlorate de potassium : régénérer 1 gélose VF (qui sera notée VFC) et 1 gélose VF témoin (VFT) puis les ramener à la température de + 50°C environ.
- Ajouter stérilement 1 goutte de solution de chlorate de potassium  $\text{KClO}_3$  à 10 % dans la gélose VFC et dans la gélose témoin VFT.
- Refroidir immédiatement le tube témoin VFT.
- Ensemencer la gélose VFC (liquide mais refroidie) à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et chargée en bactéries, en « piquant » jusqu'au fond du tube.
- Remonter lentement la pipette Pasteur en décrivant des mouvements de spirales jusqu'en haut du tube.
- Refroidir immédiatement.
- Incuber les milieux à 37°C pendant 18 à 24 heures.

## FICHE N°7 : MILIEU HAJNA-KLIGLER

### 1. BUT ET PRINCIPE

Le milieu Hajna-Kligler est un milieu complexe qui permet la lecture directe de plusieurs caractères :

- l'**utilisation du glucose**, avec ou sans **production de gaz**.
- l'**utilisation du lactose**.
- La **production d'H<sub>2</sub>S**.

Ce milieu étant lactosé, il est possible de procéder à la **recherche de la  $\beta$ -galactosidase** à partir des colonies obtenues sur la pente.

Ce milieu est intéressant pour l'identification rapides des bacilles gram - cultivant en anaérobiose.

### 2. COMPOSITION DU MILIEU HAJNA-KLIGLER

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptones	15 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'azote organiques
Peptone pepsique de viande	5 g.L <sup>-1</sup>	- Source d'acides aminés et de vitamines - Source de facteurs de croissance
Extrait de viande	3 g.L <sup>-1</sup>	Source de facteurs de croissance
Extrait de levure	3 g.L <sup>-1</sup>	
Glucose	1 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'énergie (en faible quantité)
Lactose	10 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'énergie (en quantité normale)
Rouge de phénol	0,024 g.L <sup>-1</sup>	Indicateur coloré de pH
Chlorure de sodium	5 g.L <sup>-1</sup>	- Source d'ions minéraux - Équilibre électrique et osmotique
Thiosulfate de sodium	0,3 g.L <sup>-1</sup>	Précurseur de H <sub>2</sub> S
Citrate de fer III	0,2 g.L <sup>-1</sup>	Révéléateur de H <sub>2</sub> S
Agar	11 g.L <sup>-1</sup>	Solidification
Eau	qsp 1L	Hydratation

La couleur du milieu est brun rougeâtre.

### 3. ENSEMENCEMENT DU MILIEU HAJNA-KLIGLER

- ➔ Ensemencer la pente en déposant une goutte de suspension en haut (inondation) (ou par des stries serrées).
- ➔ Ensemencer le culot par piqûre centrale à la pipette Pasteur boutonnée.
- ➔ Incuber le tube 24 heures à 37°C. **Ne pas serrer le bouchon.**

#### 4. LECTURE DES RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

La lecture se fait en 3 temps :

– **Observation du culot :**

Le culot est une zone pratiquement **anaérobie**.

On y lira la **fermentation du glucose**.

– **Observation de la pente :**

La pente est une zone **aérobie**.

On y lira l'**utilisation du lactose**.

L'utilisation des glucides s'y fait par oxydation, avec faible acidification, seule l'utilisation du lactose permet une acidification de la pente sur une période de 24 heures. Si la souche bactérienne n'utilise que le glucose, il est vite épuisé sur la pente (faible quantité) et la croissance bactérienne se fait au dépens des peptones avec réalcalinisation rapide.

– **Observation de la jonction culot-pente :**

On y lira la **production de gaz** et la **production d'H<sub>2</sub>S**.

ZONE DU TUBE	CARACTÈRE RECHERCHÉ	OBSERVATION	INTERPRÉTATION
Culot (anaérobiose)	Fermentation du glucose	Couleur inchangée	Pas d'acidification du milieu, donc absence d'utilisation du glucose par fermentations. <b>→ Souche Glucose -</b>
		Couleur <b>jaune</b>	Le pH du milieu est acide, donc le glucose a été fermenté (libération de nombreux acides) <b>→ Souche Glucose + (par fermentation)</b>
Pente (aérobiose)	Utilisation du lactose	Couleur <b>rose</b>	Le pH alcalin du milieu est dû à l'utilisation des peptones. Le glucose a été utilisé dans un premier temps, mais il a été épuisé dans le milieu. Le lactose ne peut être utilisé, la croissance bactérienne se poursuit au dépens des peptones. <b>→ Souche Lactose -</b>
		Couleur <b>jaune</b>	Le pH du milieu est acide. Le glucose, en petite quantité dans le milieu, est utilisé dans un premier temps, puis la croissance des bactéries se poursuit grâce à l'utilisation du lactose. <b>→ Souche Lactose +</b>
Culot ou jonction culot-pente	Gaz en glucose	Absence de bulles	Pas de production de gaz. <b>→ Souche gaz en glucose -</b>
		Présence de bulles	La production de gaz lors de la fermentation du glucose provoque une fragmentation de la gélose. <b>→ Souche gaz en glucose +</b>
	Production de H <sub>2</sub> S	Pas de précipité noir	Absence d'un précipité de sulfure de fer FeS <b>→ Souche H<sub>2</sub>S -</b>
		<b>Précipité noir</b>	Présence d'un précipité de sulfure de fer FeS <b>→ Souche H<sub>2</sub>S +</b>

**Remarque :**

Pour une **pente rouge**, donc **lactose -**, il est nécessaire de **réaliser un test ONPG** pour détecter la présence éventuelle d'une β-galactosidase. Le prélèvement pour faire la suspension dense du test ONPG peut être fait sur la pente. 2/2

## FICHE N°8 : RECHERCHE DE LA $\beta$ -GALACTOSIDASE - TEST À L'ONPG

### 1. BUT

Ce test consiste à rechercher un groupe d'enzymes particulières : les **ONPG-hydrolases**.

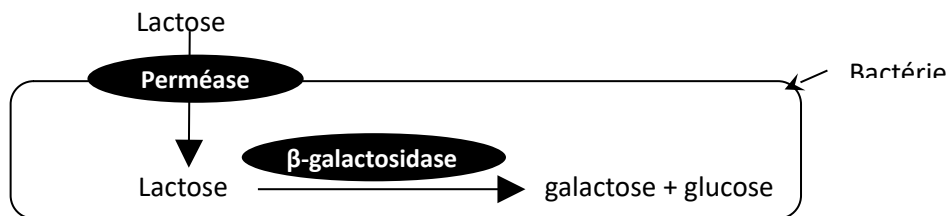
Ce test a un grand intérêt diagnostique pour l'étude des **entérobactéries**, du genre *Vibrionaceae*, des **bacilles Gram - aérobies stricts**, et d'autres germes comme ceux du genre *Neisseria*.

### 2. PRINCIPE

La recherche de cette enzyme est réalisée **chez les bactéries "glucose +" mais apparaissant "lactose -"** (c'est à dire ne fermentant pas le lactose ou le fermentant tardivement).

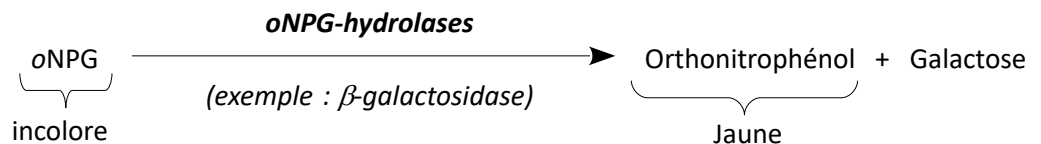
En effet, pour fermenter le lactose, la bactérie doit posséder deux enzymes :

- ✓ une **perméase**, qui permet l'entrée du lactose dans la bactérie.
- ✓ une  **$\beta$ -galactosidase**, qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose directement assimilables par la cellule bactérienne.



On veut donc distinguer chez une bactérie si le caractère "lactose -" est dû à une absence de perméase, ou à une absence de  $\beta$ -galactosidase.

La  **$\beta$ -galactosidase** est une enzyme appartenant à la famille des **ONPG-hydrolases**. Ces enzymes catalysent la réaction d'hydrolyse d'un substrat synthétique : l'**ONPG (ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside)**.



### 3. TECHNIQUE

- ➔ Faire une **suspension très dense** (laiteuse) à l'aide de **culture prélevée sur un milieu solide lactosé** (exemple : milieu Hajna-Kligler) dans 0,5 mL d'eau physiologique stérile.
- ➔ Ajouter un disque d'ONPG.
- ➔ Incuber à 37°C pendant 30 minutes (éventuellement 1 heure, 6 heures et 24 heures).

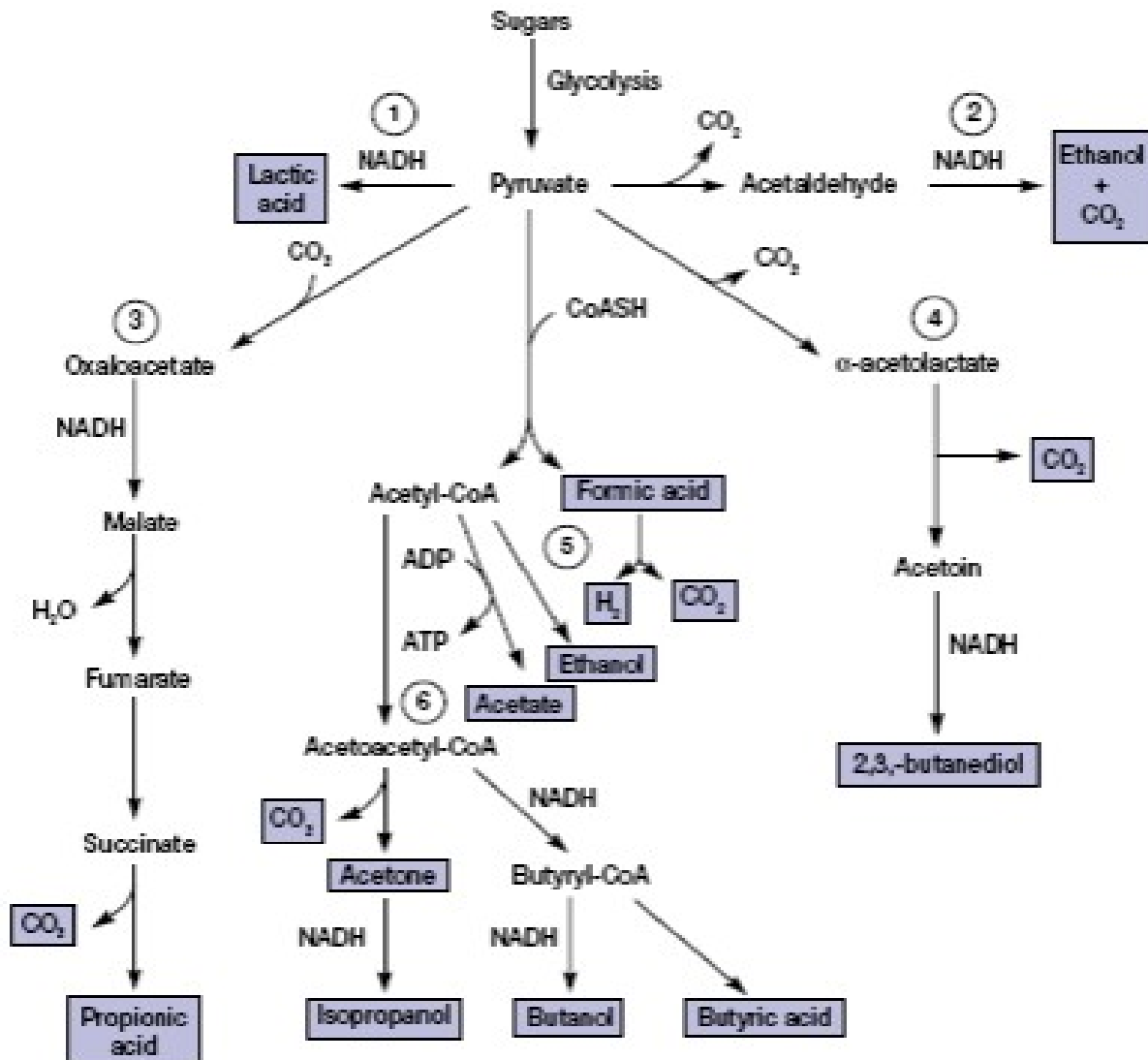
### 4. LECTURE DES RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

OBSERVATION	INTERPRÉTATION
Suspension <b>jaune</b>	- Présence d'orthonitrophénol suite à l'hydrolyse de l'ONPG. - La souche possède une ONPG-hydrolase. ➔ <b>Souche ONPG + (perméase -)</b>
Suspension incolore	- Pas d'orthonitrophénol, donc pas d'hydrolyse de l'ONPG. - La souche ne possède pas d'ONPG-hydrolase. ➔ <b>Souche ONPG -</b>

#### Remarque :

Les ONPG- hydrolases sont des enzymes **inductibles** (c'est à dire qu'elles sont synthétisées qu'en présence de lactose), d'où la nécessité de travailler avec **une culture prélevée sur milieu lactosé**.

## FICHE N°9 : VUE D'ENSEMBLE DE CERTAINES FERMENTATIONS BACTÉRIENNES



1. Lactic acid fermentation. Lactic acid bacteria (*Streptococcus*, *Lactobacillus*).
2. Alcoholic fermentation. *Zymomonas*, *Saccharomyces*.
3. Propionic acid fermentation. Propionic acid bacteria (*Propionibacterium*).
4. 2,3,-butanediol fermentation. *Enterobacter*, *Serratia*, *Bacillus*.
5. Mixed acid fermentation. Enteric bacteria (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Proteus*).
6. Butyric acid fermentation. *Clostridium*.

Les produits finaux des fermentations sont encadrés.



**FICHE N°10 : BOUILLON CLARK & LUBS****1. BUT ET PRINCIPE**

Il s'agit de différencier les bactéries fermentant le glucose par la **voie des acides mixtes** et celles le fermentant par la **voie du butanediol**, grâce à deux tests :

- ✓ la **réaction au rouge de méthyle (RM)**
- ✓ la **réaction de Vosges - Proskauer (VP)**

Ces deux tests sont généralement effectués sur le même milieu : le **bouillon de Clark et Lubs**.

**2. COMPOSITION DU BOUILLON CLARK ET LUBS**

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Peptone	5 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'azote organiques
Glucose	5 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'énergie
Hydrogénophosphate de potassium	5 g.L <sup>-1</sup>	- Source d'ions minéraux - Équilibre électrique et osmotique
Eau	qsp 1L	Hydratation

**3. ENSEMENCEMENT DU BOUILLON CLARK ET LUBS**

- Ensemencer le bouillon avec 1 à 2 gouttes d'une suspension bactérienne d'opacité 0,5 Mac Farland.
- Incuber à 37°C pendant 48 heures.
- Ne **pas serrer** le bouchon à fond.



**4. RÉALISATION DES TESTS ET LECTURE ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS****4.1. RÉACTION AU ROUGE DE MÉTHYLE (RM)****4.1.1. PRINCIPE DU TEST**

Lorsque les bactéries réalisent la **fermentation acide mixte**, le pH du milieu après 48 heures de culture est **très acide**. Le **rouge de méthyle**, qui est un indicateur coloré de pH, dont la zone de virage se situe entre 4,2 et 6,3, permet de mettre en évidence cette acidification importante.

**4.1.2. TECHNIQUE**

- Transférer 2 mL de bouillon Clark & Lubs de **48 heures** dans un tube à hémolyse stérile.
- Ajouter **1 à 2 gouttes de rouge de méthyle**.
- Observer.

### 4.1.3. RÉSULTATS

OBSERVATION	INTERPRÉTATION
 Coloration rouge	Milieu relativement <b>acide</b> à cause de la production d'acides organiques forts par la souche bactérienne.  → Souche RM +
 Coloration jaune-orangée	Milieu relativement <b>basique</b> donc la souche bactérienne a produit des acides organiques relativement faibles et du CO <sub>2</sub> .  → Souche RM -

Causes d'erreur : durée d'incubation insuffisante

## 4.2. RÉACTION DE VOSGES-PROSKAUER (VP)



### 4.2.1. PRINCIPE DU TEST

Lorsque les bactéries possèdent la **fermentation butanediolique**, elles produisent de l'**acétoïne**, molécule qui donne en présence d'une **base forte** et d'**α-naphtol**, une **coloration rouge** en milieu très **oxygéné**.

### 4.2.2. TECHNIQUE

- Transférer 1 mL de bouillon de Clark & Lubs dans un tube à hémolyse stérile.
- Ajouter : **0,5 mL d'α-naphtol + 0,5 mL de soude à 4 mmol.L<sup>-1</sup>**.
- Agiter.
- Incliner le tube.
- Attendre 15 minutes.
- Observer.

### 4.1.3. RÉSULTATS

OBSERVATION	INTERPRÉTATION
 Coloration rouge	Présence d'acétoïne. La souche bactérienne réalise la fermentation butanediolique.  → Souche VP +
 Coloration jaune ou rose pâle	Absence d'acétoïne. La souche bactérienne ne réalise pas la fermentation butanediolique.  → Souche VP -

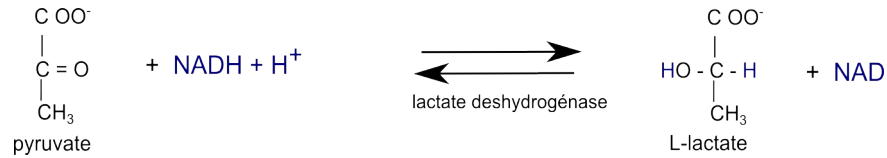
Causes d'erreur :

- durée d'incubation trop courte.
- erreur de milieu (bouillon nutritif non glucosé par exemple).
- température d'incubation inadaptée à la bactérie.

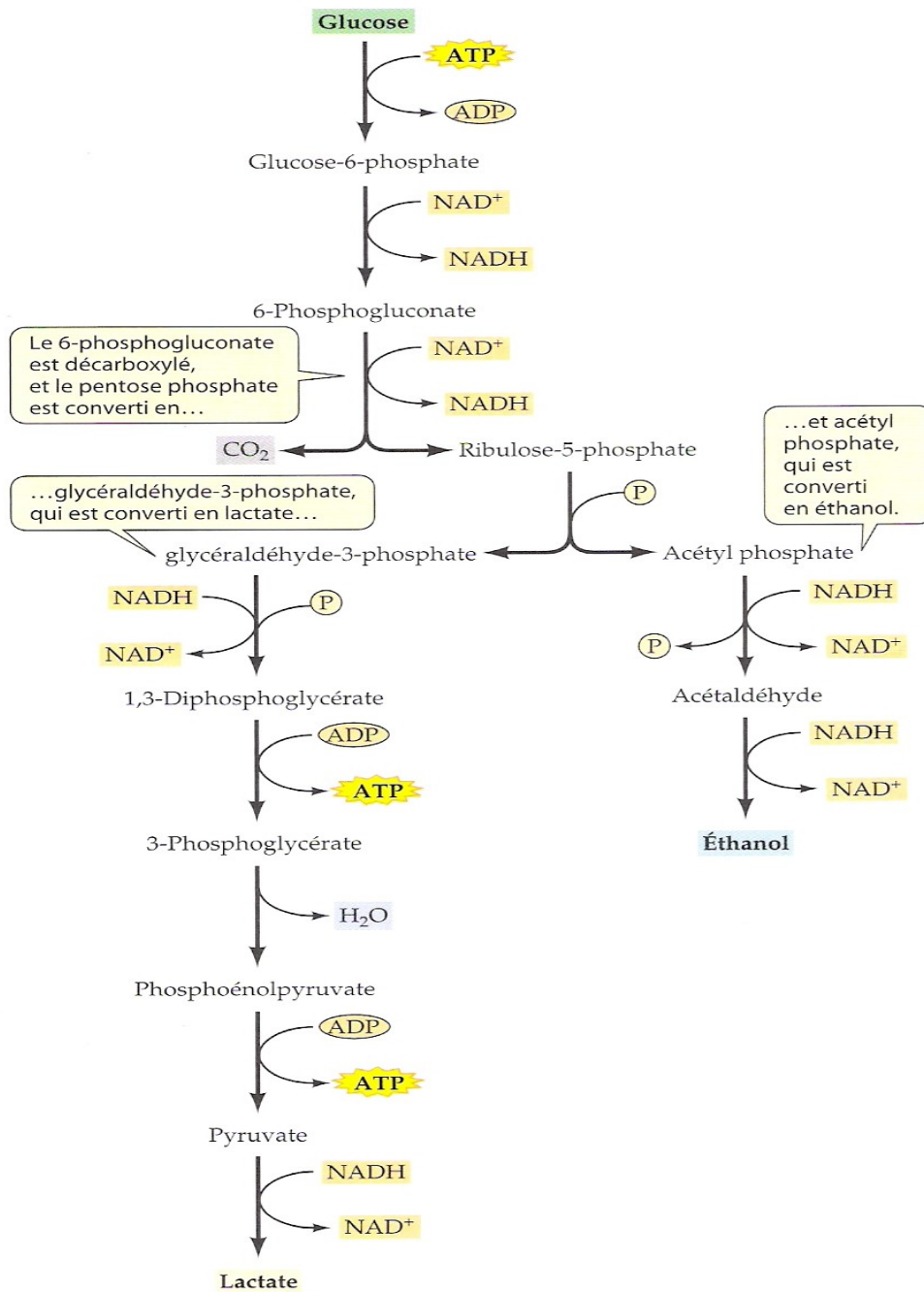
## FICHE N°11 : FERMENTATIONS HOMO ET HÉTÉROLACTIQUES

### 1. FERMENTATION HOMOLACTIQUE

Le pyruvate est issu de la glycolyse du glucose :



### 2. FERMENTATION HÉTÉROLACTIQUE



Les produits finaux de la fermentation hétérolactique sont : CO<sub>2</sub>, éthanol et lactate.

## FICHE N°12 : MILIEU MRS (MAN-ROGOSA-SHARPE) ET DIFFÉRENCIATION DES FERMENTATIONS HOMO ET HÉTÉROLACTIQUES

### 1. BUT ET RINCIPE DU MILIEU MRS

Le milieu MRS (Man-Rogosa-Sharpe) est un **milieu de culture pour les *Lactobacillus***. Il s'agit d'un **milieu complexe** apportant les éléments nutritifs indispensables à leur multiplication (germe exigeant).

Ce milieu est utilisé pour le **dénombrement et l'isolement des lactobacilles** à partir des produits laitiers et autres aliments. Il sert également au repiquage des souches.

### 2. COMPOSITION DU MILIEU MRS

CONSTITUANTS	CONCENTRATIONS	RÔLES
Polypeptones	10 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'azote organiques
Extrait de viande	10 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'azote organiques, de minéraux
Extrait de levure	5 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'azote organiques, de minéraux et de facteurs de croissance
Glucose	20 g.L <sup>-1</sup>	Source de carbone et d'énergie
Tween 80	1,08 g.L <sup>-1</sup>	Source d'acides gras
Phosphate dipotassique	2 g.L <sup>-1</sup>	Équilibre ionique et osmotique, source de phosphore et de potassium
Acétate de sodium	5 g.L <sup>-1</sup>	Inhibiteurs de germes autres que <i>Lactobacillus</i>
Citrate d'ammonium	2 g.L <sup>-1</sup>	
Sulfate de magnésium	0,05 g.L <sup>-1</sup>	Source de soufre et de magnésium
Sulfate de manganèse	0,05 g.L <sup>-1</sup>	Source de soufre et de manganèse
(Agar)	(15 g.L <sup>-1</sup> )	(Solidification)
Eau	qsp 1L	Hydratation
pH 5,4		Sélection des souches acidophiles

### 4. UTILISATION DU MILIEU MRS

Le milieu, une foisensemencé est mis à incuber en **atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> à 30°C pendant 24 à 48 heures**.

### 5. LECTURE DU MILIEU MRS

Sur ce milieu, les colonies apparaissent petites (0,5 à 1 mm de diamètre) avec des contours plus ou moins réguliers, incolore ou de couleur blanchâtre.

Si le milieu est liquide (bouillon MRS), on observe, après incubation, une opacité importante du milieu.

### 6. TEST DE DIFFÉRENCIATION DES FERMENTATIONS HOMO ET HÉTÉROLACTIQUES

Les espèces de *Lactobacillus* hétérofermentaires libèrent, contrairement aux espèces homofermentaires, du dioxyde de carbone CO<sub>2</sub> lors de la fermentation du glucose.

La mise en évidence de ce gaz caractérise la fermentation hétérolactique.

## 6.1. PRINCIPE DU TEST DE DIFFÉRENCIATION DES FERMENTATION HOMO ET HÉTÉROLACTIQUES

La souche à étudier est mise en culture en bouillon adapté glucosé (bouillon MRS pour le genre *Lactobacillus*) et muni d'une **cloche de Durham**.

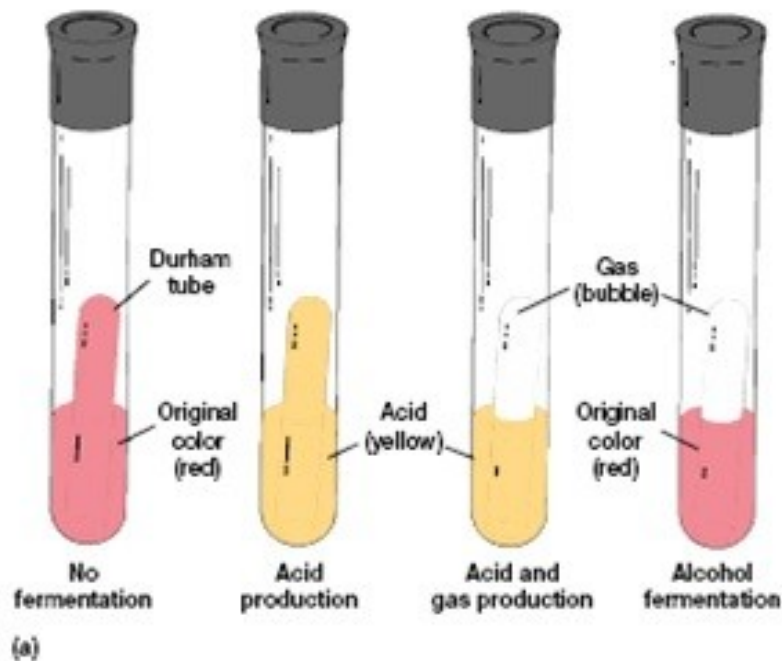
L'acidification du milieu sera mis en évidence par le virage de l'indicateur coloré de pH (si il est présent dans le milieu).

La production de gaz est mis en évidence par la présence d'une bulle dans la cloche de Durham.

## 6.2. MODE OPÉRATOIRE

- Vérifier la présence de bouillon dans le cloche de Durham.
- Ensemencer abondamment le tube.
- Incuber à 30°C pendant 2 à 7 jours.

## 6.3. LECTURE DU TEST DE DIFFÉRENCIATION DES FERMENTATIONS HOMO ET HÉTÉROLACTIQUES



Pour le milieu MRS et le genre *Lactobacillus*, on ne lit que la présence ou non de gaz dans la cloche de Durham