

Travaux pratique d'agents agent antimicrobien



ZENATI Fatima

Université ABOU BEKR
BELKAÏD

Faculté des SNV - STU

email : f_zenati@yahoo.com

1.0

27/2/2024

Table des matières

I - TP2 :Tests d'identification biochimique des bactéries	3
1. objectif spécifique	3
2. la galerie classique	4
2.1. <i>Étude du type respiratoire</i>	4
2.2. <i>Recherche de l'enzyme respiratoire</i>	5
2.3. <i>Le test IMVC</i>	5
2.4. <i>Tests complémentaires</i>	8
Bibliographie	9

I TP2 :Tests d'identification biochimique des bactéries

L'identification du genre et de l'espèce d'une souche bactérienne doit se poursuivre par la recherche de caractères biochimiques du métabolisme glucidique et protidique, en ensemençant une galerie d'identification : une "galerie" est un ensemble de milieux de culture, pouvant se présenter :

- soit en tubes (macro-galerie ou Galerie classique)
- soit en système miniaturisé (micro-galerie) <https://elearn.univ-tlemcen.dz/course/view.php?id=7381>

1. objectif spécifique

Fondamental

-
- Employer les caractères morphologiques, culturels et biochimiques pour orienter l'étude vers la famille des entérobactéries.
 - Réaliser l'ensemencement d'une galerie traditionnelle d'identification en tubes.
 - Traiter les résultats à l'aide des tableaux dichotomiques, identifier le genre voire l'espèce de la bactérie donnée.

2. la galerie classique

2.1. Étude du type respiratoire

principe

Mise en évidence du type respiratoire La détermination du type respiratoire (ou type énergétique) d'une bactérie consiste en la détermination du rapport qu'a cette bactérie avec l'oxygène(4) * (5).*

Méthode

- Régénérer pendant 20 minutes au bain d'eau bouillant
- Ensemencer, à l'aide d'une pipette Pasteur fermée et chargée en remontant en spirale dans la gélose
- Le tube doit être en surfusion (45 °C).
- Solidifier, puis mettre à l'étuve 24h à 37 °C.

Complément : Lecture

Après 24 heures d'incubation à 37°C, on observe à quel niveau du tube il y a eu culture :

- Des bactéries aérobies strictes : Bactéries ayant besoin d'oxygène pour leur respiration.
- Des bactéries anaérobies strictes : La présence de l'oxygène est toxique pour ces bactéries.
- Des bactéries aéro-anaérobies facultatives : La présence de l'oxygène est facultative, elles peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène.
- Des bactéries micro-aérophiles : Bactéries se développent sous une faible pression d'oxygène.
- Des bactéries anaérobies aéro-tolérantes : Bactéries se développent en absence d'oxygène mais elles tolèrent la présence de ce dernier dans le milieu.

Pour voir la vidéo cliquer *ici*

2.2. Recherche de l'enzyme respiratoire

2.2.1. Recherche Oxydase

principe

Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries Gram négative qui produisent cette enzyme.

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.

Méthode

Sur une lame propre et sèche, déposer dans un angle une goutte d'eau distillée. A l'aide de pince flambée, saisir un disque pour la recherche de l'oxydase, le réhydrater dans l'eau et le déposer au milieu de la lame. Veiller à ce que le liquide ne déborde pas du disque.

Avec une pipette Pasteur, prélever des bactéries sur un milieu solide (de préférence une gélose nutritive) et les déposer sur le disque ; attendre quelques secondes.

Complément : Resultat

Oxydase + : le disque devient rose foncé puis violet au niveau du dépôt de bactéries.

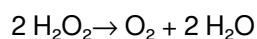
Oxydase - : la couleur du disque, au niveau des bactéries déposées, est inchangée

2.2.2. Recherche de Catalase

principe

Ce test est utilisé pour identifier les organismes qui produisent l'enzyme catalase.

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :



Méthode

Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Complément : Lecture

Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

pour voir la vidéo cliquez *ici*

2.3. Le test IMVC

Le test IMVC regroupe un ensemble de tests qui permet d'identifier particulièrement les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae.

IMVC dérive de: I: test d'indole, M: Methyl red test (rouge de methyl), V: test de vosges proskauer, C: test de Citrate.

2.3.1. teste d'indole

principe

La production d'indole provient généralement de la désamination de tryptophane, cette réduction nécessite l'existence d'une tryptophannase pour le germe en cause et la présence du tryptophane dans le milieu.

Méthode

Le test est réalisé en introduisant dans de l'eau peptonée exempte d'indole quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur

Complément : resultat

Après 24h de culture dans une eau peptonée l'indole est mis en évidence par le réactif de kovacs, le résultat positif se traduit par la formation d'un anneau rouge à la surface.

2.3.2. Rouge de méthyle / vosges proskauer (RM / VP)

principe

Ce test permet de mettre en évidence les bactéries qui utilisent le glucose en produisant des acides mixtes ou de l'acétoine .

Méthode

Pour réaliser ce test, nous avons utilisé le milieu Clarck et Lubs et nous l'avonsensemencé à l'aide d'une anse de platine avec la souche bactérienne à analyser

Complément : Lecture

Après culture sur milieu de Clark-Lubs durant 24h on transverse stérilement une fraction du milieu dans 2 tubes à hémolyse.

Pour rechercher la réaction de RM : dans le premier tube on ajoute une goutte de la solution de rouge de méthyle, une coloration rouge indique un RM + (production d'acides mixtes) ; une coloration jaune un RM -.

Pour rechercher la réaction de VP ; on verse dans le deuxième tube deux gouttes de VP1 puis deux gouttes de VP2, après 10 à 15 min la réaction positive se traduit par une coloration rouge cerise franc ; négative par une coloration jaune

pour voir vidéo cliquez *ici*

2.3.3. teste de citrate

principe

Le milieu utilisé pour ce test est le Citrate de Simmons qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

Méthode

L'ensemencement du milieu se fait par des stries le long de la pente



figure :teste de citrate

Complément : Lecture

après incubation de 1 à 5 jours à 37°, le résultat positif se traduit par un virage du vert au bleu du a l'alcalinisation du milieu.

2.4. Tests complémentaires

2.4.1. Test mannitol mobilité

L'étude de la mobilité se fait sur milieu mannitol mobilité

Méthode

l'ensemencement se fait par piqûre centrale. Après incubation de 24h à 37° c

Complément

s'il y a croissance uniquement au niveau de la piqûre centrale il s'agit de germes immobiles si la croissance est dans tout le tube c'est des germes mobiles.

S'il y a virage de la couleur au jaune il y a utilisation du mannitol

pour voir video cliquez *ici*

2.4.2. Test du TSI

principe

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des Entérobactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

Méthode

L'ensemencement se fait par piqûre centrale et on remonte par une strie

Complément : Lecture

Après incubation de 24h à 37° s'il y a :

- Jaunissement au niveau du culot il y a fermentation de glucose,
- Jaunissement au niveau de la pente fermentation du lactose et ou saccharose.
- Apparition de gaz dans le culot il y a formation de gaz
- Formation de coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre il y a formation d'H₂S.

pour voir vidéo cliquez *ici*

Bibliographie

Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France. Lavoisier. 462 p.

Joffin J.N., Leyrol G. (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 363 p.