

**[1]. Critères d'identification biochimique des bactéries** (galerie biochimique)

**Recherche de la catalase**

Ce test est à la base de l'identification des bactéries gram +. Certaines réactions métaboliques bactériennes aboutissent en aérobiose, à la production de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). C'est un produit toxique. Sa décomposition dans la cellule peut être réalisée soit par des peroxydases soit par la catalase. Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes :



La plupart des micro-organismes aérobies possèdent une catalase, en particulier les bacilles Gram négatifs aérobies. Son absence est donc un critère d'identification intéressant. Par exemple, parmi les coques Gram + aérobies, seuls les *Streptococcaceae* sont catalase négative. *Lactobacillus* sont des bacilles Gram + aérobies non sporulés dépourvus de catalase.

**Mode opératoire :**

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes.
- A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien.
- Observer immédiatement.
- Au contact d'une colonie isolée, déposer une goutte d'eau oxygénée.
- Observer Immédiatement.

**Lecture :**

- Catalase + : apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène.
- Catalase - : pas de bulles.

**Recherche du nitrate réductase**

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne. Au cours de ce test, on recherche la production d'enzyme nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude consiste à mettre en évidence le nitrite. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'au stade N<sub>2</sub>.



La présence des nitrites donne une coloration rose en présence de réactif de GRIESS.

En l'absence de nitrites, on recherche la disparition des nitrates par addition de zinc,

Deux cas sont possibles :

Coloration rouge : les nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrites par le zinc et ont réagi avec les réactifs, la nitrate réductase est donc négative.

Pas de coloration rouge : au contraire les nitrates du milieu ont été réduits jusqu'au stade azote moléculaire par la bactérie et l'addition de zinc ne peut produire de nitrites. La nitrate réductase est donc positive

*(La bactérie produit cette enzyme quand elle est cultivée en anaérobiose).*

**Mode opératoire :**

La recherche est effectuée sur le bouillon nitraté, après un ensemencement abondant d'une bactérie.

Incubation à 30/37°C pendant 24 h.

**Lecture :**

Ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'un reactif de Griess.

Mélanger et observer :

Virage au rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. (NR+).

Le milieu reste Inchangé : on ajoute une poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase :

Coloration en rouge : transformation des nitrates en nitrites par le zinc. pas d'enzyme. (NR-).

Absence de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites (N<sub>2</sub>). La bactérie possède l'enzyme. (NR+).

**Métabolisme du lactose, glucose et production du gaz et d'H<sub>2</sub>S**

Le test est effectué sur milieu de Kligler-Hajna, un milieu test permettant la recherche simultanée de : L'utilisation du lactose, La fermentation du glucose, La production d'H<sub>2</sub>S, La production de gaz.

**Mode opératoire :**

La pente doit être ensemencée en stries serrées.

Le culot est ensemencé par une simple piqûre.

L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 h (les bouchons partiellement dévissés).

**Lecture :**

Bactérie lactose - : Pente rouge.

Bactérie lactose + : Pente jaune.

Bactérie glucose + : Culot jaune.

Bactérie glucose - : Culot rouge.

- Bactéries H<sub>2</sub>S + : Précipité noir.
- Bactéries H<sub>2</sub>S - : Pas de précipité noir.
- Bactérie Gaz + : Fragmentation de la gélose et/ou formation des bulles dans la gélose.
- Bactérie Gaz - : Absence de ces témoins.

Interprétation :

Dans un premier temps, les bactéries utilisent le glucose comme source de carbone et d'énergie. Cette utilisation s'accompagne de la production d'acides organiques d'où le virage du rouge au jaune du milieu. Dans un second temps, après l'épuisement de glucose, on a deux possibilités: Les bactéries utilisent le lactose avec production d'acides organiques: virage au jaune. Incapacité d'utiliser le lactose, Les bactéries utilisent la peptone (en conditions aérobies), ce qui libère des produits basiques (ammoniac, amines) d'où une recoloration au rouge de la pente.

**Utilisation du citrate**

La gélose Simmons citrate (milieu minéral minimum au citrate de sodium) est utilisé pour la différenciation des bacilles Gram négatifs. Ce milieu contribue à la mise en évidence de l'enzyme citratase. Les bactéries capables d'utiliser le citrate comme source de carbone pourront se développer. Ce qui entraîne une acidification qui se traduit par une coloration bleue du milieu en présence de bleu de bromothymol (indicateur de pH).

Mode opératoire :

- Ce milieu doit êtreensemencé à partir d'une culture pure et fraîche d'Entérobactéries prélevée sur milieu gélosé.
- En aucun cas, on ne doit se servir d'une culture en bouillon peptonée, qui apporterait avec les bactéries des éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats.
- Ensemencer en surface, par une strie centrale et longitudinale.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 1 à 7 jours.
- Observer la culture tous les jours.

Lecture :

- Les bactéries citrate positive (+) : virage de couleur au bleu une culture souvent abondante.
- Les bactéries citrate négative (-) : pas de virage de couleur / ne donnent pas de culture.

**Métabolisme du pyruvate (réactions RM/VP)**

La fermentation est une voie de catabolisme du glucose en l'absence d'oxygène (milieu anaérobie). C'est une simple réaction d'oxydoréduction où l'accepteur final d'électron est souvent le produit final. Elle se caractérise par une oxydation partielle du produit fermentescible, et donne lieu à une faible production d'énergie.

Mode opératoire :

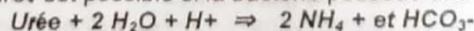
- Ce test est réalisé sur milieu Clark et Lubs (bouillon riche en glucose).
- L'ensemencement se fait à partir d'une culture jeune de 24h.
- L'incubation à 37°C pendant: 24 à 48h.

Lecture :

- On partage le bouillon dans deux tubes :
- Dans le premier on ajoute 2 gouttes d'un réactif VP (Voges Proskauer I et II).
  - (VP +) : virage du jaune au rouge. (fermentation butandiol ou acétoïne)
  - (VP -) : pas de virage (couleur jaune).
- Dans le second on ajoute 2 gouttes d'un réactif RM (rouge de méthyle).
  - (RM +) : virage du jaune au rouge. (fermentation acides mixtes).
  - (RM -) : pas de virage (couleur jaune).

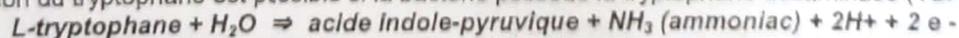
**Recherche de l'uréase, la TDA et la production d'indole**

Du fait de l'absence de source de carbone comme le glucose et de l'absence de peptones dans ce milieu synthétique, l'observation d'une croissance ne peut être qu'associée à la dégradation de l'urée et du tryptophane. La dégradation de l'urée est possible si la bactérie possède une uréase:



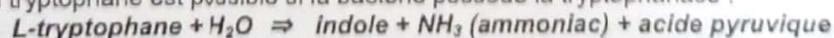
On observe, dans cette réaction, l'apparition d'ions alcalins, qui se traduit par un virage de l'indicateur de pH du jaune orangé au rose.

La dégradation du tryptophane est possible si la bactérie possède la tryptophane désaminase (TDA) :



L'acide indole-pyruvique réagit avec le chlorure de fer III (réactif) en donnant un précipité stable brun.

La dégradation du tryptophane est possible si la bactérie possède la tryptophanase :



L'indole obtenu est un composé apolaire qui réagit avec le réactif de Kovacs. (para-diméthyl-amino-benzealdéhyde/HCl/ pentanol), en milieu acide. Cela se traduit par l'apparition d'une coloration rouge.

### Mode opératoire :

Ce milieu s'ensemence avec une suspension de bactéries prélevées sur un milieu solide (une anse pleine ou directement avec un morceau de colonie).

Une incubation de 24 à 48 h à 37°C est nécessaire

### Lecture :

La lecture de ce bouillon s'effectue en trois étapes :

#### Lecture directe de l'uréase :

Une bactérie est considérée uréase positive si une coloration rose est apparue dans le tube (alcalinisation). Dans le cas contraire, elle est considérée uréase négative.

Après séparation du milieu en 2 fractions égales, les 2 étapes suivantes peuvent être réalisées

#### Lecture de la TDA :

Si une uréase active a été observée lors de la précédente étape, on ramène le pH du milieu à une valeur proche de la neutralité (couleur initiale du bouillon) en ajoutant 1 goutte de HCl 0.1M.

Ajouter ensuite, dans cette fraction, quelques gouttes de réactif TDA.

Une coloration brune traduit la présence de la TDA.

#### Recherche de l'indole :

Ajouter dans la 2ème fraction quelques gouttes de réactif de Kovacs.

L'apparition d'un anneau rouge traduit la présence d'indole.

### **Recherche des LDC, ODC et ADH**

Les bacilles à gram (-) aéro-anaérobies facultatifs à métabolisme fermentatif (*Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*) fermentent le glucose ce qui entraîne une acidification du milieu et une coloration jaune du milieu en présence de pourpre de bromocrésol (indicateur de pH). A pH acide les décarboxylases et les di-hydrolases présentent une activité maximale. Si les bactéries étudiées possèdent la décarboxylase ou la di-hydrolase appropriée, l'activité enzymatique sera alors mise en évidence par la formation de métabolites aminés qui alcaliniseront le milieu, et entraîneront un nouveau changement de coloration du milieu en mauve.

Au contraire, les bacilles à gram (-) aérobies stricts à métabolisme oxydatif (*Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*) dégradent les glucides par voie oxydative en ne produisant que peu de catabolites acides : il s'ensuit que la coloration des trois milieux demeure pratiquement inchangée, mauve pâle à violet foncé après 24 à 48 heures d'incubation.

### Mode opératoire :

#### Pour les bacilles à métabolisme fermentatif :

A partir d'une culture pure et fraîche prélevée sur milieu gélosé, préparer une suspension en eau physiologique.

Ensemencer chacun des trois tubes avec 2 gouttes de cette suspension.

La culture des bactéries s'effectue dans des conditions d'anaérobiose.

#### Pour les bacilles à métabolisme oxydatif :

Verser stérilement le contenu de chacun des trois tubes dans trois tubes stériles.

Ensemencer chacun des milieux avec 5 gouttes d'une suspension bactérienne.

Incuber pendant 24 à 48 heures à 37°C.

### Lecture :

#### Pour les bacilles à métabolisme fermentatif :

Coloration jaune du milieu (virage acide) : résultat négatif (-).

Coloration violette du milieu (virage alcalin) : résultat positif (+).

#### Pour les bacilles à métabolisme oxydatif :

Il est possible de mettre en évidence une décarboxylase ou une di-hydrolase chez ces bacilles en versant goutte à goutte une solution de tampon pH 4 dans chacun des trois tubes de milieu. Agiter quelques secondes après l'addition de chaque goutte. Chaque tube reçoit le même nombre de gouttes de tampon pH 4 jusqu'à ce que l'un des trois tubes se colore en jaune.

Ajouter dans les tubes restés alcalins (coloration mauve) trois gouttes supplémentaires de tampon pH 4. L'absence de virage acide correspond à la présence d'une décarboxylase ou d'une di-hydrolase, résultat (+).

### **Métabolisme du glucose**

Les bactéries hétérotrophes métabolisent le glucose selon 2 voies: Fermentation ou Respiration.

Le test de HUGH -LEIFSON permet de déterminer la voie attaque de glucose en utilisant une gélose molle (Milieu MEVAG) gélose semi solide, glucosée et au rouge du phénol (en tube).

### Mode opératoire :

L'ensemencement se fait par piqûre centrale.

Pour l'étude d'une souche bactérienne, on utilise 2 tubes:

Le premier, recouvert de vaseline (tube fermé).

Le deuxième, non recouvert (tube ouvert).

Incubation à 37°C pendant 24 h.

### Lecture :

Les 2 tubes jaunes : métabolisme fermentaire (fermentation)

Tube ouvert seul jaune : métabolisme oxydatif respiratoire (respiration).  
Les 2 tubes rouges (pas de virage) : bactérie inactive (glucose -).

### [2]. Détermination du type respiratoire

Pour étudier le rapport des bactéries avec l'oxygène, on étudie sa croissance dans un milieu de culture dont la pression en oxygène est égale ou inférieure à celle de l'air. Le milieu utilisé est la gélose VF, coulée en tubes et régénérée par ébullition pour éliminer le gaz dissous. L'ensemencement est réalisé lorsque le milieu est encore liquide vers 45°C.

#### Mode opératoire :

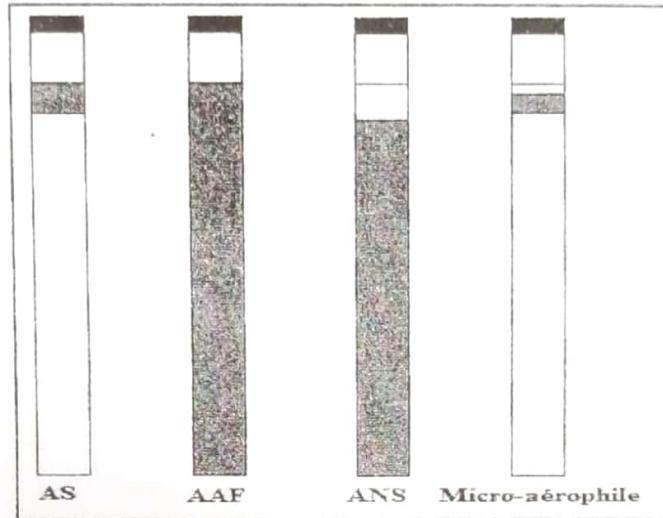
Régénérer pendant environ 30 minutes au bain marie bouillant.

Ensemencer en surfusion vers 45°C, à l'aide d'une pipette Pasteur fermée et chargée, en remontant en spirale.

Solidifier.

Incuber 24 heures à 37°C.

#### Lecture des résultats :



### [3]. Les inhibiteurs de croissance (les antibiotiques) : l'antibiogramme

Les antibiotiques sont des composés chimiques, élaborés par un micro-organisme ou produit par synthèse chimique et dont l'activité spécifique se manifeste à dose faible sur les micro-organismes. La détermination de la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques est d'une grande importance en microbiologie. Elle permet l'élaboration des milieux d'isolement sélectifs, le contrôle chimio-thérapeutique d'une infection et enfin elle peut être utilisée comme approche dans la caractérisation et l'identification bactérienne. L'antibiogramme d'une souche peut être déterminé en milieu liquide par la méthode de dilution ou en milieu gélosé par la technique de diffusion en utilisant des disques.

#### Mode opératoire : (méthode de diffusion)

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Mueller Hinton (en boîtes).

Préparation de l'inoculum.

Ajustement de la turbidité de l'inoculum ( $10^8$  UFC).

Ensemencement des boîtes par Inondation.

Disposition des disques de celluloses imprégnés d'antibiotique en respectant la distance entre les disques.

Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.

Placer la boîte de pétri à basse température +4°C pendant 15 à 30mn afin de permettre aux antibiotiques de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier.

Mettre les boîtes à incuber à 37°C dans les 30 mn qui suivent la préparation pendant 24h.

Les boîtes doivent être placées couvercle en bas.

#### Lecture des résultats :

L'activité des antibiotiques est appréciée, par le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du disque.