

TP 2 : Etude du métabolisme glucidique chez les bactéries

1. L'auxanogramme

L'auxanogramme est une méthode utilisée pour évaluer la capacité d'une souche microbienne à utiliser différentes sources de carbone pour sa croissance. Cette technique permet de déterminer les substrats carbonés que le microorganisme peut métaboliser, en observant sa croissance en présence de ces substrats spécifiques dans un milieu de culture contrôlé.

1.1. Principe

L'auxanogramme est réalisé sur un milieu de culture qui ne contient qu'une seule source de carbone et un indicateur de pH, permettant ainsi d'évaluer l'effet de cette source sur la croissance microbienne.

1.2. Matériel

- Bec bunsen, anse de platine, tubes à essai, étuve, ...etc.
- Culture bactérienne jeune de 24h.
- Milieu de culture :

Composant	Quantité (g/L)	Rôle
Peptone	15	Apport de facteur de croissance
Glucide à étudier (fructose ou galactose ou lactose ou saccharose)	10	Source de C et énergie
NaCl	5	Equilibre ionique
Rouge de phénol 1%	5mL	Indicateur du pH

1.3. Ensemencement

- Préparer le milieu de culture en tubes à essai chacun contient 5ml.
- Ensemencer les tubes (chacun contient un type de sucre) à l'aide d'une anse de platine chargé de bactérie à étudier.
- Incuber les cultures ensemencées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

1.4. Lecture

- Virage de la couleur du bouillon au jaune : réaction positive => GLUCIDE +.
- Virage de la couleur du bouillon au rouge pourpre : réaction négative => GLUCIDE -.



- **Question :** Interpréter les observations obtenues.

2. Mise en évidence de la voie d'attaque du glucose

Pour synthétiser de l'énergie, les bactéries peuvent attaquer par :

- **Voie oxydative** : le glucose est utilisé uniquement en présence de dioxygène (faible libération d'acides).
- **Voie fermentative** : le glucose est utilisé en absence de dioxygène et en présence de dioxygène ou seulement en absence de dioxygène (forte libération d'acides).

Pour étudier la voie d'attaque d'un glucide, on utilise des milieux contenant un seul glucide et un indicateur de pH. Un milieu de culture répondant à ces exigences est le milieu de **HUGH et LEIFSON**.

2.1. Principe

La voie d'attaque du glucose est étudiée grâce à la présence du glucose comme seul glucide et du Bleu de bromothymol (BBT) comme indicateur de pH. L'utilisation du glucose se traduit par une acidification du milieu révélée par le virage du bleu de bromothymol à sa teinte acide (jaune).

2.2. Matériel

- Bec bunsen, anse de platine, tubes à essai, bain Marie, étuve, ...etc.
- Culture bactérienne jeune de 24h.
- Milieu de culture **Hugh et Leifson (pH 7)** :

Composant	Quantité (g/L)	Rôle
Tryptone	2	Source de C et N
Extrait de levure	1	Source de C, N, minéraux et vitamine
NaCl	5	Equilibre ionique
Phosphate monopotassique (KH ₂ PO ₄)	0.3	Source de P
Glucose	10	Source de carbone
Bleu de bromothymol	0.03	Indicateur de pH
Agar	3	Gélifiant

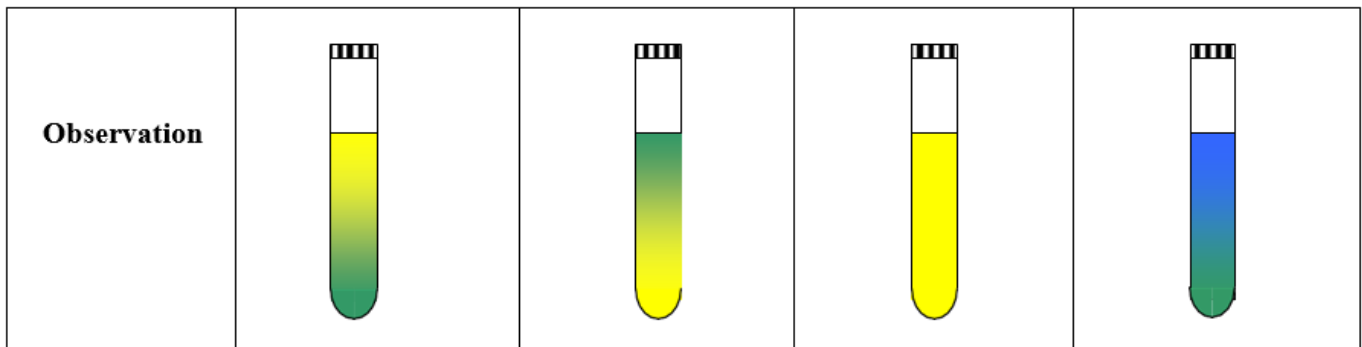
1.3. Ensemencement

- Préparer le milieu de culture en tubes à essai chacun contenant 8ml.
- Faire fondre dans un bain d'eau bouillante le contenu de 2 tubes du milieu (20 min à ébullition).
- Refroidir vers 44 - 47°C, et ajouter aseptiquement dans chaque tube quelques gouttes de solution aqueuse stérile de glucose pour obtenir une concentration finale de 1 %.
- Mélanger et refroidir le milieu en plongeant le tube dans l'eau froide.

- Inoculer chaque tube par piqûre centrale avec un anse de platine chargé de la bactérie à étudier.
- Verser aseptiquement une couche de 10 à 15 mm de vaseline fondue, et plonger aussitôt le tube dans l'eau froide pour refroidir la vaseline.
- Incuber les cultures ensemencées dans une étuve à 37°C pendant 24-48h avec bouchon dévissé.

1.4. Lecture

Vérifier qu'il y a une culture et s'il y a un virage de la couleur du milieu au jaune ou au bleu.



➤ **Question :** Interpréter les observations dans chaque cas et donner vos conclusions.

NB : Zones de virage du bleu de bromothymol :

