

TPN°3 : Mise en évidence de la voie d'attaque des glucides et fermentation des sucres**1. Mise en évidence de la voie d'attaque des glucides (Hugh Leifson)**

Le métabolisme fermentatif, favorisé par l'anaérobiose, engendre de nombreux produits acides que l'on pourra détecter grâce à un indicateur de pH. Le métabolisme oxydatif ne donne naissance qu'à de petites quantités d'acides et uniquement lorsque seront présentes de bonnes conditions d'oxygénation. Un milieu de culture répond à ces exigences : Milieu de **HUGH et LEIFSON**.

Composition de milieu Hugh Leifson

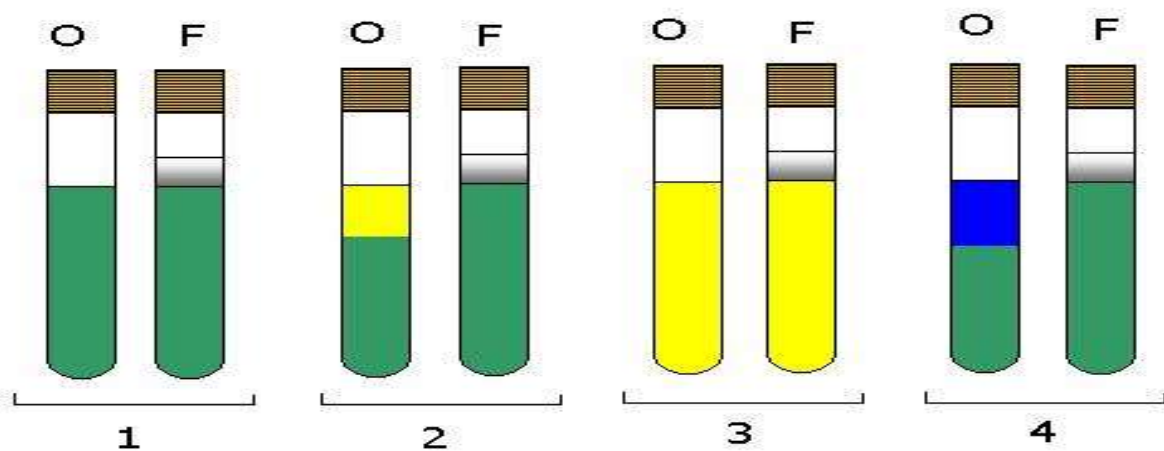
Composition	Quantité (g/L)	Rôle
Peptone pancréatique de caséine	2	Source de C et N
Extrait de levure	1	Source de C, N, minéraux et vitamine
NaCl	5	Equilibre ionique
Phosphate monopotassique	0.3	Source de P
Glucose	10	Source de carbone
Bleu de bromothymol	0.03	Indicateur de pH
Agar	3	Gélifiant
Eau distillée	1L	Milieu aqueux

Technique d'ensemencement

- Régénérer le milieu au bain-marie bouillant (20 min à ébullition).
- Attendre le refroidissement jusqu'à ce qu'il se durcisse (à mettre sous un robinet d'eau froide pour gagner du temps par exemple).
- Ensemencer les 2 tubes (1et 2) par **piqûre centrale** à l'aide d'une anse de platine chargé de bactérie à étudier.
- On ajoute de la vaseline dans le tube N°2, sur une hauteur de 1 cm environ
- Etuver à 37°C **en ne revissant pas à fond le bouchon**.
- Lire les résultats après 24h.

Lecture et interprétation

- 1 Tubes tel qu'ils doivent être après ensemencement
- 2 Haut du Tube O jaune → il y a eu un changement de couleur dû 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.



2. Fermentation des sucres

2.1. Fermentation acides mixtes et fermentation butylène glycolique (Clark et Lubs)

Le but de ce milieu est d'étudier deux aspects du métabolisme glucidique, en particulier celui du glucose (il faut donc que la bactérie soit glucose +) Après ensemencement, au bout de 48 heures on réalise deux tests :

- la présence d'un dérivé intermédiaire du métabolisme glucidique l'Acétoïne mis en évidence par la réaction de Voges-Proskauer (VP).
- la présence des acides mis en évidence par le rouge de méthyle (RM).

Composition du milieu Clark et Lubs

Composition	Quantité (g/ 1L eau distillée)	Role
peptone	5	Source d’N et de C
Glucose	10	Lecture d’un caractère biochimique
K ₂ HPO ₄	3	Source minérale
pH	7.5	

Technique

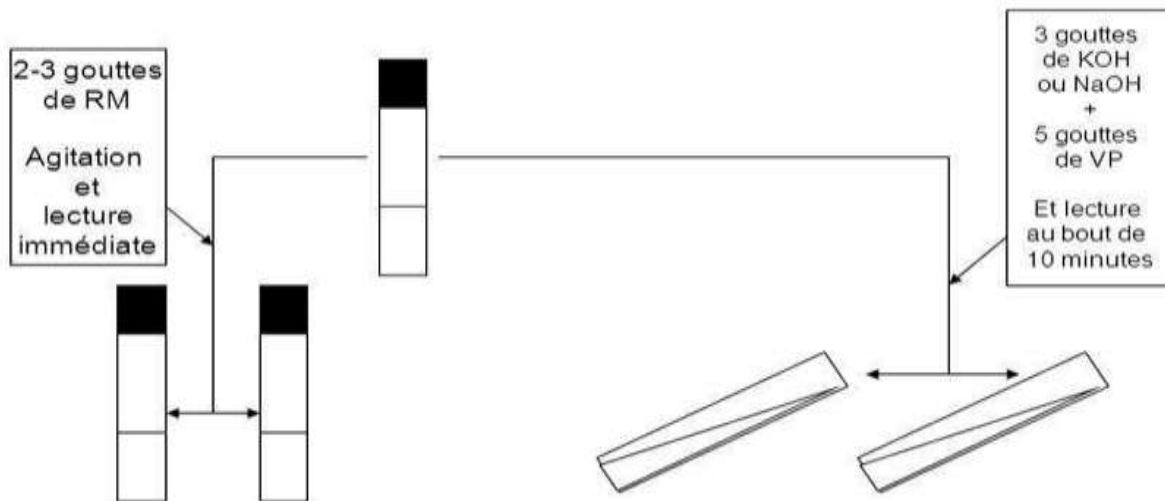
Réaction au rouge de méthyle (RM)

A partir du milieu de Clark et Lubs ensemencé depuis 24-48 h, et incubé à 37° C. Dans un tube à

hémolyse, prélever 1 mL du milieu et ajouter 2-3 gouttes de rouge de méthyle à 0,02% dans l'alcool à 60%. Le rouge de méthyle est rouge pour pH 4,6 (RM⁺) et jaune pour pH > 4,6 (RM⁻).

Réaction de Voges-Proskauer

A partir du milieu de Clark et Lubs, après 24-48h d'incubation à 37° C. Dans un tube à hémolyse, et stérilement, prélever 1 mL du milieu, ajouter 5 gouttes d'α-naphtol 6% dans l'alcool (VPI) et 3 gouttes de NaOH 16% (VPII). Laisser au repos 10 minutes.



Lecture et interprétation

- Une teinte rouge apparaît à la partie supérieure du tube si la souche a produit de l'Acétoïne au cours de la fermentation butylène glycolique (VP⁺).
- Une teinte rouge apparaît du tube si la souche a produit des acides (le milieu est acide) au cours de la fermentation acides mixtes (RM⁺).

2.2. Fermentation du glucose, lactose et saccharose (le milieu TSI)

Intérêt

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.

Composition du milieu TSI

Composition	Quantité (g/ 1L eau distillée)
Tryptone	14
Extrait de levure	3
Extrait de viande	3
Glucose	1
Lactose	10
Saccharose	10
Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	0.3
Citrate ferrique	0.3
Rouge de phénol	24
Agar	13.5

Technique d'ensemencement

- ✓ A partir d'une colonie suspecte prélevée sur un milieu d'isolement sélectif, ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées.
- ✓ Incuber à 37°C pendant 24 heures (capsules desserrées) de manière à favoriser les échanges gazeux.

Lecture

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). Une alcalinisation se révèle par une coloration rouge foncé. La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

A. Fermentation du glucose

Pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose, la réaction acide (couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot du tube.

- culot rouge : glucose non fermenté
- culot jaune : glucose fermenté

B. Fermentation du lactose et /ou du saccharose

Par contre, Les germes qui fermentent le lactose ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube.

- pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés
- pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)

C. Production de sulfure d'hydrogène

Cette production se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique. La formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

D. La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone)

Cette production résulte des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.