

TPN°4 : La recherche des enzymes (nitrate réductase, uréase, tryptophane désaminase, tryptophanase, citrate perméase), fermentation du mannitol, mobilité bactérienne

I. Recherche de nitrate réductase (bouillon nitraté)

Intérêt

En absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par la respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité des enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne. Le test consiste à mettre en évidence du nitrate réductase qui se traduit par la production des nitrites dans le milieu de la culture ou la disparition des nitrates initiaux. La réduction des nitrates en nitrites se traduit par la production des nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.

Composition du bouillon nitraté

Composition	Quantité dans un 100 mL eau distillée (g)
Peptone	1
Extrait de bœuf	0.1
Extrait de levure	0.2
Chlorure de sodium	0.5
Nitrate de potassium KNO ₃	1
pH	6.8

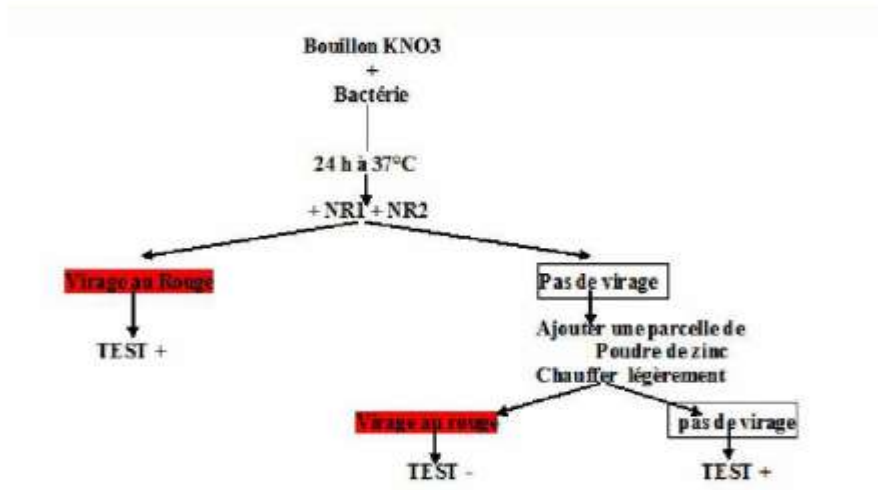
Souches bactérienne : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*

Technique de Griess-Ilosway

Les souches sont cultivées sur bouillon nitraté (1% KNO₃), après incubation à 37°C pendant 24 heures, trois gouttes de chacun des **réactif NIT I** (acide para-sulfanilique 0,8 g en 5 N acide acétique) et **NIT II** (diméthyl-a-naphthylamine 0.6 mL ; acide acétique 100 mL), appelés aussi réactif de GRIESS, sont ajoutées à la culture.

Lecture

- ✓ Un résultat positif est mis en évidence par l'apparition d'une coloration rouge.
- ✓ En absence de coloration rouge, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont ajoutés.
 - S'il y a une apparition de la coloration rouge, les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la Nitrate réductase.
 - En cas d'absence de cette coloration, les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la nitrate réductase.



2. Mise en évidence de la mobilité bactérienne et fermentation de mannitol

Intérêt

Le Mannitol-Mobilité-Nitrate est une gélose molle contenant du mannitol (polyol dérivé du mannose) et un indicateur coloré (rouge de phénol). Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol (caractère biochimique) et la mobilité de la souche (caractère morphologique). Ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives.

Composition du milieu mannitol mobilité nitrate

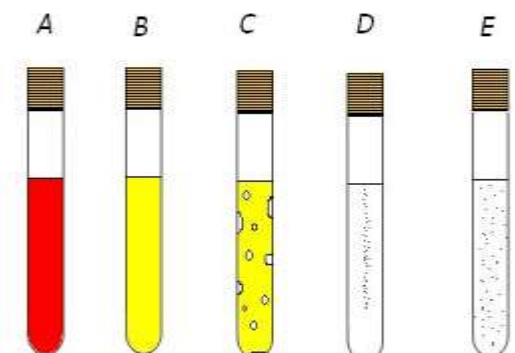
Composition	Quantité dans un 1L eau distillée (g)
Hydrolysate tryptique de caséine	10
Mannitol	7.5
Rouge de phénol	0.04
Nitrate de potassium	1
Agar	3.5
pH	7.6

Souches bactériennes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*

Technique

Après régénération au bain-marie bouillant pendant 20 minutes, le milieu est refroidi totalement puis ensemencé par piqûre centrale aussi fine que possible. Incuber à 37°C pendant 24h.

- ✚ A : Pas de dégradation du mannitol
- ✚ B : Dégradation du mannitol
- C : Dégradation du mannitol avec production de gaz
- ✚ D : Bactérie non mobile, colonies au lieu de l'ensemencement
- ✚ E : Bactérie mobile, répartition des colonies dans
- ✚ Le milieu jaune : mannitol +.
- ✚ Le milieu rouge : mannitol -.

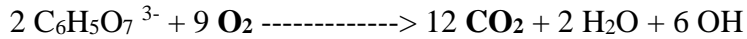


3. Recherche de citrate perméase (Citrate de Simmons)

Intérêt

Le citrate de Simmons est présenté sous forme de gélose inclinée. Dans ce milieu le citrate ($C_6H_5O_7^{3-}$) est l'unique source de carbone. L'utilisation de ce substrat, pour la plupart des bactéries pouvant le cataboliser, est une **utilisation aérobie**, et se traduira par une **alcalinisation** du milieu. L'ensemencement à partir d'une souche pure fournie en bouillon nutritif ou en eau peptonnée est impossible.

L'équation de l'oxydation par respiration aérobie du citrate :



Composition du milieu citrate de Simmons

Composition	Quantité dans un 1L eau distillée (g)
Chlorure de sodium NaCl	5g
Sulfate de magnésium Mg SO ₄	0,2 g
Dyhydrogénophosphate d'ammonium NH ₄ H ₂ PO ₄	1g
Hydrogénophosphate de potassium K ₂ H PO ₄	1g
Citrate trisodique	2g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	20g
pH	6,9-7

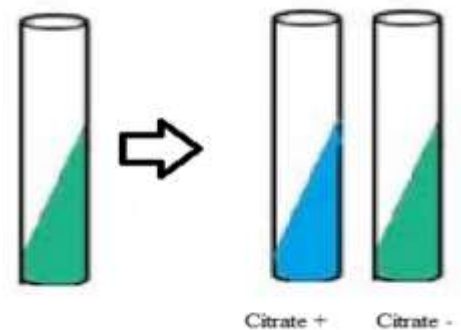
Souches bactériennes : *Escherichia coli*

Technique

Ensemencer en surface en une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Ne pas visser le bouchon à fond, afin de permettre les échanges gazeux (en particulier élimination du dioxyde de carbone). Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

Lecture

- ✚ Virage de l'indicateur de pH au bleu : les germes capables d'utiliser le citrate cultivent sur ce milieu, avec alcalinisation du milieu et la souche est **citrate⁺**.
- ✚ Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est **citrate⁻**.
- ✚ Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas eu alcalinisation. Présence de culture bactérienne. **citrate⁺**.



4. Recherche de l'uréase, du tryptophane désaminase et de tryptophanase

Intérêt

La recherche d'une uréase, d'une tryptophane désaminase et d'une tryptophanase s'effectue en milieu urée-tryptophane (appelé milieu urée-indole). Ce milieu contient du tryptophane, de l'urée et du rouge de phénol comme indicateur de pH. L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne va être transformée en carbonate d'ammonium alcalin. Ce milieu ne permet pas la croissance bactérienne. Il permet également la recherche d'une tryptophane désaminase. Par une réaction complexe, le tryptophane est décomposé également en présence d'une tryptophanase en indole.

Composition du milieu urée-indol

Composition	Quantité dans un 1L eau distillée (g)
L. tryptophane	3g
KH ₂ PO ₄	1g
K ₂ HPO ₄	1g
NaCl	5g
Urée	20g
Alcool 95°	10mL
Solution de rouge de phénol à 1%	2,5ml

Souches bactériennes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*

Technique

A. Recherche d'uréase

La recherche d'une uréase s'effectue en milieu urée-tryptophane par ensemencement bactérien et incubation à 37°C pendant 24 heures.

B. Mise en évidence de la formation d'Indole ou recherche du tryptophanase

A partir d'une culture de 24 heures en milieu urée indole, Ajouter à 0,5 mL de milieu 5 à 6 gouttes de réactif Kovacs (10g du paradiméthylaminobenzaldéhyde dissous dans 150 mL alcool amylique et 50 mL HCL pur). Agiter lentement.

C. Recherche du tryptophane désaminase (TDA)

A partir de 0,5mL de milieu urée-indole incubé à 37°C pendant 24 heures, ajouter 1 goutte de perchlorure de fer (FeCl₃=réactif de TDA).

Lecture

A. Uréase

- ✚ Si le germe est *uréase*⁺ (possède une uréase), le milieu devient alcalin par formation de carbonate d'ammonium et vire au rouge violacé
- ✚ Pas de modification de couleur si le germe est *uréase*⁻

B. Indole

- ✚ Si la bactérie *indole*⁺ donne un anneau coloré en rouge de la phase amylique du surnageant.
- ✚ Pas de modification de couleur si la bactérie est *indole*⁻

C. Tryptophane désaminase

- ✚ En présence de perchlorure de fer, l'acide indolylpyruvique donne un précipité brun rouge, **TDA**⁺.
- ✚ En présence d'une coloration jaune, **TDA**⁻.