

TP N3 : les bactéries a Gram négatif : Coloration de Gram, Tests physiologiques (type respiratoire, Nitrate réductase, catalase, oxydase, Métabolisme des glucides sur Galerie API.

1. La coloration de Gram

La **coloration de Gram** (mise au point par Christian Gram) est une **coloration de base** en bactériologie. C'est une "coloration double", qui permet de différencier les bactéries:

- D'après leur forme
- D'après leur affinité pour les colorants.

Principe

ETAPES	Bactéries à Gram positif	Bactéries à Gram négatif
<u>Etape 1</u> Coloration Par Le Violet De Gentiane	Action combinée du violet de gentiane et du lugol (appelé mordanceur ou mordant ,car il renforce l'action du violet de gentiane) a il se forme un complexe chimique qui colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet . 	
<u>ETAPE 2</u> Décoloration Par L'alcool	La paroi bactérienne est imperméable à l'alcool : les bactéries restent colorées en violet. 	La paroi bactérienne est perméable à l'alcool (du fait de sa constitution chimique différente et d'une différence d'épaisseur): l'alcool pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme: les bactéries deviennent "incolores". 
<u>ETAPE 3</u> Recoloration Par La Fuchsine	Les bactéries à paroi imperméable à l'alcool « ne prennent pas » la fuchsine, elles restent colorées en violet et sont dites à Gram positif . 	Les bactéries à paroi perméable à l'alcool , qui ont été décolorées, sont recolorées par la fuchsine . Elles sont colorées en rose et sont dites à Gram négatif . 

Technique

Il existe de **nombreuses variantes de la coloration de Gram** qui diffèrent par la composition des réactifs et leur temps d'action.

Coloration par le violet de gentiane ■ Xn	• Placer le frottis fixé dans le flacon de violet de gentiane. • Laisser agir 1 min. • Sortir la lame.
Mordançage par le lugol ■ Xn	• Recouvrir le frottis (placé sur le porte-lame, au dessus de la cuve à coloration) de lugol. • Laisser agir 1 min (ou un temps au moins égal à celui de l'action du violet de gentiane). • Eliminer l'excès de lugol et rincer la lame à l'eau distillée.
Décoloration par l'alcool ✂	• Recouvrir le frottis d'alcool (éthanol) et laisser agir 10 s. • Laver le frottis à l'eau distillée (les 2 côtés de la lame).
Recoloration par la fuchsine ■ Xn	• Placer le frottis dans le flacon de fuchsine. • Laisser agir 10 s. • Sortir la lame et la rincer à l'eau distillée (des 2 côtés).
Séchage	• Sécher la lame entre 2 feuilles de papier essuie-tout.

Observation

Examiner à l'**objectif x100**, à l'**immersion** (avec une goutte d'huile), avec un éclairage important (**diaphragme ouvert**).

Noter:

- **La morphologie:** sphériques (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles) et des formes plus ou moins spiralées.
- **Indication sur la taille:** taille moyenne, petite taille, grande taille
- **Le Gram:** bactéries à Gram positif (violet) ou à Gram négatif (rose)
- **Le groupement:** par 2, amas, chaînettes...
- **La proportion de chaque type de bactéries** (quand il y en a plusieurs...)

NB: il peut exister des **situations intermédiaires** en ce qui concerne la couleur des bactéries:

- "**Gram faible**": bactéries à Gram positif qui se décolorent très facilement
- "**Gram variable**": présence dans une même souche de bactéries à Gram positif et de bactéries à Gram négatif.
- "**Gram hétérogène**": différences d'intensité de coloration dans une même bactérie

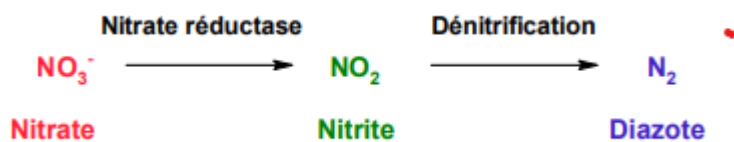
Ex: bacilles à Gram négatif à **coloration bipolaire**

L'interprétation de la coloration de Gram n'est possible que si la confiance en la technique réalisée est totale. En cas de doute, **une vérification s'impose.**

2. Le test de nitrate réductase

2.1.Principe

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme :la nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude va donc consister à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux. La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction , jusqu'à une dénitrification.



Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5 % de nitrates de potassium) est ensemencé avec la bactérie à étudier et incubé 18 heures à 37 °C. Après incubation, 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) sont ajoutées au bouillon. Si une coloration rose fugace apparaît, les nitrates ont été réduits au stade nitrites.

Technique

- Ensemencer le bouillon nitraté avec quelques gouttes de suspension bactérienne.
- Incuber 24h à 37 °C.

Après 24 heures d'incubation à 37°C : • Vérifier que le bouillon est trouble (présence de culture)

- Ajouter le réactif de Griess (Nitrite I + Nitrite II).
- Observer la couleur du milieu.
- Ajouter du zinc selon le résultat de l'étape précédente et interpréter la couleur du milieu.

Observation

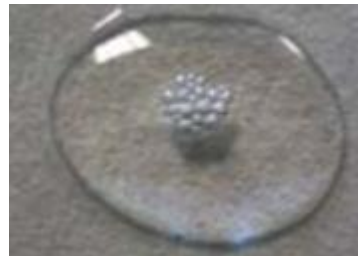
En l'absence de coloration, soit les nitrates ont été réduits en azote, soit la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. L'addition de poudre de Zinc permet de trancher. Si une coloration rose apparaît, alors la bactérie ne possède pas de nitrate réductase. Si aucune modification de coloration n'est visible après ajout de zinc, alors les nitrates avaient été réduits en azote.

3. Le test catalase

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

Principe

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) : Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.



Technique

déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur .

- Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
- Dissocier la colonie dans la goutte.

Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

Observation

- Bulles d'oxygène : La bactérie possède la catalase, elle est dite Catalase +.
- Pas de bulle La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite : Catalase -

4. Le test oxydase

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram -.

Principe

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine. Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge noirissant à l'air.

Technique

Le réactif peut se trouver sous deux formes :

-soit en solution : sur une lame de verre, déposer un carré de papier filtre et l'imbiber d'une solution fraîchement préparée de réactif.

-soit sous la forme d'un disque pré-imprégné par le réactif

Dans les deux cas, écraser avec une effilure de pipette Pasteur une colonie de germes à étudier sur ce papier (instrument n'oxyde pas le réactif). Il ne faut pas utiliser l'anse de platine (fil nickel-chrome) qui peut oxyder le réactif contenu dans le disque et donner de faux positifs.



test est positif.
Oxydase +



test est négatif.
Oxydase -

Observation

Pas de lecture avant 30 secondes environ

-Tâche rose violette : La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite Oxydase +

-Pas de tâche rose violette : La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite Oxydase -.

5. Métabolisme des glucides sur Galerie API (analytical profile index)

Là où les techniques classiques nécessitaient une à trois semaines, les gammes miniaturisées permettent l'obtention des résultats sous 18 à 72 heures. Elles permettent, en outre, l'identification d'environ 700 bactéries et levures, ce qui couvre pratiquement une bonne partie des micro-organismes pathogènes et près de 1000 tests biochimiques différents d'usage courant. Les galeries Api sont aussi de réalisation facile et de haute performance (résultat fiable).

Choix de la galerie

Le choix de la galerie à ensemercer dépend des résultats de l'étude des caractères morphologiques, culturels et biochimiques qui ont été étudiés précédemment (oxydase, catalase...) et qui sont indispensables pour l'interprétation de la galerie Api.

- La galerie API 20 E doit être utilisée avec des Enterobacteriaceae et/ou des bacilles à Gram négatif non fastidieux.

- La galerie Api 20 NE est destinée à l'identification des coques ou bacilles Gram négatif, peu exigeants (bacilles autres que les entérobactéries) et oxydase positif (Pseudomonas et apparentés, Vibrionaceae, Aeromonadaceae).

- La galerie Api Staph permet l'identification des staphylocoques et des microcoques.

- La galerie Api 20 Strep assure l'identification des streptocoques, entérocoques et les bactéries apparentées (notamment quelques espèces du genre Listeria) en 4 ou 24 heures. Ensemencement d'une galerie API.

Principe

La galerie API comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Lecture et interprétation des résultats

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.