

DS n°4

Taxonomie Bactérienne – Croissance

1. Identification des *Pseudomonas* (/ 15)

Pseudomonas aeruginosa, espèce type du genre *Pseudomonas*, se caractérise par des bacilles Gram(-), oxydase (+), mobiles par une ciliature polaire, aérobies stricts, se développant en profondeur d'une gélose VF nitrée, résistant au cétrimide et produisant 2 types de pigments : la pyoverdine et la pyocyanine.

Les autres espèces de *Pseudomonas* peuvent être identifiées à l'aide des 20 caractères étudiés dans la galerie Api20nE.

1. Quelles différences structurales y a-t-il entre une bactérie Gram négative et une Gram positive ?
2. Quel sera l'aspect d'un milieu VF ensemencé avec *Pseudomonas aeruginosa*, après 24h d'incubation à 30°C. Justifier. Expliquer l'aspect obtenu avec la VF nitrée.
3. Que doit contenir le milieu de culture pour favoriser l'expression des pigments des *Pseudomonas*.

Quel est le pigment spécifique de *Pseudomonas aeruginosa* ?

Quels sont les *Pseudomonas* producteurs du second pigment ?

4. A partir des informations données dans les documents 1 et 2 établir un schéma expliquant le protocole d'ensemencement de cette galerie.
5. A quoi correspond la seconde partie de la galerie (de |GLU| à |PAC|) ?
Quelles sont les propriétés que doit avoir le milieu API AUX médium ?
Comment lit-on cette partie de la galerie ?

2. Taxonomie des *Pseudomonads* (/ 10)

La classification des *Pseudomonas* peut-être confirmée par la détermination du pourcentage en G+C : après extraction purification de chromosome bactérien, on étudie l'absorbance de la solution d'ADN au cours d'un chauffage progressif. La courbe obtenue pour *Pseudomonas aeruginosa* est donnée dans le document 3.

1. A quelle longueur d'onde sont effectuées les mesures? Justifier votre choix.
2. Déterminer graphiquement la température de fusion (T_m) de cet ADN, en justifiant votre démarche.
3. Les valeurs de T_m et de pourcentage en G+C de trois ADN d'origines diverses figurent dans le tableau suivant :

Origine	%(G+C)	T _m (°C)
<i>E. coli</i>	50	89,6
<i>Proteus</i>	35	83,7
<i>Clostridium</i>	28	80,8

Établir l'équation de la droite %(G+C) en fonction de T_m et justifier le signe de son coefficient directeur.

En déduire le pourcentage en G+C de l'ADN étudié.

3. Croissance d'*Enterococcus faecalis* en condition de stress (/ 15)

1. Le document 4 donne la composition d'un milieu synthétique, le milieu DM (Defined Médium), et les résultats expérimentaux de la croissance d'*E. faecalis* sur ce milieu.

1.1. Définir et déterminer graphiquement l'ordre de grandeur du temps de génération de la souche en croissance. L'exprimer en minutes.

1.2. Au temps t=3h, la concentration en glucose dans le milieu est de 1,2 g/L. Déterminer le rendement en biomasse de cette culture, sur 3 heures, sachant que :

0,1 UDO_{570nm} correspond à 50 mg.dm³ de matière sèche de bactérie

2. L'influence de la concentration en sels biliaries sur la croissance d'*E. faecalis* figure dans le document 5. Quel est l'effet d'une concentration à 0,08% en sels biliaries sur le temps de génération ? Justifier votre réponse.

3. On étudie l'influence de l'addition de chlorure de sodium à forte concentration sur la croissance d'*E. faecalis*.

3.1. Que se produit-il lorsqu'on transfère une bactérie dans un milieu d'osmolarité plus élevée ?

3.2. Pour étudier la différence de comportement d'*E. faecalis* dans des conditions de stress hyperosmotique, on compare la croissance de la bactérie :

- en milieu DM (contrôle)

- en milieu DM avec une concentration en NaCl de 0,75 mol/L

- en milieu DM avec une concentration en NaCl de 0,75 mol/L et avec de la glycine bêtaïne à 1 mmol/L.

Les résultats figurent sur le document **document 6**.

Comment évoluent la biomasse et le taux de croissance en milieu DM additionné de NaCl seul et de NaCl + glycine bêtaïne ?

Que peut-on conclure quant au rôle de la glycine bêtaïne ?

Document 1 : Extrait du tableau de lecture de la galerie Api20nE

api 20 NE

TABEAU DE LECTURE

TESTS	SUBSTRATS	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
NO ₃	nitrate de potassium	réduction des nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 mn	
			incoloré	rose-rouge
		réduction des nitrates en azote	Zn / 5 mn	
			rose	incoloré
TRP	tryptophane	formation d'indole	JAMES/ immédiat	
			vert pâle-jaune	rose
GLU	glucose	fermentation	bleu à vert	jaune
ADH	arginine	arginine dihydrolase	jaune	orange/ rose/ rouge
URE	urée	uréase	jaune	orange/ rose/ rouge
ESC	esculine	hydrolyse (β-glucosidase)	jaune	gris/ marron/ noir
GEL	gelatine (à l'encre de chine)	hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment NOIR
PNPG	p-nitro-phényl-βD-galactopyranoside	β-galactosidase	incoloré	jaune
GLU	glucose	assimilation		
ARA	arabinose	assimilation		
MNE	mannose	assimilation		
MAN	mannitol	assimilation		
NAG	N-acétyl-glucosamine	assimilation		
MAL	maltose	assimilation		
GNT	gluconate	assimilation		
CAP	caprate	assimilation		
ADI	adipate	assimilation		
MLT	malate	assimilation		
CIT	citrate	assimilation		
PAC	phényl-acétate	assimilation		
OX	tetraméthyl-p-phenylène diamine	cytochrome oxydase	incoloré	violet

API 20 NE

SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES BACILLES GRAM NÉGATIF NON-ENTEROBACTERIES

Notice technique
Version H

API 20 NE est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation, pour l'identification des bacilles Gram négatif n'appartenant pas à la famille des entérobactéries, mais principalement aux genres suivants : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.

Principe

La galerie **API 20 NE** comporte 20 microtubes contenant milieux et/ ou substrats sous forme déshydratée.

Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du **Tableau de Lecture** et l'identification est obtenue soit à l'aide du **Tableau d'Identification** soit à l'aide du **Catologue Analytique**, soit du **logiciel APILAB**.

- Le coffret **API 20 NE** permet de réaliser 25 identifications et il se compose de :
 - 25 galeries **API 20 NE**
 - 25 boîtes d'incubation
 - 25 ampoules de **AUX Medium**
 - 25 **fiches de résultats**
 - 1 notice technique **API 20 NE**
- Pour utiliser **API 20 NE**, il faut en outre disposer de :
 - **NaCl 0.85 % Medium**, 2 ml (# 2006)
 - réactifs des nitrites, **NIT 1** et **NIT 2** (# 7044 et 7045)
 - réactif **Zn** (# 7038)
 - réactif **JAMES** (# 7054)
 - réactif **OX** (# 7046)
 - **huile de paraffine** (# 7010)

- **Pipettes** (# 7030) ou **PSipettes** (# 7025)
- **McFarland Standard** (# 7090) point 0,5
- **Catologue Analytique API 20 NE** (# 2009)
- **Logiciel APILAB** (# 3101, 3104)

Plus le matériel de laboratoire :

- étuve (30° C), réfrigérateur, bec Bunsen, crayon marqueur.

Conservation

Galeries **API 20 NE** et milieux **AUX Medium** se conservent à 2-8°C La date limite d'utilisation est imprimée sur l'emballage.

Les réactifs, en dehors du **Zn**, se conservent également à 2-8° C Les réactifs **OX** et **JAMES** doivent de plus être conservés à l'obscurité Pour cela, il faut entourer les flacons d'une feuille d'aluminium.

Composition des milieux et réactifs

- **AUX Medium** (inclus dans le coffret)

Sulfate d'ammonium	2,0 g
Agar	1,5 g
Base minérale	82,8 mg
Amino-acides	250,0 mg
Vitamines et substances nutritives	35,9 mg
Tampon phosphate 0,04 M pH 7,1 qsp 1000 ml	
pH final : 7,0 - 7,2	
- **NaCl 0.85 % Medium**, 2 ml

Chlorure de sodium	8,5 g
eau distillée	1000 ml
- Réactifs de Griess pour les nitrites :
 - NIT 1**

acide sulfanilique	0,8 g
acide acétique 5 N	100 ml
 - NIT 2**

N-N-diméthyl-1-naphtylamine	0,6 g
acide acétique 5 N	100 ml
- Réactif **JAMES** pour la recherche de l'indole

Composant J 2183	0,5 g
HCl N qsp	100 ml
- réactif **OX** pour la recherche de l'oxydase :

tetraméthyl-p-phénylènediamine	1 g
alcool isoamylique	100 ml

Mode opératoire

1. Sélection des colonies

RPI 20 NE est réservée aux bacilles Gram négatif non enterobactéries. Il convient donc de repérer sur la boîte d'isolement quelques colonies identiques et de rechercher l'oxydase sur l'une d'elles, comme suit :

- déposer un morceau de papier filtre sur une lame de verre
- humidifier avec une goutte d'eau distillée stérile
- étaler la colonie choisie avec un applicateur de verre ou de bois
- ajouter une goutte du réactif **OX**
une couleur **VIOLETTE** apparaissant en 1-2 minutes indique une **REACTION POSITIVE**

Cette réaction doit être notée sur la **fiche de résultats** car elle constitue le 21^e test de l'identification.

NOTE : certaines espèces de bacilles Gram négatif non enterobactéries qui sont oxydase-négatif (*Ps. maltophilia*, *Acinetobacter...*) sont parfaitement identifiées avec **RPI 20 NE**. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie

2. Préparation de la galerie

- réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide
- inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte
- retirer la galerie de son emballage individuel, la déposer dans la boîte d'incubation et jeter le dessiccant.

3 Préparation de l'inoculum

- ouvrir une ampoule de **NaCl 0.85 % Medium** (# 2006) ou utiliser un tube contenant 2 ml de la même solution, sans additif.
- réaliser une suspension bactérienne de turbidité égale à celle de l'étalon **0.5 de McFarland**; prélever pour cela 1 à 4 colonies à l'aide d'une pipette, par aspirations ou par touches successives

4. Inoculation de la galerie

- remplir les tubes (et non les cupules) des tests **NO₃** à **PMPG** avec la suspension précédente et avec la pipette ayant servi au prélèvement. Éviter la formation de bulles en posant l'extrémité de la pipette sur le côté de la cupule
- ouvrir une ampoule de **RUX Medium** et y transférer 200 µl, soit 4 à 8 gouttes de la suspension précédente. Homogénéiser avec la pipette en évitant la formation de bulles
- remplir tubes et cupules des tests **[GLU]** à **[PAC]** en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (**GLU**, **ADH**, **URE**) pour former un ménisque convexe
- refermer la boîte d'incubation et incubé à 30° C pendant 18-24 h.

5. Lecture de la galerie.

- après 18-24 h à 30° C, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au **Tableau de lecture**
- noter sur la **fiche de résultats** toutes les réactions spontanées (**GLU**, **ADH**, **URE**, **ESC**, **GEL**, **PMPG**).
- la révélation des deux tests **NO₃** et **TRP** doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests **NO₃** et **TRP**.

• Tests **NO₃** :

- ajouter une goutte de réactifs **NIT 1** et **NIT 2** dans la cupule **NO₃**.
- après 5 mn, une couleur **ROUGE** indique une **REACTION POSITIVE**, à noter sur la **fiche de résultats**.
- une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif **Zn** (# 7038) dans la cupule **NO₃**.
- après 5 mn, une cupule restée **INCOLORE** indique une **REACTION POSITIVE** à noter sur la **fiche de résultats**. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de **NO₂** ou de **N₂**) est positive.

La production de **N₂** peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le **Catalogue Analytique**.

• Test **TRP**

ajouter une goutte de réactif **JAMES** (# 7054)
Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une **REACTION POSITIVE**

• Tests d'assimilation

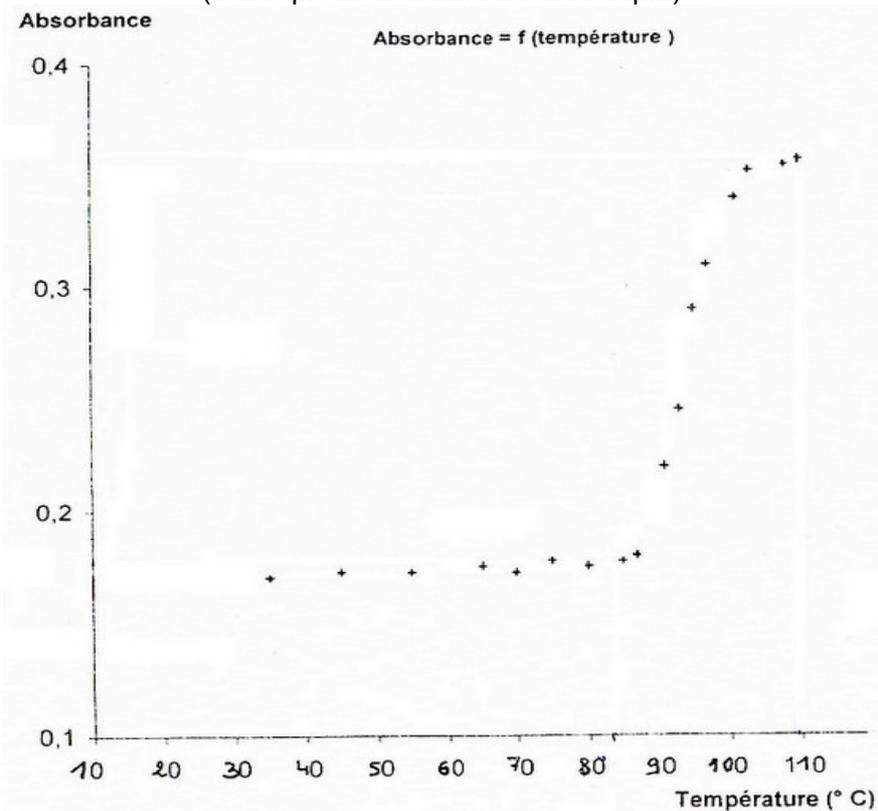
Observer la pousse bactérienne. Une cupule **TROUBLE** indique une réaction positive
Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées + – ou – +
Une fois cette lecture effectuée, l'identification doit être pratiquée comme indiqué en 6. Cependant, dans deux cas, une réincubation est nécessaire

- si le profil n'est pas trouvé dans le **Catalogue Analytique RPI 20 NE**
- si la **NOTE** suivante est indiquée pour le profil obtenu :

IDENTIFICATION NON VALIDE
AVANT 48 H D'INCUBATION

Dans ces deux cas, recouvrir immédiatement les tests **NO₃** et **TRP** d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe, incubé à nouveau à 30° C puis lire 18-24 h plus tard, sauf les trois premiers tests **NO₃**, **TRP**, **GLU** qui doivent être lus uniquement à 18-24 h.

**Document 3 : Détermination de T_m de *Pseudomonas aeruginosa*
(à compléter et rendre avec la copie)**



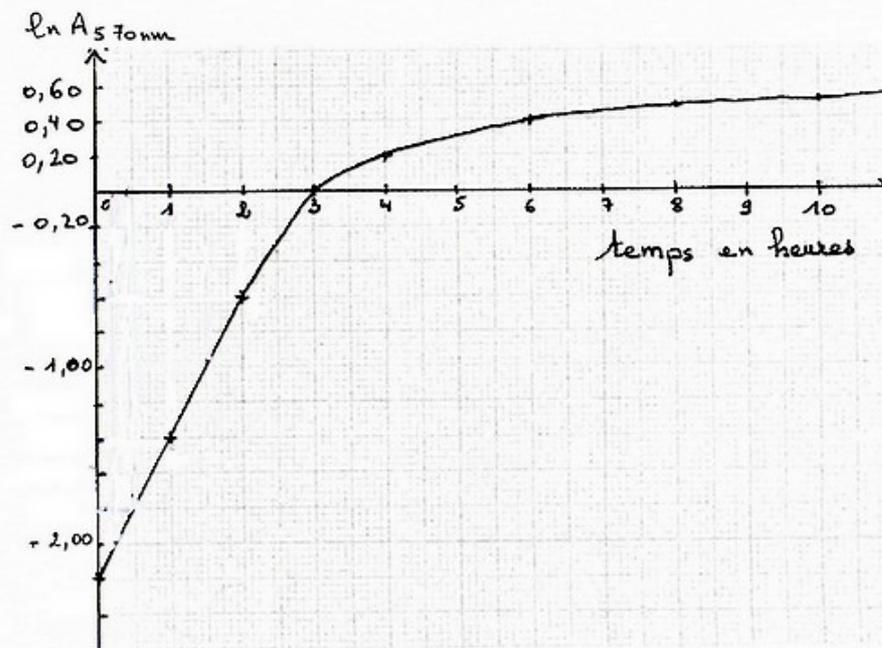
Document 4 : Composition du milieu défini (DM)

Par litre d'eau distillée :

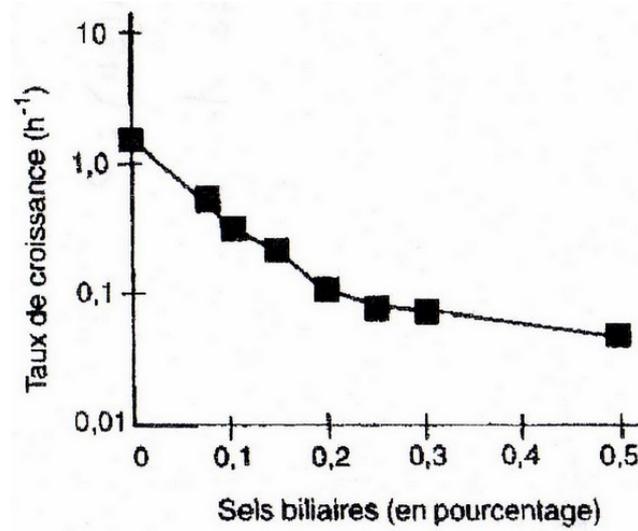
- 5 g glucose
- 1 g acétate de sodium
- 2 g NH_4Cl
- 0,6 g citrate de sodium
- 6,8 g KH_2PO_4
- 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- Sels d'oligoéléments
- Supplémentation en acides aminés (100 à 300 mg selon les acides aminés)
- Supplémentation en bases azotées (10 mg de chaque base)

Courbe de croissance d'*E. faecalis* en milieu défini (DM)

$\text{Ln } A_{570\text{nm}} = f(t)$



Document 5 : Influence de la concentration en sels biliaires sur le taux de croissance d'*E. faecalis*.



Document 6 : Effet de la glycine bétaine sur la croissance d'*E. faecalis* en condition de stress hypotonique/

