

TP n°6 Interrogation préliminaire

L'unité 52-23 de LTNRA a pour mission d'étudier la flore d'altération de la volaille après abattage.

Suite à un travail sur un lot de dindes, en provenance d'Angleterre, conservé pendant 10 jours en chambre froide, un technicien de cette unité a isolé sur milieu M (composition donnée en annexe 1) des colonies incolores qui avaient fait virer le milieu au bleu.

Une de ces colonies est mise en culture pour mener une étude d'identification.

Les résultats obtenus par le technicien sont repris dans le tableau de l'Annexe 2.

- 1- Donner le rôle des différents constituants du milieu M (annexe 1).
 Quel est l'aspect de ce milieu avant ensemencement ?
 De quel type de milieu s'agit-il ?
 Interpréter les résultats obtenus.
- 2- Qu'est ce qu'une peptone ?
- 3- Compléter le tableau de résultats de l'annexe 2.
- 4- Donner le but, le principe et la technique de la recherche de la coloration de Gram.
- 5- Donner le but, le principe et la technique de la recherche de l'oxydase.
- 6- Donner le but, le principe et la technique de la recherche de la nitrate réductase.

Annexe 1 : Composition du milieu M

COMPOSITION	QUANTITE	RÔLES
Eau	1 litres	
Extrait de viande	3 g	
Extrait de levure	3 g	
Peptone	15 g	
Thiosulfate de sodium	1 g	
Désoxycholate de sodium	1 g	
Cristal violet	0,0005 g	
Lactose	15 g	
Bleu de bromothymol	0,080 g	
Agar	11 g	
pH	7,4	

Annexe 2 :Galerie de famille de la souche isolée sur milieu M

	Tests et Milieux	Observations	Interprétations
J1	Étude microscopique : État frais et Gram	Gros coccobacilles roses groupés par 2. Immobiles.	
	Test de l'oxydase	Absence de coloration	
Proposition d'orientation			
J2	Type respiratoire sur VF	Voile bactérien en surface du milieu	
	Recherche de la nitrate réductase sur bouillon nitraté	- Ajoute de Nit1 et Nit2:milieu incolore - Ajout de poudre de zinc:milieu rose	
	Etude de la voie d'attaque du glucose sur milieu Hugh et Leifson	- Tube fermé : vert - Tube ouvert : jaune en surface	
Confirmer l'orientation en s'aidant éventuellement du tableau de l'annexe 3			

Annexe 3 : Tableau différentiel des bacilles Gram(-), aérobies stricts, faciles à cultiver

	Pseudomonas aeruginosa	Alcaligenes	Flavobacterium	Acinetobacter	Xanthomonas
Morphologie	Bacilles fins	coccobacilles	Bacilles fins	Diplobacilles parfois coccoïdes	bacilles
Mobilité	+	+	-	-	+
Type respiratoire	AS	AS	AS	AS	AS
Aspect des colonies sur milieux ordinaires	Pigmentées en bleu, vert, souvent plates, irrégulières, s'étalant en 48h	Non pigmentées, petites en 24h translucides	Pigmentées en jaune, petites en 24h	Non pigmentées, bombées, opaques	Pigmentées, jaunes
Oxydase	+	+	+	-	-
Nitrate-Réductase	+	d	-	-	-
Voie d'attaque du glucose	oxydatif	Inactif (Hugh-Leifson alcalinisé)	oxydatif	Oxydatif ou inactif	oxydatif

TP n°6 TP Contrôle

Jour 1

Travail sur la souche isolée sur gélose (notée S1 à S14) :

1- Réaliser une observation microscopique à l'état frais de la souche fournie sur gélose inclinée

2- Préparer une suspension bactérienne de cette souche

3- Observer la souche sur frottis coloré par la technique de Gram

4- Effectuer le test enzymatique nécessaire (catalase ou oxydase)

5- Proposer une orientation pour l'identification de cette souche et suggérer une galerie de milieux permettant de vérifier cette orientation. A faire avant

6- Ensemencer la galerie fournie

Travail sur bouillon (noté M1 à M14) :

1- Réaliser les observations microscopiques

2- Proposer 5 milieux d'isolement intéressants pour cette culture, en justifiant vos choix. A faire avant :.....

3- Réaliser des isolements sur les différents milieux fournis.

Milieux mis à disposition :

1° Pour l'identification de la souche GNI S₁₋₃₋₅₋₇₋₉₋₁₁₋₁₃

- 1GO
- 1VF en surfusion
- 1 bouillon nitraté
- 2 milieux Hugh et Leifson, en surfusion

Réactifs : +glucose à 30% et huile stérile

2° Pour l'isolement du bouillon, M₁₋₃₋₅₋₇₋₉₋₁₁₋₁₃

- GO
- 1 BCP
- 1 Hektoen
- 1 Chapman
- 1 BEA
- 1 gélose au sang + ANC

Jour 2

Travail sur la souche isolée sur gélose (notée S1 à S15) :

1- Lire les différents milieux ensemencés :

- GO
- VF
- Hugh et Leifson
- Bouillon nitraté

Présenter les résultats au sein d'un tableau en reprenant le caractère recherché, le milieu et les réactifs employés, les résultats obtenus et l'interprétation qui en est faite.

2- Conclure quant au genre ou à la famille du germe étudié.

Travail sur bouillon (noté M1 à M15) :

1- Lire les différents milieux ensemencés :

- GO
- BCP
- Chapman
- Hektoen
- BEA

Faire les observations microscopiques ainsi que les tests nécessaires à l'analyse des colonies observées.

Reprendre l'ensemble des résultats au sein d'un tableau comprenant, en ligne, les différents milieux et tests effectués, et en colonne, la ou les souches isolées du bouillon.

2- Conclure quant au genre ou à la famille du ou des germes isolés du bouillon.