**Gélose Viande foie**

Type respiratoire de la bactérie

Préparer un récipient d’eau froide

Faire fondre le milieu VF à partir de l’ébullition compté 20 minutes

5- 10 min dans bain marie

Ensemencer pipette pasteur fermée d’une suspension en remontant en spirale

Solidifier le milieu

Aéro-anaérobie facultatif (AAF)

Aérobie strict (AS )

Micro-aérophile

Anaérobie strict (AnS)

**Catalase**

Coques gram +

H2O2

Goutte d’H2O2 sur une lame

Milieu solide et aérobie , pipette pasteur boutonnée prélever et le mettre en suspension dans H2O2

**Oxydase**

Bacilles gram –

Déposer sur une lame propre un disque d’oxydase

Une goutte d’eau physio

A l’aide d’une pipette pasteur boutonnée prélever et déposer une colonie à étudier

Disque devient rose = oxydase +

**Mannitol mobilité**

Identification des entérobactéries

Ensemencer par piqûre centrale à la pipette boutonnée avec une suspension bactérienne pure

Etuver à 37 °C , 24 h

Si rouge = Mannitol –

Si jaune orangé = Mannitol +

Avec bulles = gaz +

Si pas de diffusion autour de la piqûre centrale = bactéries immobiles

Si diffusion autour de la piqûre centrale : bactéries mobiles

**Recherche nitrate réductase :**

Ajout 1 à 2 gouttes de réactif de greiss : Nitrate I et Nitrate II

Si rouge = nitrate réductase +

Si jaune :

Ajout de zinc

Si rouge = réductase –

Si jaune = réductase +

**Hugh et Leifson**

Voie d’attaque du glucose

Un tube avec paraffine l’autre sans

Faire fondre les deux tubes

Refroidir à 45 50 °C

Ajout de 7 gouttes de glucose

Mélanger et refroidir les tubes dans l’eau froide

Piqûre centrale => suspension bactérienne pure (même pipette)

Ajout de paraffine sur le tube ensemencé en premier

Dévisser légèrement les tubes

Etuve 37°C 24 h

Les deux tubes sont jaunes = métabolisme fermentatif

Le tube parffiné pas ou peu d’acidification = Métabolisme oxydatif

Acidification dans le tube paraffiné seulement = Métabolisme fermentatif seul

Pas d’acidification dans les deux tubes = métabolisme inerte

**Milieu CTA**

Voie d’attaque du sucre étudié

Faire fondre dans eau bouillante le tube CTA

Refroidir 45 50 °C

Ajout de gouttes d’une solution du glucide étudié

Mélanger et refroidir dans l’eau froide

Piqûre centrale un bouillon assez riche

Etuve 37°C 24h

Acidification dans tout le tube : métabolisme fermentatif du glucide (fermentation du glucide +

Acidification en surface : métabolisme oxydatif (oxydation du glucide +)

Pas de modification du milieu : souche n’utilisant pas le glucide

**Eau peptonnée**

Fermentation des glucides par les micro-organismes

Ajout du glucide à étudier

Ensemencer avec quelques gouttes de suspension bactérienne

Incuber 37°C 24h

Virage jaune = utilisation du glucide

+ cloche de durham = dégagement gazeux

Sucre + gaz +

**Esculine**

Esculetine produite réagit avec fer III forme un précipité noir

Piqûre centrale dans le culot avec bouillon bacterien

Incuber 37°C 24h

Forte coloration noir = Esculine +

Sinon = esculine –

**Kligler hajna**

Utilisation du glucose avec ou sans production de gaz

Utilisation du lactose

Production d’H2S

Recherche β-galactosidase

Ensemencer la pente avec stries serrées

Avec la même pipette piqûre centrale dans culot

Dévisser la capsule du tube

Incuber 18 à 24 h 37°C

Culot jaune = glucose +

Pente jaune = lactose +

Précipité noir = H2S +

**Recherche de β-galactosidase : ONPG**

Si lactose – sinon lactose + = β-galactosidase +

Prélever sur la pente du KH des bactéries

Réaliser une suspension riche dans 0.5 cm3 d’eau distillée

Ajout d’un disque d’ONPG

Incuber à 37°C 30 min

Jaune = β-galactosidase  +

Incolore = β-galactosidase –

**Gélatinase**

Film photo

Suspension dense avec eau physio

Ajout d’un morceau de film

Etuve 37°C 24 à 48 h

Eclaircissement du film + particules noires libérées = gélatinase +

Film intact = gélatinase –

**Milieu de Moeller LDC ADH ODC**

Deux gouttes de suspension bactérienne dense

Recouvrir la surface de paraffine

Incuber 37°C 24h

Si violet + trouble : les bactéries ont acidifié et réalcanilisé le milieu en utilisant l’acide aminé

LDC ou ADH ou ODC +

Si jaune acidifiction du milieu à partir du glucose

LDC ou ADH ou ODC –

**Urée indole**

Il permet la recherche de 3 activités enzymatiques

L’uréase

La tryptophane désaminase

La tryptophanase ( production d’indole)

Ensemencer à partir d’une culrure solide

Incuber 18 à 24h 37°C

**Uréase**

Rouge violacé = Uréase +

Reste brun orangé = Uréase –

Après lecture de l’uréase faire 2 tubes à partir du tube uréase :

**Tryptophane désaminase ( TDA )**

Ajout dans un des tubes 1 à 2 gouttes de chlorure de fer III

Si précipité coloration marron foncé = Tryptophane-désaminase + (TDA+)

Si coloration jaune = TDA-

**Indole (recherche de tryptophanase )**

Ajout dans le tube restant 2 à 3 gouttes du réactif de kovacs

Présence d’un anneau rouge = indole +

Reste jaune = indole –

**Bouillon de CLARK et LUBS**

La voie fermentative butane-diol conduit à la formation d’acétoine mit en évidence grace à la réaction d Voges-Proskauer (VP)

La réaction du VP identifie les bactéries pour le groupe Klebsiella , Enterobacter, Serratia VP+

Technique :

1er jour :

Ensemencer richement un bouillon Clark et Lubs

Incuber à 37°C 24 à 48 h

2eme jour :

Ajouter 2 gouttes de soude + 2 gouttes d’alpha-naphtol

Agiter et pour accélérer la réaction pencher le tube

Lecture après 10 min à T°C du labo

Lecture :

Apparition d’une coloration rouge à la surface => présence d’acétoine => fermentation de type « butane-diol » => VP+

Teinte rouge : présence d’acétoine => VP+

**Milieu de SIMMONS**

Les β possédant une citrate-perméase sont capables de se développer sur ce milieu

Technique :

Gélose en pente

Exige des précautions au niveau de l’ensemencement

Strie longitudinale à partir de colonies en milieu solide en évitant d’entrainer des traces de celui-ci

Ne prendre que la colonie en évitant d’étaler sur le milieu prélevé

Incuber à 37°C 1 à 10 jours, bouchon non bloqué

Lecture :

Bleuissement du milieu => β utilise le citrate comme seule source de carbone

Culture abondante avec bleuissement => β citrate

**VRBL Violet cristal, Rouge neutre, sel biliare, Gélose lactosée**

Recherche et dénombrement des coliformes

Agents selectifs : Cristal violet, sel biliaire => inhibe Gram +

Agents identifiants : Lactose, sel biliaires => virement rouge => fermentation lactose

Halo => précipité autour de colonies

Technique :

Dilution décimale

Incuber 30 ° coliformes

Incuber 44,5 coliformes fécaux

Lecture :

Dénombrer les colonies roses violacées cernées d’un halo

**VRBG cristal violet, rouge neutre, bile et glucose**

Recherche et dénombrement des enterobacteries dans l’eau prod laitiers et autres

Cristal violet et sels biliaires inhibent Gram+ et autres gram-

Virage au rouge + halo =>glucose +

Technique :

Dilution centesimale

Incuber 30 37°C

Lecture :

Dénombrements des colonies rouge violet cernées ou non d’un halo

**Milieu BCP ou bouillon Lactosé au BCP**

Détection et isolement des enterobactéries dans l’eau

=>contient un indicateur de pH pourpre de bromocrésol

Technique :

Lecture :

Colonies bleues => β lactose –

Colonies jaunes => β lactose +

**Milieu Hektoen**

Milieu d’isolement des entérobactéries Slmonelle Shigella

3 sucres (salmo et shigel n’attaquent pas ces glucides

Production H2S différencie Salmo H2S+ shigel H2S –

Technique :

Boite de pétrie

Lecture:

Les colonies sont bacilles gram –

Colonies bleues ou vertes n’utilisent aucun glucides

Saumon utilisent 1 ou plus glucides

**Gelose Salmonelle Shigella (Gelose SS)**

3 inhibiteurs : Sels biliares, vert brilliant, citrate sodium

Empechent la pousse des gram+ et rendent difficiles la pousse des gram- autres que salmo et shigel

Identificateur lactose et thio

Technique :

 comme géloses quadrants

Lecture :

Colonies rouges => lactose +

Incolores => lactose –

A centre noir => H2S +

**Gelose CHAPMAN**

En tube ou en boite ; isolement dénombrement et identification présomptive de staphylococcus auréus

Forte concentration de NaC l> halophile

Fermentation du manitol > virage au jaune

Lecture

staphylocoque doré forme des colonies entourées d’un halo jaune

il faut confirmer par test de coagulase

**RAPPAPORT VASSILIADIS**

Bouillon = enrichissement selectif

Dans la recherche des salmonelles

**SELENITE**

Bouillon au selenite de sodium

Enrichissement selectif

Recherche des salmonelles

Technique :

Ajout d’1 à 2 grammes de selles ou 10 à 20 % d’inocumlum du volume utilisé

Homogénéiser

Incuber 37°C 24 heures

**Milieux KING**

KING A pyocyanine > pseudomonas aeruginosa

KING B pyoverdine

Technique :

À partir d’une culture sur gélose solution en eau distillée

Ensemencer en faisant une strie à la surface de la gélose

Incubé en aérobiose

Lecture

\_ couleur bleu sur KING A présence de pyocyanine

\_couleur jaune vert fluorescent sur KING B > pyoverdine + sous UV

**MILIEU BAIRD PARKER**

Milieu très sélectif

Isolement et dénombrement des staphylococcus à coagulase +

Lecture :

Halo claire > hydrolyse des lipoprotéines du jaune d’œuf

Colonies noires > réduction du tellurite de potassium en tellure métallique

Caractéristiques des staphylococcus auréus

**Bouillon Cœur cervelle**

Milieu riche utilisé pour recherche de la staphylocoagulase et de la thermonucléase des staph

Technique :

Ensemencer le bouillon avec qlqs gouttes d’inoculum

Incuber 37°C 24 h

Lecture :

Obser la culture => bouillon riche

Examens complémentaires au milieu

🡪**staphylocoagulase**

Permet de rechercher la coagulase libre (coagulation du plasma de lapin)

Technique :

Dans tube à hémolyse placer 0.5 mL de plasma de lapin + 0.5mL bouillon cœur cervelle

Incuber 37°C

Observer caillot toutes les demi heures

Lecture :

Coagultion du plasma = coagulase +

Sinon coagulase –

( seule staph auréus = coagulase +)

🡪**Thérmonucléase ou dnase thermostable**

Mise en évidence de la DNAse thermostable propre aux staphes auréus

ADN et bleu de toluidine

ADN seule

Technique :

Fondre la gélose choisie et couler dans petite boite

Mettre moitié du cœur cervelle de staphe de 24h dans tube en verre

Chauffer ce bouillon 15 min

Laisser refroidir

3 trous dans gelose

Identifier 1.2.3 ou s terile c chauffé ta non chauffé

Inoculer dans les puits

Incuber 4h minimum

Lecture :

**🡪Gelose adn avec bleu de toluidine**

Halo rose = DNase

Si puit 1 rose = recommencer

Si 3 rose et 2 reste bleu = thermonucléase –

Si 2 et 3 rose = thermonucléase +

**🡪ADN seule**

+strie

Ajout de hcl

Halo autour de la strie = thermonucléase +

**Milieu MEVAG**

Milieu d’identification

Mise en évidence de la fermentation du glucose

Technique :

Piqûre centrale (comme VF)

Dévisser légèrement le bouchon

Incuber 24 h 37°C

Lecture :

Culture sur toute la hauteur du tube + virage au jaune = en faveur du genre staphylocoque

Culture en haut du tube + virage limité en haut = genre microcoque