*Université : Larbi Ben M’Hidi, Oum el Bouaghi*

*Faculté : Institut des sciences techniques et appliquées (ISTA)*

*Département : Génie Biologique*

*Filière : Sciences alimentaires*

***Spécialités : Valorisation et qualité des produits agroalimentaires***

***Niveau : L1/S2 (2019/2020)***

***Enseignant : LATRECHE BILAL***

***Module : Méthodes analytiques microbiologie et sécurité***

***TP 02 :***

***Identification préliminaire des microorganismes : Essai pour Staphylococcus aureus (Staphylocoque) et Escherichia Coli (Entérobactérie)***

***Introduction***

*Les techniques utilisées pour l'identification des microorganismes sont nombreuses et varient en fonction de la nature du germe étudié : levure, moisissure, bactérie, ou même en fonction du groupe bactérien. L'identification peut se réaliser à partir caractères morphologiques, culturaux, biochimiques, physiologiques, immunologiques et génétiques.*

***Objectif***

*Objectif : Apprendre* ***quelques*** *testes utilisés pour la caractérisation* préliminaire des microorganismes

*Pour une identification préliminaire de ces microorganismes, on va basés sur des études :*

* *Macroscopique ; les colonies sont observées à la loupe binoculaire afin de déterminer l’aspect des colonies en surface sur milieu solide.*
* *Microscopiques (les formes caractéristiques des cellules microbiennes, et la coloration de Gram).*
* *Test de la catalase.*

|  |
| --- |
| ***Réactifs*** |
| *Eau distillée* |
| *Cristal violet* |
| *Lugol* |
| *Alcool absolu* |
| *La fuschine* |
| *Huile à immersion* |
| *l'eau oxygénée* |

***Matériel et produits***

|  |
| --- |
| ***Matériel***  |
| *La loupe binoculaire* |
| *Microscope* |
| *Lames et lamelles*  |
| *Anse de platine* |
| *Bec benzène* |

***Mode opératoire***

1. ***Examen macroscopique des cultures****: l’aspect (Forme : ronde, irrégulière ou en étoile) et la couleur (pigmentation) des colonies est déterminé sous la loupe binoculaire.*
2. ***Coloration différentielle de Gram****.*
* *Déposer une goutte d’eau distillée stérile sur une lame propre.*
* *Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d’eau, strier et sécher par passage rapide sur la flamme d’un bec benzène.*
* *Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.*
* *Laver l’excès du colorant avec de l’eau distillée.*
* *Couvrir de lugol pendant 30 secondes*
* *Laver à l’eau distillée pendant 5 secondes*
* *Rincer immédiatement le frottis avec l’alcool absolu inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu‘à disparition complète de la coloration violette*
* *Laver à l’eau distillée pendant 5 secondes*
* *Couvrir avec de la fuschine pendant 15 secondes.*
* *Laver à l’eau distillée pendant 10 secondes*
* *Déposer une goutte d’huile à immersion sur le frottis et observer au microscope.*
* *Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.*
1. ***Test de la catalase***

*La catalase est une enzyme de haut poids moléculaire existant chez toutes les bactéries aérobies, elle leur permet de vivre en présence d'oxygène. En plus de la chaîne respiratoire des cytochromes, il existe en effet chez les bactéries aérobies une chaîne accessoire courte, fixant l'hydrogène sur l'oxygène en aboutissant à de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène). La catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée selon la réaction :*

**2H2O2** $\rightarrow $ **2H2O + O2**

*La recherche de cette enzyme est effectuée simplement par la mise en contact d'une colonie avec une goutte d'eau oxygénée (H202) à 10V. Un dégagement gazeux abondant traduit la présence d'une catalase.*

***Questions***

1. *Noter les observations pour chaque teste.*
2. *Expliquer ces résultats.*
3. *Donner votre conclusion générale.*