Les milieux de culture

LE MILIEU UREE TRYPTOPHANE

Appelé improprement milieu Urée Indole le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique (milieu dont la composition est connue exactement tant qualitativement que quantitativement). C'est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens, notamment parmi les *Enterobacteriaceae*.

Composition

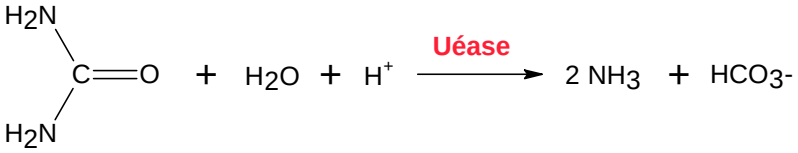
Formule en g/L d'eau distillée :

L-tryptophane	**3g**
Urée	**20g**
Hydrogénophosphate de potassium	**1g**
Dihydrogénophosphate de potassium	**1g**
NaCl	**5g**
Alcool à 95°	**10mL**
Rouge de phénol	**25mg**
Eau distillée (qsp)	**1L**

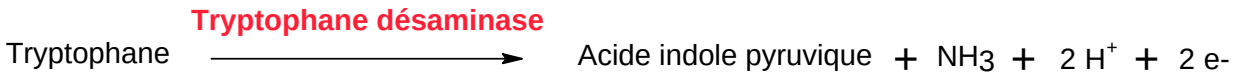
Principe

Ce milieu ne contient pas de source de carbone utilisable, les bactéries ne pourront pas se multiplier.
Trois activités enzymatiques peuvent être recherchées à partir de ce milieu :

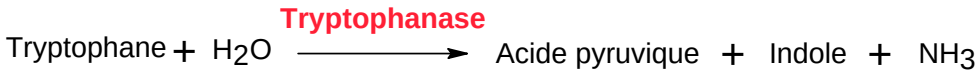
✓ **l'uréase**, enzyme hydrolysant l'urée , activité directement détectable par le suivi de l'alcalinisation



✓ **la tryptophane désaminase** (TDA), après addition de chlorure de Fer III. Le Fer III forme un complexe avec le produit de l'activité de la TDA, l'acide indole-pyruvique, complexe décelable par la formation d'un précipité marron



✓ **la tryptophanase**, après addition du réactif de Kovacs. Le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenu dans le réactif de Kovacs réagit avec l'indole, produit de l'activité de la tryptophanase, et forme un composé coloré en rouge.



Technique

Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane
Etuver
Lire

Résultats

✓ Uréase

- La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée : **uréase+**
- La coloration orange ou jaune montre l'absence d'hydrolyse de l'urée : **uréase -**

✓ Tryptophane désaminase (TDA)

Ajouter le réactif chlorure de Fer III dans un aliquote du milieu Urée Tryptophane ensemencé et incubé. En présence d'acide indole-pyruvique il y a formation d'un complexe acide indole-pyruvique/FeIII qui précipite. La lecture est immédiate.

Pierre-Yves Guillaume
Professeur de biotechnologie génie biologique

- Obtention d'un précipité brun foncé : **TDA +**
- Absence de précipité : **TDA -**.

✓ Tryptophanase

Le réactif utilisé pour détecter l'activité de la tryptophanase est le réactif de Kovacs, dont la composition est la suivante :

Diméthyl-amino-4-benzaldéhyde	50g
Acide chlorydrique pur	250 mL
Pentanol-1 (qsp)	1000 mL

Ce réactif est toxique. Manipuler avec précaution.

Le noyau indole, produit par l'activité de la tryptophanase, réagit avec la fonction aldéhyde du diméthyl-amino-4-benzaldéhyde pour donner un composé quinoïdal coloré en rouge. Ce complexe est extrait et concentré dans la phase alcoolique du réactif.

Ajouter le réactif de Kovacs dans un aliquote du milieu Urée Tryptophane ensemencé et incubé.

Absence de coloration rouge : **indole -**

Formation d'un anneau rouge : **indole +**

Pierre-Yves Guillaume
Professeur de biotechnologie génie biologique