

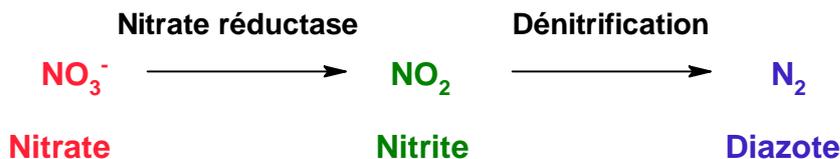
RECHERCHE DE LA NITRATE – REDUCTASE A

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne.

Principe

Au cours de ce test, on recherche la production d'une enzyme : la nitrate-réductase par la bactérie. Cette étude va donc consister à mettre en évidence le métabolite nitrite ou la disparition des nitrates initiaux.

La réduction des nitrates par la nitrate réductase se traduit par la production de nitrites. Parfois, certaines bactéries peuvent poursuivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.



Ce test va consister à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture. S'ils sont présents, ils donnent une réaction colorée rose en présence d'acide sulfanilique et de naphthylamine. Ces réactifs portent le nom de réactifs de GRIESS.

En l'absence de nitrites, on va rechercher la disparition des nitrates par addition de zinc : en effet le zinc réduit les nitrates en nitrites.



Les réactifs des nitrites sont toujours présents. Deux cas sont possibles :

- ⇒ Coloration rouge : les nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrites par le zinc et ont réagi avec les réactifs, la nitrate réductase est donc négative.
- ⇒ Pas de coloration rouge : au contraire les nitrates du milieu ont été réduits par les bactéries et l'addition de zinc ne peut produire de nitrites. La nitrate réductase est donc positive jusqu'au stade azote.

Remarque : La bactérie produit cette enzyme quand elle est cultivée en anaérobiose (elle est inhibée par l'oxygène).

Technique

La recherche va s'effectuer :

- ✓ Soit à partir de milieu gélosé nitraté,
- ✓ Soit à partir de bouillon nitraté à 10 g.dm⁻³,
- ✓ Soit à partir du milieu mannitol mobilité,
- ✓ Cupule GLU galerie API 20E.

Après lecture des milieux, ajouter à la surface du milieu 3 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine. Mélanger, observer.

Lecture

- Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. **Résultat NR+**
- Le milieu reste inchangé : on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase vis à vis des nitrates.
 - ✓ Coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. **Résultat NR-**

Les tests en microbiologie

✓ Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. **Résultat NR+**

Causes d'erreurs : utilisation d'un milieu ne contenant pas de nitrates, réalisation du test à partir d'un milieu glucidique, un glucide ayant été attaqué, une fermentation peut cacher une respiration nitrate (cas API 20E), culture insuffisante, réactifs périmés.



Après ajout de la poudre de zinc coloration rouge : on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme. **Résultat NR-**



Après ajout de la poudre de zinc pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme. **Résultat NR+**



Après ajout de 3 gouttes d'acide sulfanilique puis 3 gouttes d'alpha naphthylamine
Le milieu devient rouge : présence de nitrites. Donc la bactérie possède une nitrate réductase. **Résultat NR+**

Technique rapide

- réaliser une suspension très dense de la bactérie à étudier dans 0,5 mL de solution de nitrate potassium à 10 g/L
- incuber 2 h à 37°C
- ajouter 1 à 2 gouttes des réactifs, mélanger, observer.
- l'utilisation du zinc ne semble pas possible en un temps aussi court.