

Fiche Technique : Dosage Volumétrique Acido-Basique

Vous disposez de 2x3 fioles d'Erlenmeyer préparées avec un volume précis d'acide chlorhydrique et un indicateur de pH variable :

- Bleu de bromothymol qui vire du **jaune** au **vert** à l'équivalence
- Rouge neutre qui vire du **rouge** au **jaune** à l'équivalence
- Pourpre de bromocrésol qui vire du **jaune** au **pourpre** à l'équivalence

1. Protocole

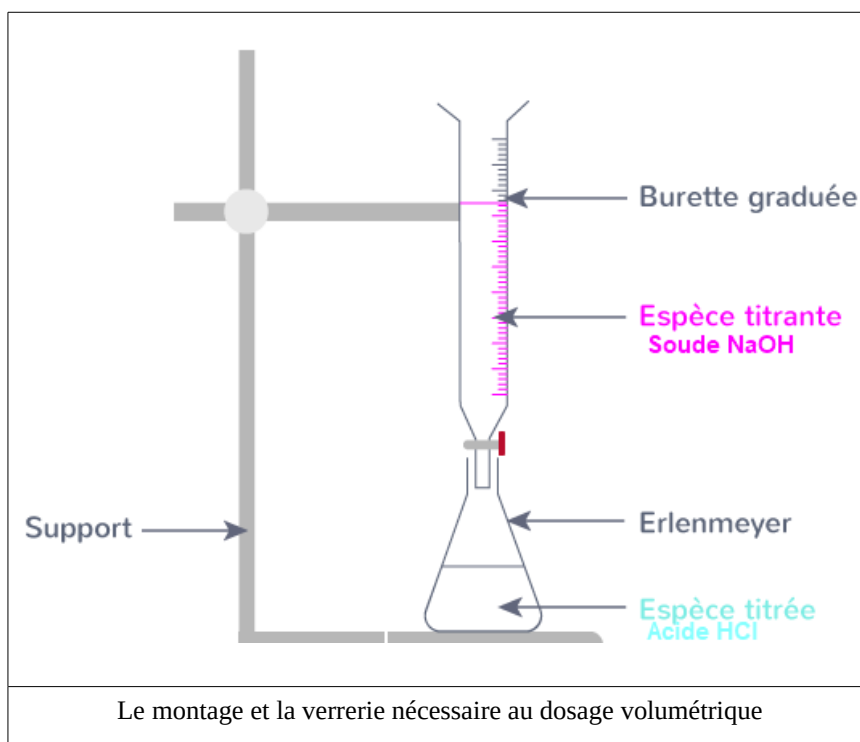
Introduire la solution de soude (NaOH) dans la burette et ajuster au zéro.

Doser l'acide présent dans l'Erlenmeyer en faisant couler la soude lentement et en agitant continuellement.

Stopper dès la persistance du virage au-delà de 10 secondes.

Relever le volume équivalent obtenu. Une deuxième fiole d'Erlenmeyer est disponible pour affiner le résultat obtenu.

2. Schéma Du Dosage



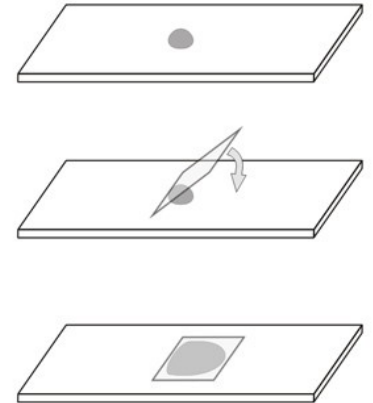
Fiche Technique : Observations Microscopiques

1. L'État Frais

L'examen à l'état frais permet d'observer des **bactéries vivantes**, et de déterminer si elles sont **mobiles**. On peut alors en déduire leur type de **ciliature**. Ce critère peut vous aider à discriminer vos souches candidates. Cet examen microscopique est réalisé ici à partir de culture en milieu liquide. La mobilité constitue un caractère d'**identification**.

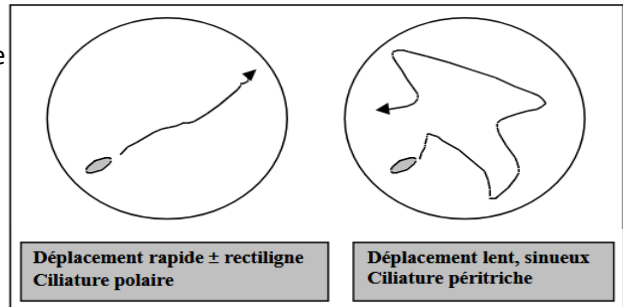
Procédure Opératoire

- Agiter délicatement la suspension bactérienne par roulement du tube entre les mains.
- Prélever un peu de suspension bactérienne avec l'anse métallique ou la pipette Pasteur,
- Déposer une petite goutte au centre de la lame propre et sèche.
- Déposer **délicatement** la lamelle sur la goutte en évitant de former des bulles. Pour cela :
 - incliner la lamelle à 45° près de la goutte, sans la toucher.
 - laisser doucement descendre la lamelle
 - la suspension doit occuper le centre de la lamelle.



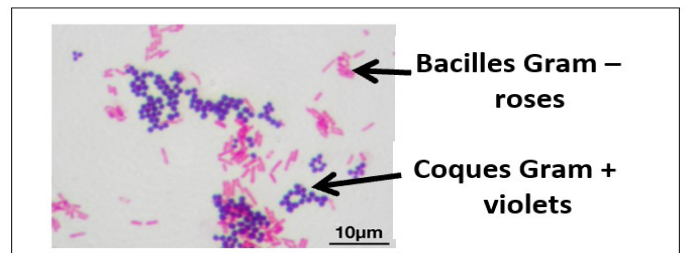
Mise Au Point Et Lecture

- ✗ L'observation est réalisée au grossissement x 400.
- ✗ Régler l'éclairage pour avoir une faible luminosité :
 - Diaphragme semi-ouvert
 - Condensateur bas
 - Intensité lumineuse faible
- ✗ **Décrire** le mouvement.
- ✗ **En déduire** la ciliature.



2. La Coloration De Gram

Conditions d'observation d'un Gram	
Objectif	X 100 Avec huile à immersion
Eclairage	Pleine lumière : ☞ diaphragme ouvert ☞ condensateur monté ☞ Variateur à fond



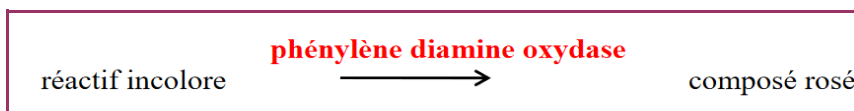
Fiche Technique : Recherche De L'Oxydase

La cytochrome oxydase ou « **oxydase** » est une enzyme qui fait partie de la chaîne respiratoire de certaines bactéries qui utilisent le dioxygène pour produire de l'énergie (respiration aérobie).


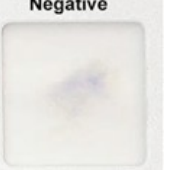

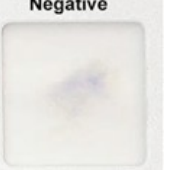

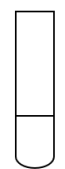

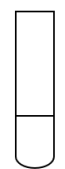

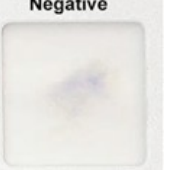

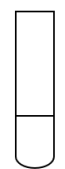
On cherche à savoir si la bactérie peut oxyder un composé réduit incolore, en sa forme oxydée rose-violacée. **La recherche de l'oxydase permet de distinguer les différentes bactéries Gram –.**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme .

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif incolore qui devient rose-violet lorsqu'elle agit.



Le réactif est pré-imprégné sur un papier (bandelette/disque/carré).

TEST SUR LAME	TEST EN TUBE												
1. Manipulation													
<ul style="list-style-type: none"> Sur une lame propre et sèche, déposer le disque imprégné de « réactif d'oxydase » à l'aide d'une pince stérile. Humidifier le disque avec une goutte d'eau distillée. ! Attention ne pas inonder le disque ! Avec une pipette Pasteur boutonnée prélever une colonie sur une gélose nutritive de préférence (ou plusieurs colonies <u>identiques</u> si elles sont trop petites). Déposer le prélèvement sur le disque, laisser la pointe de la pipette en contact avec le disque pendant une quinzaine de secondes. 	<ul style="list-style-type: none"> Avec une pipette Pasteur boutonnée prélever une colonie sur une gélose nutritive de préférence (ou plusieurs colonies <u>identiques</u> si elles sont trop petites). Réaliser une suspension dense dans de l'eau distillée stérile contenu dans un tube à hémolyse. Plonger la bandelette « test oxydase » et lire le résultat en 60 secondes maximum 												
2. Lecture													
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="text-align: center; width: 50%;">Positive</td> <td style="text-align: center; width: 50%;">Négative</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"></td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Coloration violette</td> <td style="text-align: center;">Aucune coloration</td> </tr> </table>	Positive	Négative			Coloration violette	Aucune coloration	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="text-align: center; width: 50%;">Positive</td> <td style="text-align: center; width: 50%;">Négative</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;"></td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Coloration violette</td> <td style="text-align: center;">Aucune coloration</td> </tr> </table>	Positive	Négative			Coloration violette	Aucune coloration
Positive	Négative												
													
Coloration violette	Aucune coloration												
Positive	Négative												
													
Coloration violette	Aucune coloration												
Observation	Interprétation	Conclusion											
Apparition d'une coloration violette.	La bactérie possède une activité oxydase.	La bactérie est oxydase +											
Pas de coloration violette.	La bactérie ne possède pas d'activité oxydase.	La bactérie est oxydase -											

Fiche Technique : Recherche De La Catalase

En présence d'oxygène, certaines réactions chimiques dans les bactéries aboutissent à la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Or ce composé est un poison cellulaire qui peut être dégradé par la cellule bactérienne, grâce à la présence d'une enzyme : **la catalase**.

La catalase est présente chez toutes les bactéries Gram -, en revanche ce n'est pas le cas pour les bactéries Gram +. **La recherche de la catalase permet donc de distinguer les différentes bactéries Gram +**

La réaction catalysée par la catalase est la suivante :



1. Manipulation

- **Introduire** dans un tube à hémolyse, quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) à l'aide d'un compte-gouttes.
- **Prélever** une colonie isolée, la **dissocier** dans l'eau oxygénée.

2. Lecture

Observation	Interprétation	Conclusion
Présence de bulles d'oxygène	La bactérie possède l'enzyme catalase.	La bactérie est catalase +
Absence de bulles d'oxygène	La bactérie ne possède pas l'enzyme catalase.	La bactérie est catalase -

3. Causes d'erreurs

- Si la recherche est effectuée à partir d'une gélose au sang.
- Culture bactérienne insuffisante (culture en bouillon par exemple).
- Eau oxygénée périmée.

Fiche Technique : Chromatographie Sur Couche Mince

La CCM (Chromatographie sur Couche Mince) est une méthode de séparation et d'**identification** des constituants d'un mélange. On parle aussi de chromatographie d'adsorption sur couche mince

Procédure Opératoire

- Activer la plaque de gel de silice à l'étuve. Laisser refroidir dans le dessiccateur.
- Saturer la cuve à chromatographie afin de la remplir de vapeurs de solvants.
- Préparer la plaque au crayon à papier (ligne de dépôt + emplacement des dépôts équidistants)
- Réaliser les dépôts des 3 solutions témoins et de l'ingrédient 5 à l'aide d'un cure-dent.
 - utiliser un cure dent différent pour chaque dépôt.
 - effectuer 3 dépôts successifs (= en trois fois), en séchant entre chaque dépôt au moyen d'un sèche-cheveux (le diamètre des dépôts ne doit pas excéder 2 mm)
- Déposer délicatement la plaque dans la cuve à chromatographie. Refermer la cuve.
- Laisser se développer le chromatogramme = laisser migrer la phase mobile jusqu'à 3 cm du haut de la plaque.
- Sortir la plaque de la cuve avec des gants et tracer immédiatement à main levée, la ligne de front du solvant au crayon à papier.
- Sécher au sèche-cheveux ou placer à l'étuve à 100 °c pendant 5 min.
- Révéler l'apparition des spots en plaçant la plaque sous la rampe UV.
- Entourer les spots au crayon puis recouvrir de film transparent.

Interprétation

Comparer les spots des témoins à celui de l'ingrédient 5 et conclure sur la nature de ce dernier

