

TEST ONPG : RECHERCHE DE LA β galactosidase

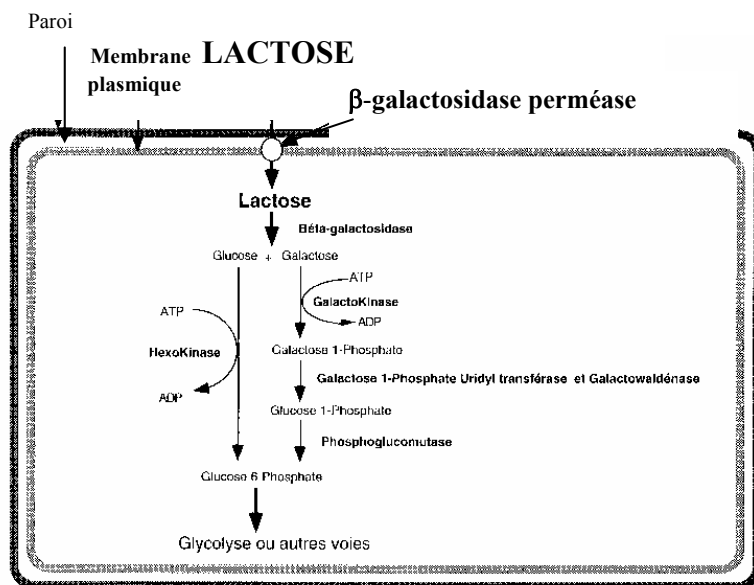
Ce test est pratiqué pour toute bactérie lactose - en 24 h, AF et peu exigeantes.

Rappels

La recherche de la β -galactosidase est un des premiers tests enzymatiques réalisés en pratique courante.

Il est particulièrement important pour les entérobactéries

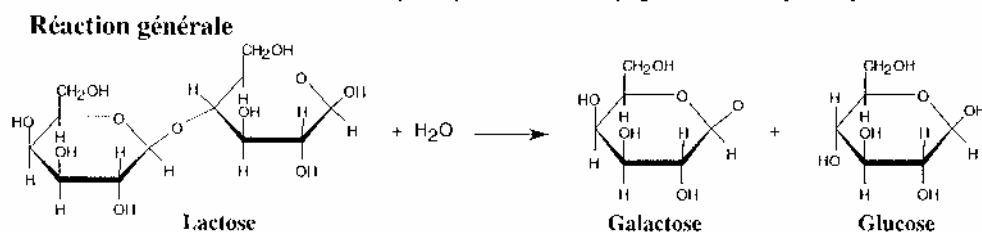
Cette recherche explore la présence d'une enzyme du métabolisme du lactose :



La dégradation du lactose par les micro-organismes passe par sa transformation en glucose.

Elle n'est possible que si ces micro-organismes possèdent :

- ✓ une β -galactoside-perméase membranaire qui permet la pénétration du lactose au travers de la membrane plasmique ;
- ✓ une β -galactosidase qui catalyse son hydrolyse en glucose et galactose.



Ces deux enzymes sont synthétisées par la bactérie seulement s'il y a dans le milieu du lactose : on dit qu'elles sont **inductibles**.

La dégradation du lactose devient complète quand le micro-organisme possède l'équipement enzymatique catalysant l'isomérisation du galactose en glucose.

Un micro-organisme lactose+ doit être capable de métaboliser le glucose par une voie comme la glycolyse.

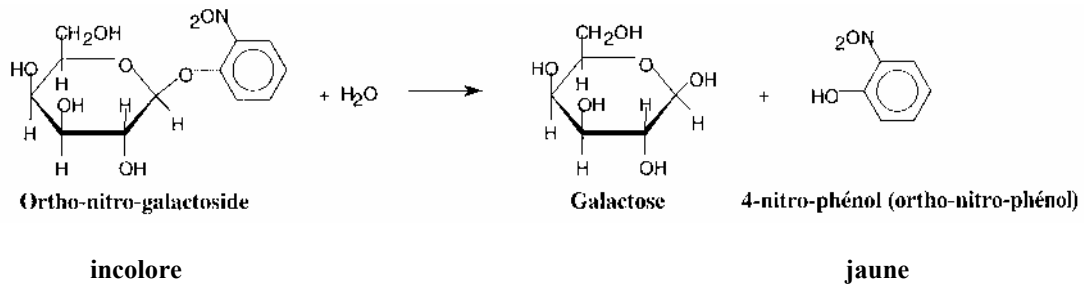
Un micro-organisme lactose + est donc toujours à la fois β galactoside-perméase +, β galactosidase +, glucose +.

Un micro-organisme peut être **lactose -** du fait de l'absence de l'une ou l'autre de ces enzymes ou protéines. Plusieurs cas :

β galactoside-perméase +,	β galactosidase -,	glucose +
β galactoside-perméase-,	β galactosidase +,	glucose +
β galactoside-perméase-,	β -galactosidase -,	glucose +
β galactoside-perméase-,	β -galactosidase -,	glucose -

Principe

La β gal peut-être mise en évidence facilement car elle est capable d'hydrolyser toute molécule analogue du lactose. En laboratoire, on utilise l'ONPG ou **Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside**.



Remarques :

Des bactéries dépourvues de β galactoside-perméase, la rencontre de l'enzyme et du substrat n'est possible qu'à l'occasion d'une lyse bactérienne (sauf si le substrat artificiel pénètre). Ce phénomène est permanent dans une suspension bactérienne. On peut cependant l'amplifier en ajoutant à la suspension une goutte de toluène.

La réaction utilisant l'ONPG n'est pas parfaite: en effet, des bactéries possèdent une activité ONPG-hydrolase tout en étant incapables d'hydrolyser le lactose; elles sont ONPG+ et lactase-. On peut penser qu'elles possèdent une enzyme qui reconnaît le substrat ONPG du côté du 2-nitro-phénol et non du côté /3-galactoside. Le terme d'ONPG hydrolase est donc préférable au terme de β galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose.

En résumé:

ONPG hydrolase - = β galactosidase - en général

ONPG hydrolase + = lactase - ou lactase +

Technique

Le test se pratique uniquement chez les bactéries lactose - en 24 h sur milieu solide.

A partir : de Kligler ou milieu lactosé BCP ou CLED...

- réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée.
- ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.
- incuber 30 min à 37°C.
- lire

Cupule de la galerie API 20 E ONPG -thio-galactoside

- Ensemencer avec la suspension d'une colonie en eau distillée (en général)
- Lecture identique à la technique classique

Lecture



Test ONPG -



Test ONPG +