

Matière
Physiologie et Génétique Bactérienne
(PGB)
TP

**TP 1 : EXAMEN MICROSCOPIQUE :
PAR COLORATION DE GRAM**

 **BUT :**

Il permet l'étude microscopique des bactéries mortes après fixation et coloration. La coloration de GRAM permet de différencier des bactéries dites **Gram +** de bactéries dites **Gram -**.

Cette méthode permet d'observer :

- la MORPHOLOGIE des bactéries
- le MODE de GROUPEMENT
- la COULEUR : gram + ou -
- la DENSITE ou PROPORTION de chaque microorganisme en cas de mélange

 **MATERIEL NECESSAIRE :**

- une lame
- du Violet de Gentiane (ou Violet Cristal sous forme sèche)
- du lugol
- de l'alcool (éthanol à 95°) très peu dilué
- de la Fuschine fraîchement préparée
- de l'eau déminéralisée
- du papier filtre
- microscope photonique : objectif x 40 et x100

 **TECHNIQUE :**

1. Prélèvement :

- A partir d'une culture liquide : prélever un aliquote de suspension à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisée le milieu
- A partir d'un milieu solide : réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile)
- A partir de produits alimentaires ou biologiques : prélever un aliquote du produit (dilué ou non) à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisée le milieu

2. Réalisation du frottis:

Étaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame

Le frottis réalisé doit être :

- MINCE et HOMOGENE, étendu sur la lame sans toucher les bords
- Réalisé sur une lame PROPRE et DEGRAISSEE, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.



3. Séchage :

- à la température du laboratoire, si possible
 - ou bien à **chaleur douce** : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante.
- NE JAMAIS CHAUFFER BRUTALEMENT

4. Fixation :

But : tuer les bactéries, fixer leur structure cytotogique, et les faire adhérer à la lame.

- Fixation par la chaleur :
 - à utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de **cultures bactériennes**
 - passer la lame **-frottis situé sur le dessus-** dans la flamme chauffante, LENTEMENT et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir.
- Fixation par l'alcool : employé **quel que soit le produit traité.**
 - recouvrir la lame pendant 5 min avec de l'alcool puis rincer à l'eau déminéralisé et égoutter le frottis avant coloration.

5. Coloration :

Principe : Cette coloration est une coloration complexe qui permet de différencier les bactéries d'après leur forme et leur affinité pour les colorants.

La coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – grâce à leurs différences de nature de paroi. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine et riche en lipides, alors que les bactéries Gram positifs ont une paroi épaisse et pauvre en lipide.

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
COLORATION PRIMAIRE	- Recouvrir la lame de crystal violet ou violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée et récupérer le crystal violet dans un bêcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration)	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
MORDANÇAGE	- Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter	1 minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
DECOLORATION	- Tenir la lame inclinée et faire couler pendant <u>quelques secondes</u> de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore. - Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter	5 secondes environ	L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores. Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.
COLORATION SECONDAIRE	- Recouvrir la lame de fuschine - Rincer à l'eau distillée	1 minute	La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram – ou négatif.
SECHAGE	- Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher		

6. Mise au point :

- Repérer les bactéries à l'objectif x40.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis

- Faire la mise au point en forte luminosité (condensateur levé et diaphragme ouvert) objectif x100.
- Se placer dans un endroit où la répartition des bactéries est homogène et la coloration nette
- Eliminer les lames dans le bocal déchets non infectieux

7. Observations :

On peut noter la morphologie des bactéries et la coloration de celles-ci : **les bactéries violettes sont dites Gram positives, celles qui sont roses sont dites Gram négatives.** On peut également noter l'homogénéité de coloration de la bactérie.

- Présentation des résultats d'observation :

COLORATION DE GRAM objectif x 100 (grossissement 1000) + huile à immersion				
FORME	TAILLE	GRAM	GROUPEMENT	POLYMORPHISME
Bacilles Bouts arrondis Bords parallèles	Taille moyenne et fin 3 µm x 1 µm et d'autres plus petits 2µm x 1µm	- homogène	Paires Isolés Chaînettes amas	- ou + de taille ou de coloration