

## TP N°: 04 COLORATION DES SPORES

**OBJECTIF :** application des étapes de la coloration - mise au point de la spore bactérienne – (l'étudiant sera capable de réaliser la coloration de spore et différencier entre la forme de l'endospore et celle de la cellule végétative)

**Observation :** c'est à l'étudiant de déduire de son observation les résultats : **position de la spore, Couleur, forme, libre ou dans la cellule**

### **Introduction aux étudiants**

Les bactéries comme les genres *Bacillus* et *Clostridium* produisent une **structure** résistante capable de survivre pendant de longues périodes dans un environnement défavorable et puis de produire une nouvelle cellule bactérienne (schéma A). Cette structure s'appelle **endospore** puisqu'elle se développe dans la cellule bactérienne. Les endospores ont la forme sphérique à elliptique et peuvent être plus petites ou plus grandes que la cellule bactérienne mère. La position de l'endospore dans la cellule est caractéristique et peut être centrale, subterminale, ou terminale. Les endospores ne colorent pas facilement, mais, une fois colorées, elles résistent fortement à la décoloration. Les endospores sont colorées avec le vert de malachite. La chaleur est employée pour assurer la pénétration du colorant. Le reste de la cellule est alors décoloré et contrecoloré avec la safranine ou fuchsine (rose).

### **Microorganismes :**

- Culture en boîtes de bactérie : *Bacillus* sp. La culture doit être vieille (âgée de 3 à 4 semaines au minimum).
- Possibilité d'utilisée une culture en tube (liquide) du même âge.

### **Matériels:** (pour un poste)

- microscope + huile d'immersion+ papier Joseph + acétone.
- Lames propres + pince pour lames (en bois)
- Bain-marie (bêcher de 250 ml contenant 100ml d'eau distillée sur une plaque chauffante "schéma")
- Anse de platine
- Bac de coloration
- Porte-lames
- Pissette d'eau distillée
- Pince en acier (pour le prélèvement du papier souillé).
- Batterie de colorants (des flacons compte-gouttes de : solution de **vert de malachite** et de **fuchsine**)
- Bac de lavage des lames utilisées
- Papier absorbant blanc
- Eau de Javel (pissette)

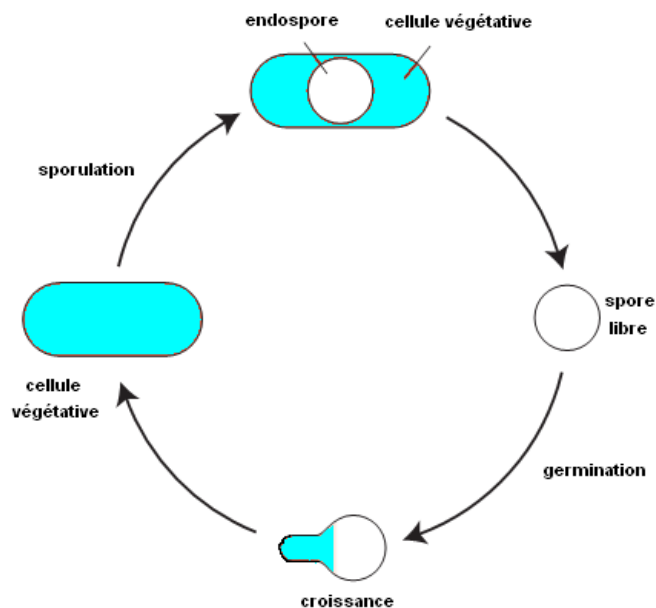
### **Préparation d'un frottis**

Le **frottis** est réalisé de la même manière précédente (coloration de GRAM)

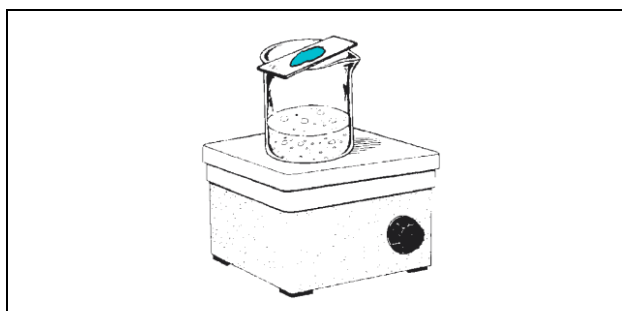
### **Coloration de la spore**

#### **Après préparation du frottis, suivre les étapes suivantes :**

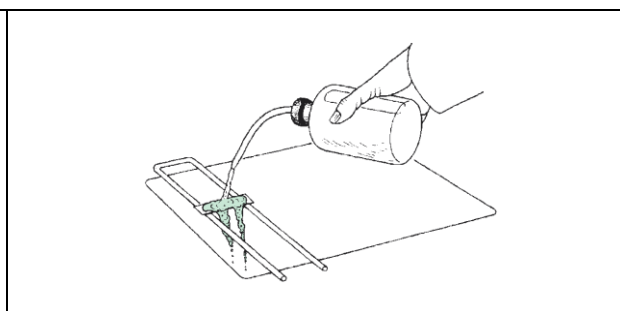
1. Couvrir le frottis par un papier absorbant puis le saturer par une solution de vert de malachite (ajouter le vert de malachite goutte à goutte sur tout le papier qui a les mêmes dimensions que la lame)
2. Chauffer sur eau bouillante (bain marie fig. 1) pendant **5 à 6 min** : une fois que la vapeur (évaporation du vert de malachite) commence à s'échapper du papier, ajouter le vert de malachite et ne laisser pas sécher le frottis (papier) : le garder toujours saturé au vert de malachite pendant la durée citée dessus.
3. Après refroidissement de la lame, enlever le papier absorbant à l'aide d'une pince et rincer à l'eau distillée pendant **30 secondes** (fig.2).
4. Contre-colorer par la safranine (fuchsine) pendant **20 secondes** (fig.3).
5. Rincer à l'eau distillée pendant quelques secondes (fig.4).
6. Sécher par un papier absorbant (fig.5)
7. Examiner la préparation (lame) sous immersion (microscope : objectif à immersion) (fig.6).



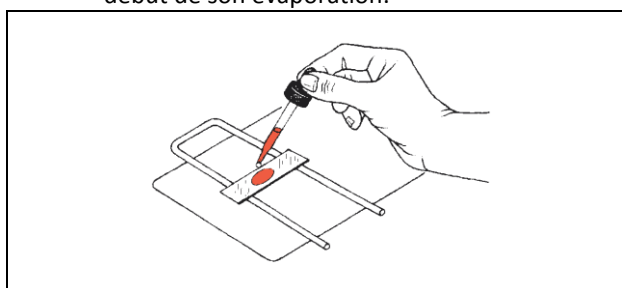
**Schéma A : cycle de vie de la spore**



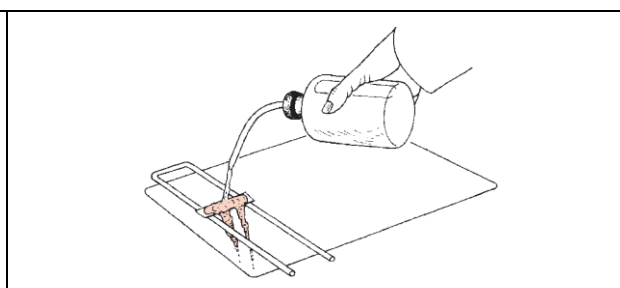
**Fig. 1** Couvrir le frottis par un morceau de papier absorbant et saturer par le vert de malachite. Faire bouillir par la vapeur d'une eau à l'ébullition (bain marie) pendant 5min. Ajouter le colorant au début de son évaporation.



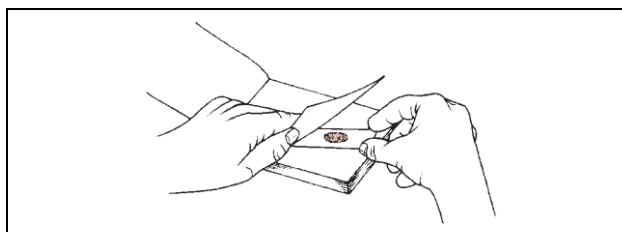
**Fig. 2** Après refroidissement de la lame, enlever le papier absorbant et rincer à l'eau pendant 30 secondes.



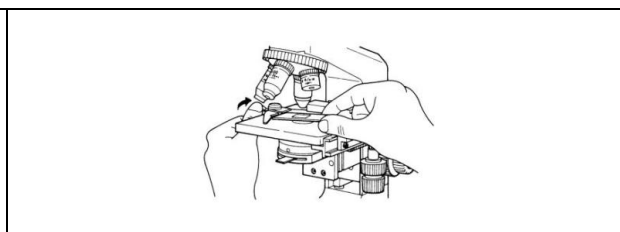
**Fig. 3** Contre-colorer à la fuchsine (20 secondes)



**Fig. 4** Rincer à l'eau pour enlever la fuchsine.



**Fig. 5** Sécher au papier absorbant et examiner à l'immersion.



**Fig. 6** Examiner à l'immersion (x100).

## COMPTE RENDU

Date : .....

Noms et Prénoms :

1-.....

2-.....

3-.....

4-.....

Poste :.....

Groupe :.....

Titre : .....

Objectif :.....

### Microorganismes :

- .....

- ....

### Matériels :

- .....

- .....

- .....

- .....

- .....

### Méthode :

- .....

- .....

- .....

- .....

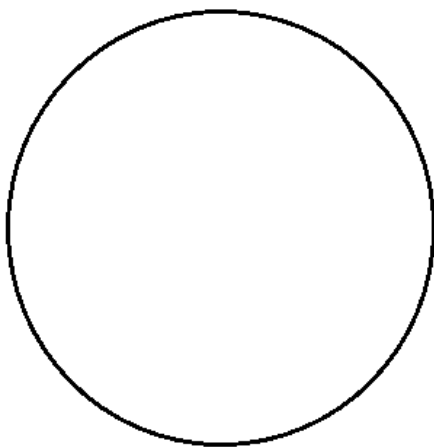
- .....

### Résultats :

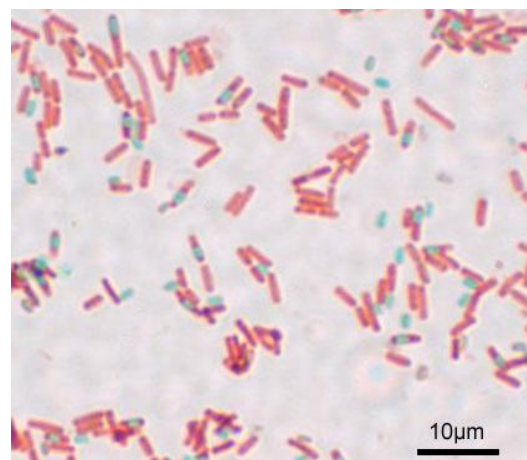
- Schémas et description : (x4 ;x10 ;x40 ;x100)

- position de la spore, Couleur, forme, libre ou dans la cellule

Bactérie (frottis)	frottis ( <i>Bacillus</i> sp)
Grossissement	
Forme cellulaire(forme)	
Couleur de la cellule	
Couleur de la spore	
Forme de la spore	
Position de la spore dans la cellule ou libre	



X100



Exemple