

TP n°4: Observation microscopique des bactéries après coloration de GRAM

La coloration des bactéries est un moyen **d'augmenter leur contraste** de manière à mieux les observer en **microscope à fond clair**.

Dans les conditions normales, les procaryotes ont en général un pH intracellulaire neutre et une surface cellulaire globalement chargée négativement. Ceci explique l'efficacité des **colorants basiques** pour l'observation de **la morphologie bactérienne**.

La coloration peut s'appliquer :

- soit sur des cellules vivantes en utilisant des colorants dilués;
- soit sur des cellules tuées par FIXATION en utilisant des colorants concentrés.

Toutes les techniques de coloration sur des bactéries tuées requièrent trois étapes principales :

- { - La préparation du frottis
- { - La fixation
- { - La coloration proprement dite :
 - *Coloration simple (un seul colorant) **ou**
 - *Coloration différentielle type Gram (deux colorants) **ou**
 - *Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spores, flagelles....).

Vous disposez de trois cultures bactériennes : de *Staphylococcus*, de *Bacillus* et d'*E. coli*. Les manipulations suivantes vont être réalisées pour les trois bactéries.

1. Préparation du frottis

« Un frottis c'est l'étalement en couche mince d'un liquide biologique sur une lame de verre ».

Pour ce faire :

1. Notez la référence de la bactérie échantillon sur un côté d'une lame parfaitement propre et dégraissée.
2. Mettez quelques gouttes d'eau distillée stérile sur la lame.
3. Prélever stérilement à l'aide d'une anse de platine une parcelle d'une colonie bactérienne poussée sur milieu gélosé.
4. Faites émulsionner cette colonie dans les gouttes d'eau sur lame.
5. Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière pour bien séparer les cellules bactériennes, puis séchés ;
 - 5.1. Etalement** : Etalez en couche mince par l'anse avec des mouvements circulaires.
 - 5.2. Séchage** : Le séchage est effectué à l'aire libre dans la zone stérile jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

2. Fixation du frottis sec

Cette étape a pour but :

- De tuer les bactéries ; ce qui rend leurs membranes plus perméables aux colorants.
- De fixer la structure cytotogique des bactéries et donc fixer la forme sans l'en altérer.
- De faire coller les bactéries à la surface de la lame.

La fixation s'effectue soit par **l'alcool flambé**, soit **par la chaleur**

Fixation par chaleur

La lame, tenue par une pince (frottis situé sur le dessus) est passée 3 ou 4 fois dans la flamme du bec Bunsen.

Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.

Maintenant, notre frottis est prêt à différents types de coloration

3. Coloration de GRAM

3.1. Principe

C'est la coloration de base en bactériologie, elle est dite différentielle car elle permet de différencier et de classer la majorité des bactéries en 2 grands groupes (les GRAM + et les GRAM-), selon la différence de la composition de leur paroi cellulaire ; et par conséquent selon leur aptitude à fixer ou non un colorant.

Cette distinction (GRAM + ou GRAM -) est fondamentale pour l'identification bactérienne. Pour ce faire :

- ✓ Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes.
- ✓ L'iode lugol renforce cette coloration par la formation d'un complexe avec le violet de gentiane
- ✓ Les lipides sont très solubles dans l'alcool, en effet :
 - Chez les bactéries à **GRAM négatif**, dont la paroi est riche en lipides, pauvre en peptidoglycane, l'alcool dissout ces lipides ce qui aboutit à une augmentation de la perméabilité de la paroi. L'alcool pénètre facilement au **cytoplasme et le décolore** (l'alcool dissout le violet de gentiane).
 - Chez les bactéries **à GRAM positif**, dont la paroi est pauvre en lipides, riche en peptidoglycane, ce dernier constitue une barrière imperméable à l'alcool et le **cytoplasme demeure alors coloré en violet**.
- ✓ La fuchsine est utilisée afin de pouvoir observer les bactéries à GRAM négatif qui sont devenues incolores.
 - Les **GRAM négatifs** se recolorent en rose.
 - Les **GRAM positifs** gardent leur couleur violette.

3.2. Mode opératoire

Sur le frottis fixé et refroidi :

- Faire couler la solution de Violet de Gentiane sur la lame jusqu'à ce que tout le frottis soit recouvert; laisser en contact 1 minute.
- Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser le agir environ 1 minute.
- Jeter le Lugol et faire couler l'alcool goutte à goutte pendant 10 secondes sur la lame inclinée;
- Rincer immédiatement à l'eau (ne pas diriger le jet d'eau directement sur le frottis).
- Recouvrir la préparation de la Fuchsine (ou Safranine), laisser agir 1 minute.
- Rincer abondamment la lame à l'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination du colorant en excès.
- Sécher la lame au dessus de la flamme d'un bec Bunsen, ou la sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans frotter.
- Examiner au microscope en utilisant l'objectif à immersion (x100).

Résultats

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles **ont gardé le violet**, sont dites '**GRAM positif**' ;
- Des bactéries colorées en rose ; elles **ont perdu le violet**, sont dites '**GRAM négatif**'.

Cette coloration permet AUSSI l'étude de la morphologie et le mode de regroupement des bactéries.

- Consignez vos observations dans ce tableau :

	Résultats obtenus après observation microscopique à immersion (x100)		
	Dessin de la forme	Mode de regroupement	GRAM
<i>E.coli</i>			
<i>Staphylococcus</i>			
<i>Bacillus</i>			

Morphologies et modes de regroupement bactériens

