

Durée : 3h

Observations Microscopiques (Etat frais et mobilité, Colorations)



I. Observation à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés. Si la bactérie est sporulée, l'état frais permet également de mettre ce phénomène en évidence. Pour observer la mobilité, on doit prendre garde à ne pas détruire les flagelles bactériens lors du prélèvement et de la préparation de la lame.

Technique de la préparation de l'état frais

- Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame.
- Prélever une fraction de colonies sur gélose, de préférence aux bords de celle-ci (ou prélever une petite goutte de bouillon).
- Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum et **en remuant très délicatement** (afin de ne pas casser les flagelles).
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air. Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- Observer rapidement à **l'objectif 40** en mettant la **lumière au maximum mais en fermant le diaphragme** (ou utiliser un système « fond noir » ou à « contraste de phase »).
- Après observation, *jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant à large spectre* car les bactéries sont vivantes...

NB : Veiller à observer une grande partie de la lame, mais ne pas prolonger l'observation au-delà de 3 à 10 minutes. Ne pas hésiter à recommencer...

RÉSULTATS

- Des bactéries sont considérées comme **mobiles lorsque des trajets très différents sont observés** (déplacement dans toutes les directions).
- Une bactérie **immobile** est animée de mouvements d'agitation normaux dits **mouvements browniens** (agitation moléculaire), qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité.
- De plus, lors de la pose de la lamelle, des **flux liquidiens** entraînent toutes les bactéries dans le même sens et à la même vitesse...

II. Observations après une coloration

Avant toute coloration, il faut réaliser un frottis, c'est-à-dire un étalement d'un échantillon d'une solution ou une colonie bactérienne, si possible monocouche, des bactéries sur une lame.

1- Réalisation d'un frottis:

- **dégraissage** : dégraisser les lames avec un tampon de coton imbibé d'alcool;
- **Etalement**: On étale le plus soigneusement possible une petite goutte du milieu contenant la bactérie (**suspension bactérienne**) à observer sur la lame porte-objet dégraissé. L'étalement doit être aussi uniforme que possible pour que les cellules bactériennes soient régulièrement représentées sans former d'amas.

Si la souche à observer est cultivé sur un milieu solidifié à l'agar, les colonies prélevées à l'aide de l'aiguille à ensemer, seront émulsionnées dans une goutte de l'eau distillée stérile déposée sur une lame.

- **Séchage** : sécher à l'aire libre la mince couche liquide (frottis) ainsi obtenue.

- **Fixation** : C'est le procédé qui consiste à **tuer les bactéries sans altérer leur structure et à les fixer sur la lame**. Il existe plusieurs techniques (chimique, physique ou la combinaison entre les deux).

Fixation à l'alcool à froid: Recouvrir la lame d'alcool pendant 3 min au minimum. Éliminer l'excès. Laisser sécher.

Fixation à la flamme : Passer directement dans la flamme du bec Bunsen le frottis 3 ou 4 fois une demi-seconde, face sans bactéries vers la flamme (*technique plus utilisée*).

Combinaison entre les deux : Procéder à la **fixation du frottis** avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis enflammer la lame pendant 2 ou 3 secondes.

2- La coloration de Gram

La coloration de Gram a été mise au point par un médecin danois (Christian Gram) en 1884. Depuis, elle est à la base de toute étude bactériologique.

La coloration de Gram présente un double intérêt :

- Elle permet d'observer la morphologie bactérienne (forme, taille, groupement...)
- Elle Permet d'observer une propriété à qui permet la classification des bactéries : l'alcool-résistance (ou Gram).

En effet, la composition de la paroi peut être :

- *Non alcool-résistante*, composée de fine couche de peptidoglycane et de phospholipides. L'éthanol étant une petite molécule liposoluble, elle peut passer au travers de cette paroi ;
- *Alcool-résistante*, composée d'une épaisse couche de peptidoglycane ne laissant pas l'éthanol la traverser ;

Technique: (2 échantillons : un naturel comme le yaourt et l'autre à partir d'une culture microbienne)

Il existe de nombreuses variantes, tant par la concentration ou le temps d'action. Chacun adaptera ce dernier à l'épaisseur du produit.

On choisi de vous présenter une seul technique : "technique des minutes"

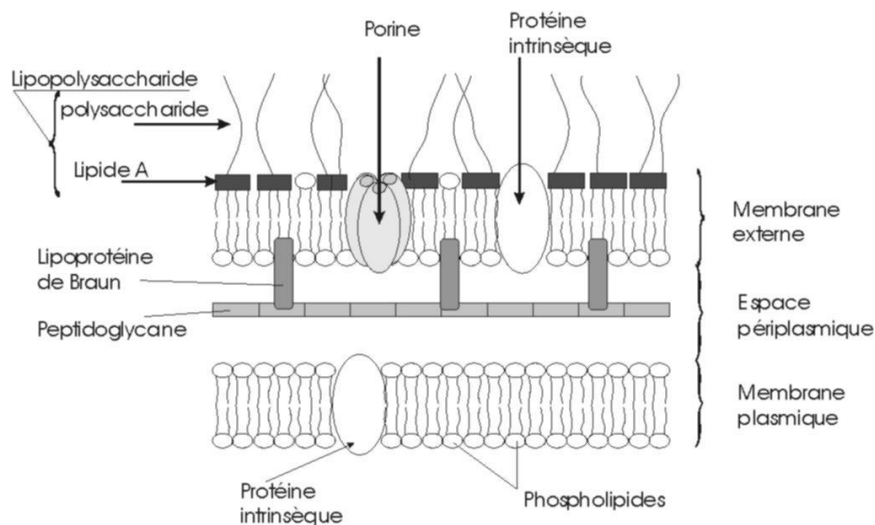
- Réaliser un frottis et le fixer.
- **Coloration** : **violet de gentiane** phéniqué durant **1 minute**. Toutes les bactéries prennent ce colorant et sont donc colorées en violet.
- rincer à l'eau du robinet
- **Mordantage** : recouvrir la lame de **réactif de Lugol 1 minute** (réactif iodo-ioduré qui accentue la coloration).
- Rincer à l'eau
- **Décoloration** (Epreuve) : Incliner la lame puis laisser couler de **l'alcool** durant **10 secondes**. **Rincer** à l'eau du robinet immédiatement. *Attention* : cette étape est délicate ! Pendant cette étape,

les lipides de la paroi des Gram moins sont dissous et l'alcool peut donc pénétrer dans le corps bactérien et expulser le violet de gentiane. Les bactéries Gram⁻ sont alcoolo-sensibles et sont donc décolorées. La paroi des Gram plus ne laisse pas passer l'alcool et sont dites alcoolo-résistantes et restent colorées en violet.

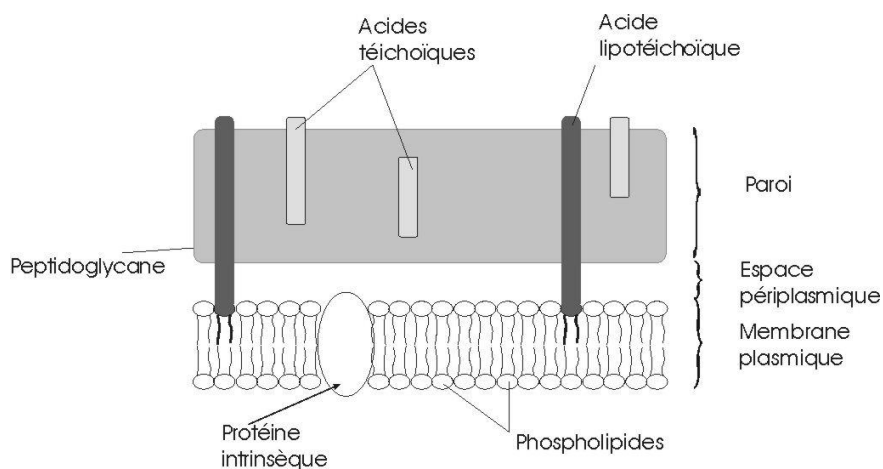
- **Contre coloration** : **Fuschine diluée au 1/20^{ème}** ou de **safranine pendant 1 minute**. Toutes les bactéries prennent le colorant mais le violet masque la fuschine. Les « Gram positives » apparaissent donc violettes, les « Gram négatives », recolorées par la fuschine, apparaissent roses.
- Rincer à l'eau du robinet et sécher entre deux feuilles de papier absorbant.
- Observer à l'objectif 100 à immersion, à pleine lumière.

N.B: Immersion: se dit d'une observation au microscope au fort grossissement (x1000). Cette observation nécessite l'utilisation d'une goutte d'huile d'immersion qui s'interpose entre l'objectif (100) et la lame porte-objet.

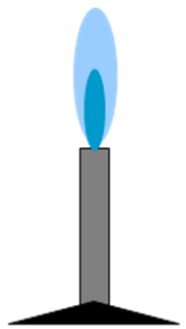
Remarque : la coloration de Gram est parfois appelée **coloration V.L.A.F** afin de se rappeler les colorants et dans quel ordre ils doivent être utilisés (**Violet, Lugol, Alcool, Fuschine**).



Paroi d'une bactérie Gram négatif.



Paroi d'une bactérie Gram positif.



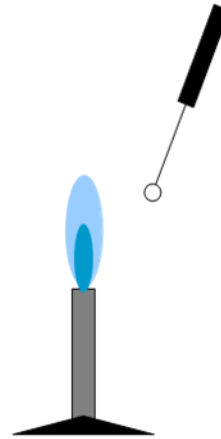
Bec bunsen



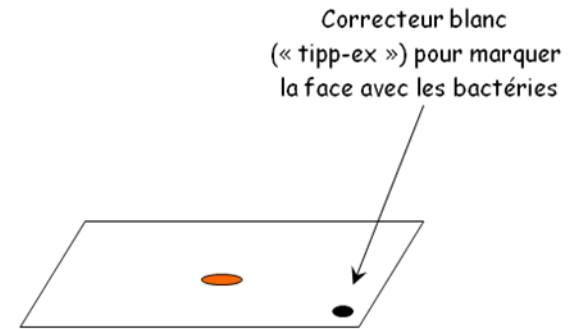
Anse de platine



Suspension bactérienne
ou bouillon de culture



Bec bunsen

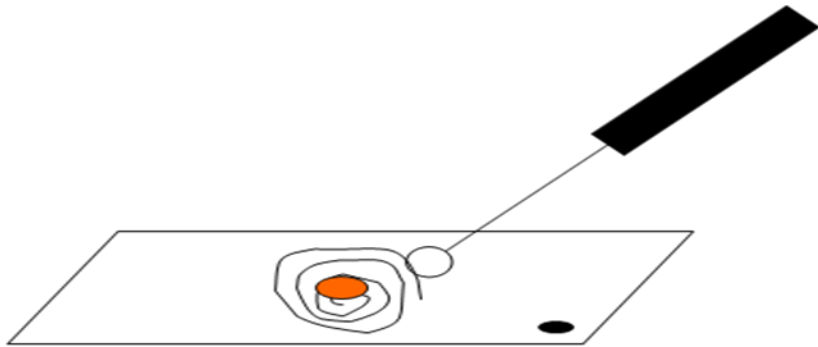


Lame propre

Correcteur blanc
(« tipp-ex ») pour marquer
la face avec les bactéries

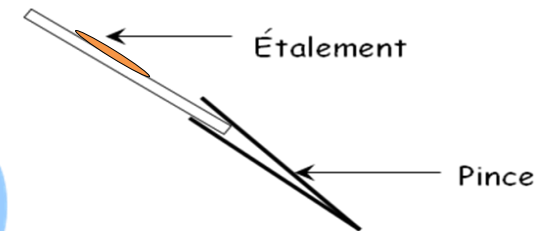
1. Stériliser l'anse de platine

2. Déposer sur une lame propre une goutte de
suspension bactérienne



Lame propre

3. Réaliser le frottis par mouvement circulaire
(« en coquille d'escargot ») puis stériliser l'anse



Bec bunsen

4. Sécher et fixer le frottis à la flamme (face sans les
bactéries côté flamme)