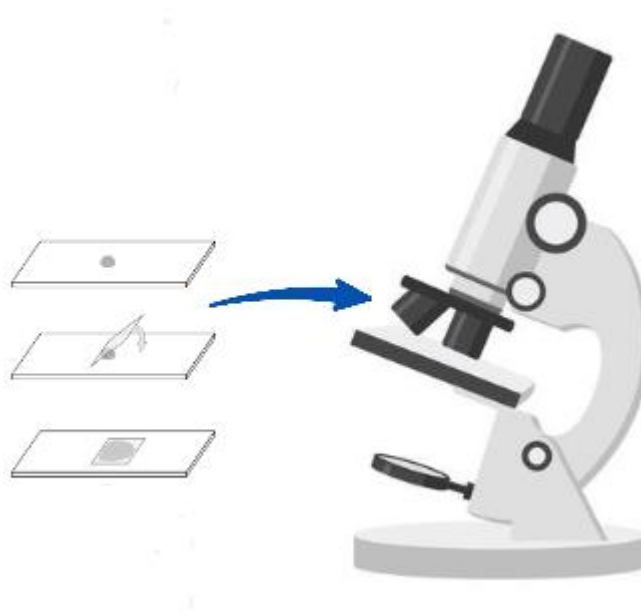


Travaux Pratiques 7:

Examen microscopique des microorganismes

-Etat frais-



1-Introduction :

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des micro-organismes. Elle comprend :

- ✓ Examen à l'état frais
- ✓ Examen après coloration

2-Objectif :

Le but de ce TP est d'apprendre à utiliser le microscope optique et réaliser la mise au point d'une part. D'autre part, réaliser une observation microscopique des micro-organismes à l'état frais.

3-L'état frais : C'est l'examen microscopique des micro-organismes vivants. Ce type d'observation permet d'apprécier par le biais du microscope optique :

- La mobilité des bactéries et leur morphologie ;
- La morphologie des champignons : levures et moisissures.

Il existe deux types de mobilité bactérienne (indiquée dans les figures 1 et 2) :

1-La mobilité polaire : en zigzag qui peut être monotriche, lophotriche ou amphitriche.

2-La mobilité péritriche : mouvement assez fluide i.e. tous les flagelles vont dans le même sens.

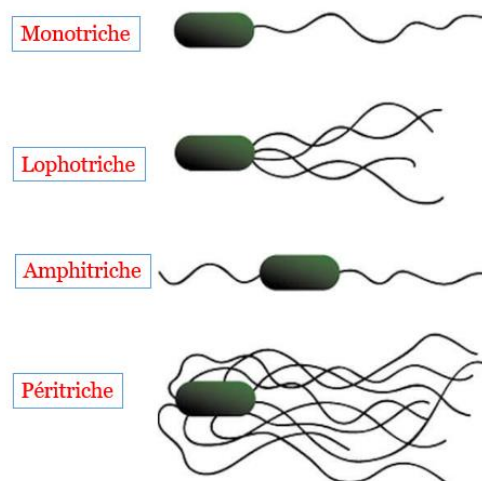


Figure 1 : Ciliature bactérienne

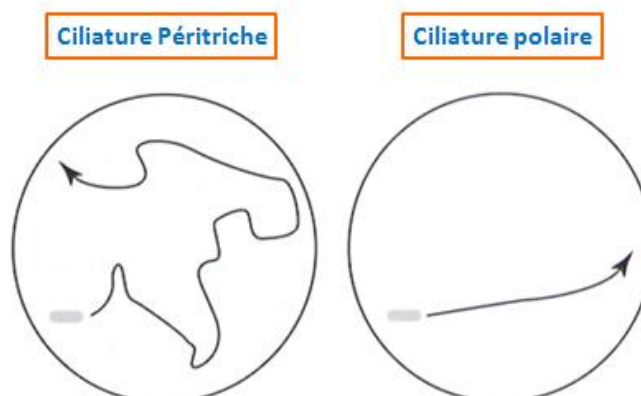


Figure 2 : Déplacement des bactéries en fonction de leurs ciliatures

4-Description du microscope: Le **microscope optique** ou **microscope photonique** est un instrument d'optique muni d'objectif et d'oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions (ce qui caractérise sa puissance optique) et de séparer les détails de cette image (son pouvoir de résolution) afin qu'il soit observable par l'œil humain. Il est utilisé en microbiologie, pour observer les microorganismes. Ci-après et schématisées dans la figure 3.

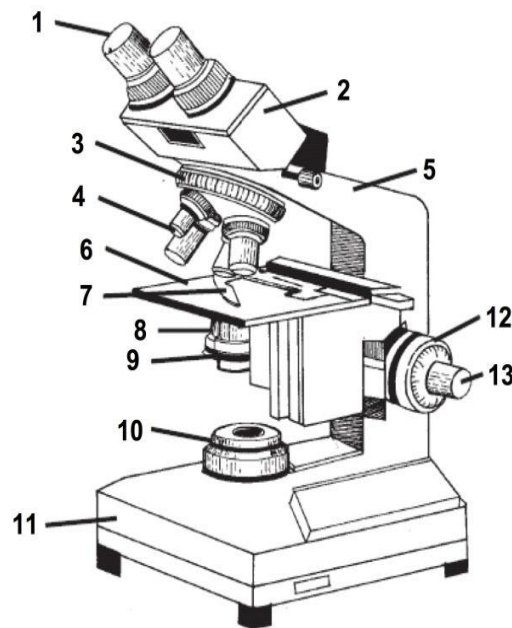


Figure 3 : Microscope optique

1. Les oculaires sont des loupes situées près de l'œil qui permettent de grossir l'image donnée par l'objectif (le grossissement est de 10).
2. Le porte-oculaires (ou tête binoculaire) permet la vision binoculaire.
3. Le porte-objectifs (ou revolver) permet d'amener l'objectif dans l'axe de la préparation.
4. Les objectifs sont des loupes sous forme de lentilles convergentes. Les grossissements figurent sur les objectifs : x 10, x 40, x 100. Le grossissement total du microscope est donné grâce à la formule suivante :

Gt = grossissement de l'objectif x grossissement des oculaires.

Ex : pour l'objectif x40, $Gt = 40 \times 10 = 400$.

5. La potence est la partie rigide qui relie la platine aux oculaires.
6. La platine est la partie sur laquelle est posée la préparation : elle est évidée dans sa partie centrale afin de permettre le passage des rayons lumineux.
7. Le chariot (ou porte objet) permet de déplacer la préparation.
8. Le condenseur permet de concentrer les rayons de la source lumineuse sur la préparation.
9. Le diaphragme permet de régler la quantité de lumière qui arrive sur la préparation à observer.
10. La source lumineuse éclaire la préparation.

11. Le socle est la partie sur laquelle repose le microscope : lourd, robuste et stable.

12/13. Les vis de mise au point : Les vis de commande du chariot permettent de déplacer la préparation. La vis de commande du condenseur permet de monter ou d'abaisser le condenseur.12/ La vis macrométrique permet un mouvement rapide de grande amplitude, visible à l'œil nu, pour effectuer les réglages grossiers de la mise au point de l'image.13/ La vis micrométrique permet un mouvement lent, précis, pour effectuer les réglages fins de la mise au point de l'image.

5-La technique :

5-1-Etat frais des bactéries :

1-À partir d'une culture en milieu liquide :

- Déposer sur une lame microscopique propre soit le contenu d'une anse de platine ou une petite goutte à l'aide d'une pipette Pasteur prélevé d'une culture jeune en bouillon (figure 4 étape 1) ;
- Recouvrir la goutte d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air (figure 4 étape 2) ;
- Ne pas prolonger l'observation au-delà de 3 à 10 minutes (figure 4 étape 3) ;
- Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame et recommencer).

2-À partir d'une culture en milieu solide :

- Déposer une gouttelette de l'eau distillée stérile sur une lame microscopique propre (figure 4 étape 1) ;
- Prélever une fraction de colonie pure sur le milieu de culture gélosé à l'aide d'une anse de platine ;
- Émulsionner très délicatement (afin de ne pas casser les flagelles) de façon à obtenir une suspension homogène ;
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air (figure 4 étape 2) ;
- Ne pas prolonger l'observation au-delà de 3 à 10 minutes (figure 4 étape 3) ;
- Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame et recommencer).

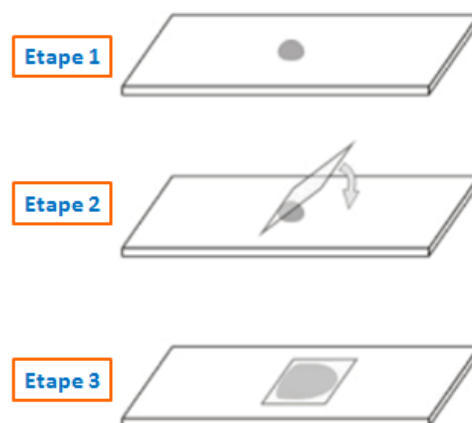


Figure 4 : Etapes de préparation de la lame pour observation

3-L'observation :

- Les 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 qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité (Mobilité faussement positive):
 - **Mouvements browniens** : agitation moléculaire.
 - **Mouvement liquidien** : entraînent toutes les bactéries dans le même sens et à la même vitesse et ils peuvent apparaître lors de la pose de la lamelle.
 - **Mouvement pendulaire**

ATTENTION ! Une bactérie mobile peut apparaître immobile si les conditions de l'observation ne sont pas optimales (Mobilité faussement négative):

- Les flagelles ne doivent pas être cassés par la préparation ou détruit par un instrument trop chaud ;
- La bactérie doit provenir d'une culture jeune ;
- La température de l'incubation peut aussi avoir de l'influence : certaines bactéries immobiles à 37°C sont mobiles à 22°C (Yersinia, Hafnia par exemple).
- Il est possible de confirmer la mobilité par l'ensemencement d'une gélose molle.

5-2-Observation des champignons microscopiques :

1-Les moisissures : L'observation des moisissures est réalisée par la technique dite du scotch dans le bleu coton :

- Déposer quelques gouttes de bleu coton sur une lame microscopique propre ;
- Appliquer un ruban adhésif sur une culture de moisissure ;
- Coller le ruban adhésif sur la lame.

2-Les levures : Elles s'observent entre lame et lamelle comme les bactéries.

6-Les conditions d'observation :

- Les observations se font à l'objectif x40 et oculaire 10 ;
- La lumière au maximum pour avoir une forte intensité lumineuse ;
- Le diaphragme quasiment fermé pour augmenter le contraste.

ATTENTION : Après observation, jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant à large spectre car les bactéries sont vivantes.

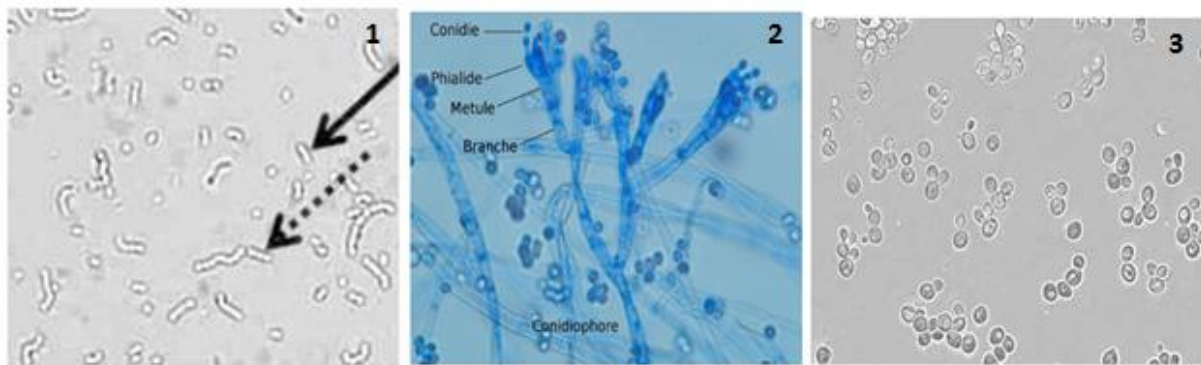


Figure 5 : Observation microscopique à l'état frais de : 1 : bactéries *Streptococcus thermophilus* (flèche en pointillés) et *Lactobacillus bulgaricus* (flèche pleine) ; 2 : moisissure *Penicillium camembertii* ; 3 : levure *Saccharomyces cerevesiae*