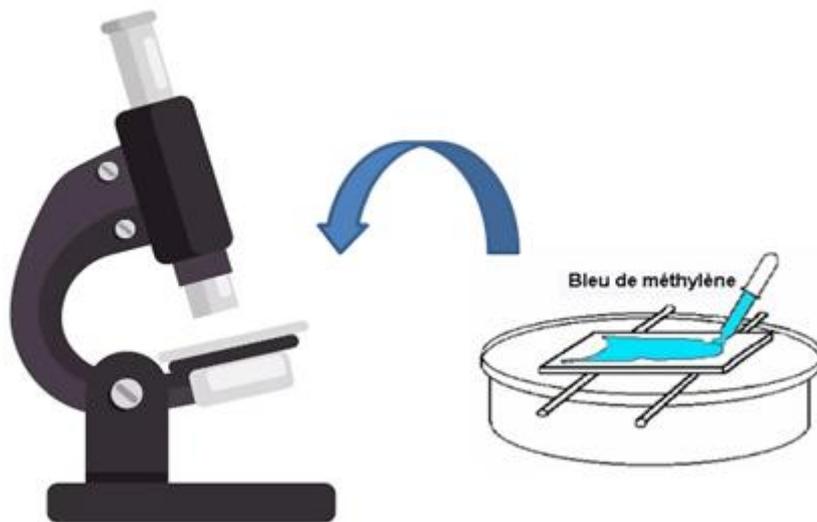


Travaux Pratiques 8:

Examen microscopique des microorganismes

-Coloration simple-



1-Introduction :

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées, fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis secs et fixés, sont classées en :

- Coloration simple (un seul colorant)
- Coloration différentielle type Gram
- Colorations spéciales des structures bactériennes (capsules, spores....).

L'identification permet de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés biochimiques d'une bactérie. Elle repose sur la morphologie, les caractères enzymatiques et biochimiques.

2-Objectif :

Le but de ce TP est d'apprendre à

- ✓ Faire une caractérisation macroscopique de différentes colonies bactériennes ;
- ✓ Réaliser des frottis bactériens ;
- ✓ Déterminer la morphologie des bactéries et leur mode de groupement après une coloration simple des frottis.

3-Caractérisation macroscopique des colonies bactériennes : L'aspect des colonies dépend du milieu de culture, de la durée et la température d'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments:

- **La taille :** petite, moyenne ou grande ;
- **La forme :** bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé ;
- **L'aspect de la surface :** lisse, rugueux, muqueux ;
- **L'opacité :** opaque, translucide, transparent ;
- **La consistance :** grasse, crémeuse, sèche, muqueuse ;
- **Pigmentation.**

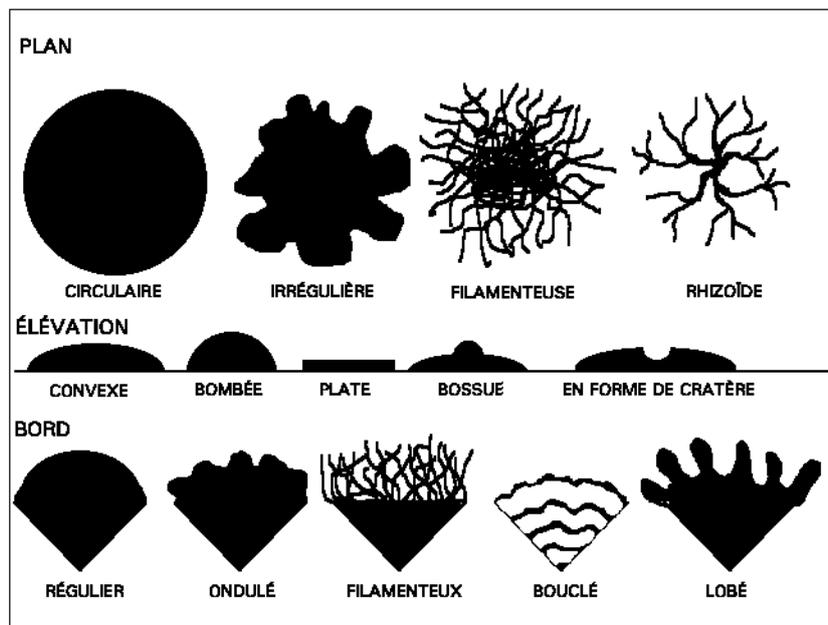


Figure 1 : Morphologie des colonies

4-**Caractérisation microscopique des bactéries par coloration simple :**

4.1. Réalisation d'un frottis bactérien : Le frottis par définition est une couche mince et homogène d'une culture bactérienne étalée sur une surface puis séchés et fixés (Figure 2).

1. Etalement sur lame microscopique : Prélever stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne ou une fraction d'une colonie et l'étaler sur la lame en verre après avoir noté la référence de l'échantillon.

2. Séchage : Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

3. Fixation du frottis sec : Cette étape consiste à tuer les bactéries et les coller sur la lame, sans en altérer la structure. La fixation s'effectue par voie physique avec la 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. La fixation s'effectue également par la voie chimique avec l'alcool.

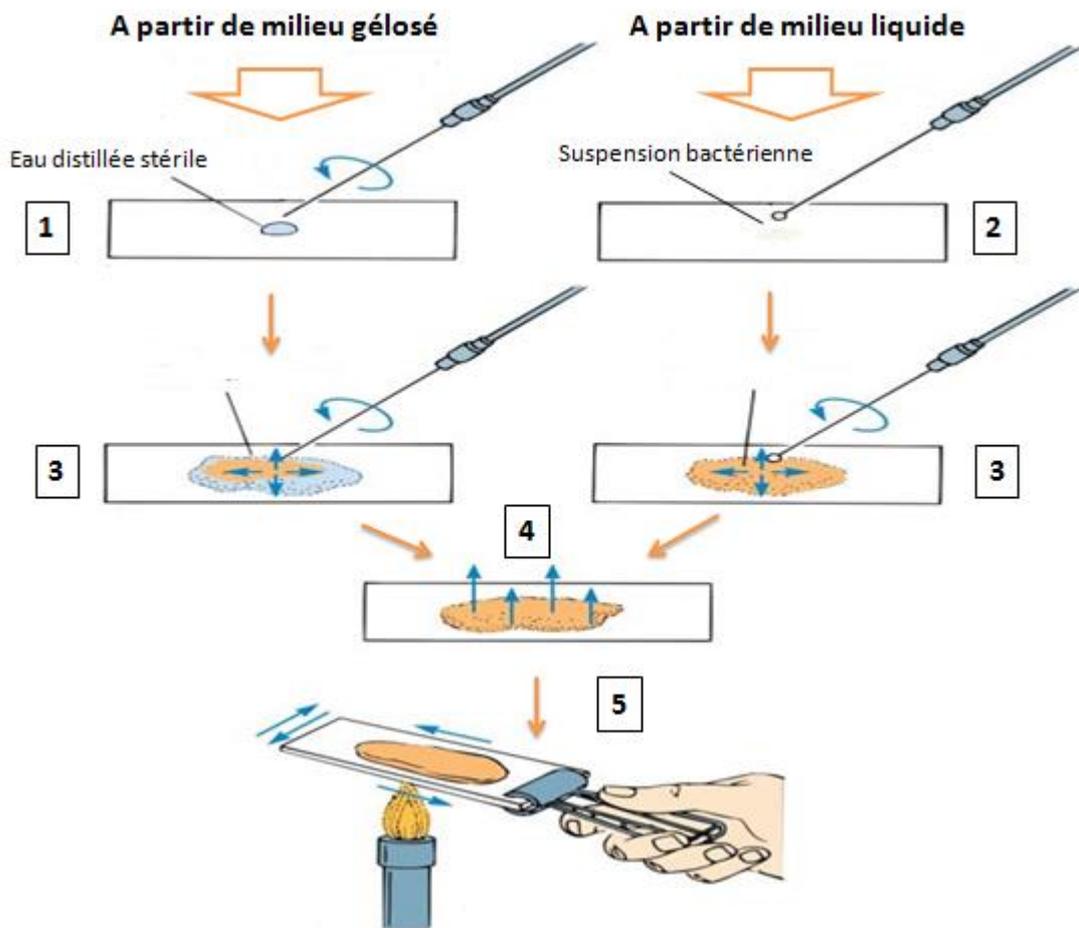


Figure 2 : Etapes de préparation du frottis bactérien. **1:** Dépôt d'une fraction de colonie bactérienne et la mélanger avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ; **2:** Dépôt de quelques gouttes de la suspension bactérienne ; **3:** Etalement en couche fine sur la lame ; **4:** Séchage et **5:** Fixation par la chaleur

Remarque: La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration (Figure 3).



Figure 3 : Qualité du frottis obtenu

4.2. Réalisation de la coloration : Par définition, une coloration simple veut dire colorer un frottis microbien par l'utilisation d'un seul colorant, dans notre TP le bleu de méthylène est utilisé selon les étapes suivantes (Figure 4) :

1-Faire couler la solution de bleu de méthylène sur le frottis fixé et refroidi jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte ;

2-Laisser agir 1 minute ;

3-Rincer abondamment la lame par l'eau du robinet jusqu'à élimination du colorant ;

4-Sécher à l'air ou délicatement entre deux feuilles du papier filtre fin (ou buvard), sans frotter ;

5-Examiner au microscope.

Conditions d'observation :

-Examiner à l'objectif x100

-Ajouter une goutte d'huile à immersion

-Eclairage important : diaphragme ouvert.

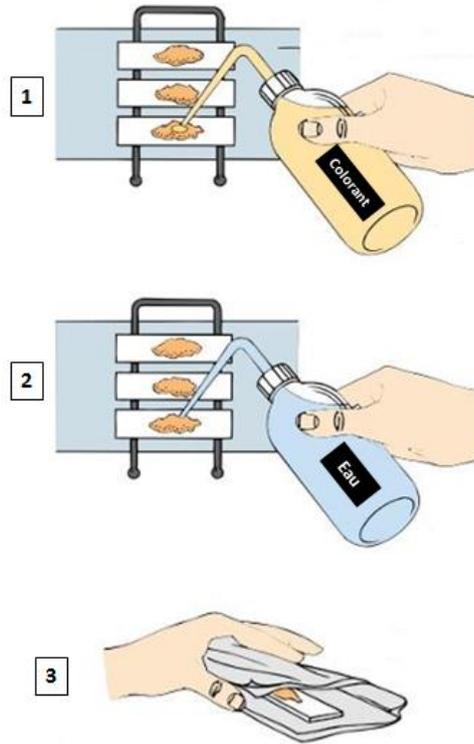


Figure 4 : Etapes de préparation de la lame pour observation. **1 :** Couvrir les lames avec le colorant ; **2 :** Rinçage avec l'eau ; **3 :** Séchage de la lame.

4-3-Résultat : Toutes les cellules apparaissent colorées en bleu (Figure 5).

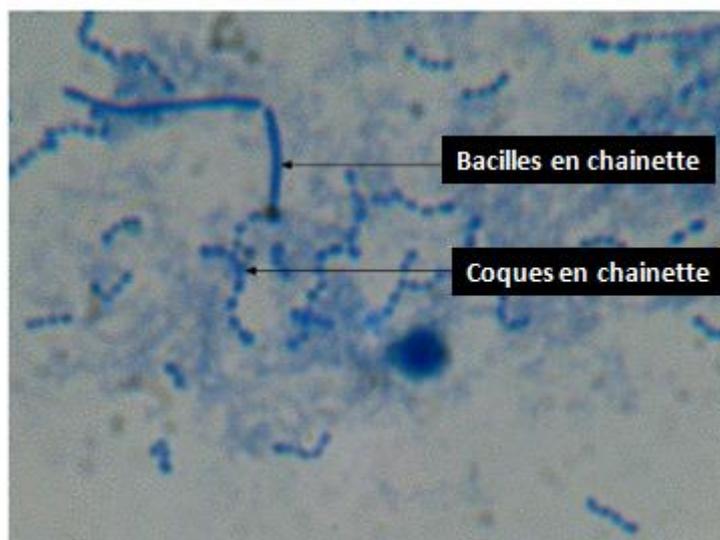


Figure 5 : Bactéries colorées en bleu.

-Avantages et inconvénients de la coloration simple :

- Coloration simple et rapide
- Permet d'apprécier la morphologie des bactéries (figure 6)
- Peu d'échecs possibles

➤ Ne permet pas de différencier les bactéries de même morphologie.

Formes sphériques : coques	Formes allongées
<p>★Forme ronde : ● Ex. : <i>Staphylococcus</i></p> <p>★Forme ovale (ovoïde) : ● Ex. : <i>Streptococcus</i></p>	<p>★ Formes droites :</p> <p>court ■ Long ■</p> <p>épais ■ fin —</p> <p>Bouts ronds ■ bords carrés ■</p> <p>Coccobacille ● Fusiforme ●</p> <p>★ Formes particulières</p> <p>➤ Forme incurvée  ex : <i>Vibrio</i></p> <p>➤ Forme spiralée  ex : <i>Treponema</i></p>
<p>★Mode de groupement :</p> <p>➤ isolé ●●●</p> <p>➤ par deux (diplocoques) ●●</p> <p>➤ En flamme de bougie ●● ex. : <i>Streptococcus pneumoniae</i></p> <p>➤ En grain de café ●● ex. : <i>Neisseria</i></p> <p>➤ Par quatre : tétrade ●●●● ex : <i>Micrococcus</i></p> <p>➤ En amas ●●●●●●●●</p> <p>➤ En chaînette ●●●●●●●●</p>	<p>★ Modes de groupement :</p> <p>➤ isolés ■■■</p> <p>➤ diplobacille ■■</p> <p>➤ En amas ■■■</p> <p>➤ En chaînette ■■■■</p> <p>➤ En palissade ■■■■</p>

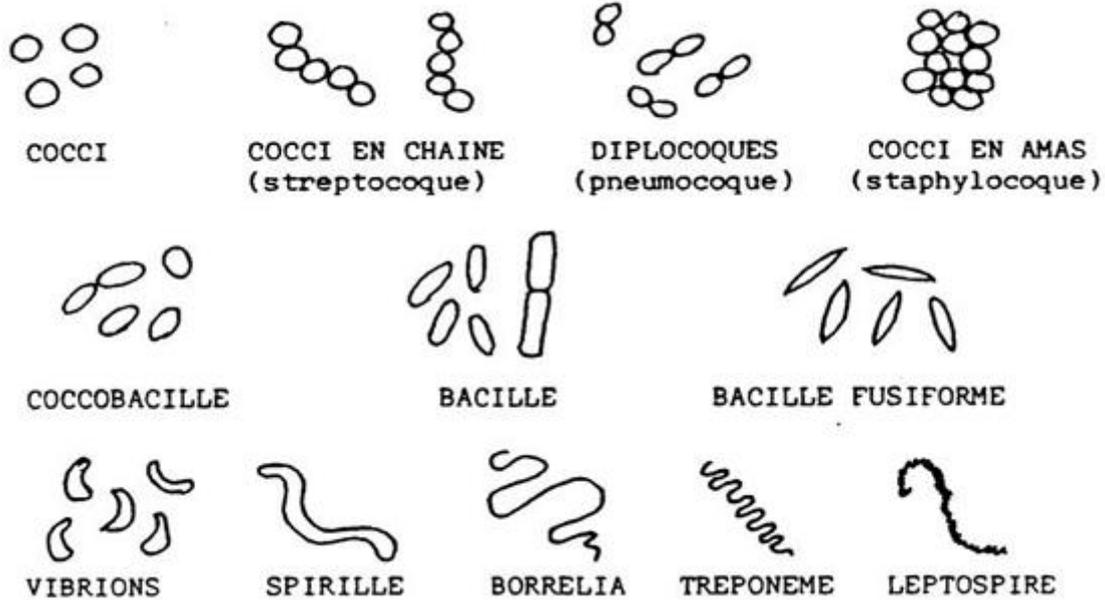


Figure 6 : Morphologie des bactéries