**Centre Universitaire de Mila Le: 15/05/2022**

**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Matière : Microbiologie Générale**

**TP N° 03:** **Examen microscopique des microorganismes**

L’examen microscopique des microorganismes est l’un des outils de base permettant d’identifier, différencier et caractériser les germes en fonction de leur morphologie cellulaire (forme des cellules et mode de disposition). Ces renseignements peuvent être fournis par une simple préparation à l’état frais entre lame et lamelle ou par l’observation d’un frottis coloré.

**I. Examen microscopique à l’ETAT FRAIS**

C’est l’examen microscopique des bactéries vivantes, en milieu liquide. Il permet d’apprécier la mobilité des bactéries et leur morphologie. 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.

1. **Principe**

L’examen à l’état frais consiste à observer à l'aide d’un microscope optique une préparation microbienne vivante maintenu entre lame et lamelle.

1. **Matériel utilisés**

Bec Bunsen, anse de platine, lame, lamelle, microscope optique, eau physiologique stérile, cristallisoir contenant un désinfectant, préparation microbienne (milieu solide ou liquide).

**3. Mode opératoire**

1. Déposer une petite goutte d’eau physiologique stérile sur la lame.

2. Prélever une fraction de colonie sur gélose, de préférence aux bords de celle-ci (ou prélever une petite goutte de bouillon).

3. Faire une suspension homogène dans la goutte d’eau en incorporant progressivement l’inoculum et en remuanttrès délicatement (afin de ne pas casser les flagelles).

4. Recouvrir d’une lamelle en évitant d’enfermer des bulles d’air. Le liquide ne doit pas déborder.

5. Observer rapidement à l’objectifs x10 et x40.

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

**II. Observation après coloration simple: BLEU DE METHYLENE**

Cette coloration permet de distinguer la forme et le mode de regroupement des bactéries et des microbes d’une façon générale.

1. **1. Matériel et réactifs utilisés**

Anse de platine, pipette Pasteur, lames, une pince, bec Bunsen, Bleu de Méthylène, eau distillée, eau physiologique stérile, préparation bactérienne (milieu solide ou liquide).

**2. Mode opératoire**

* **Préparation du frottis**

1. Prélever une goutte de la suspension bactérienne et la déposer sur une lame, l’étaler sur lame en effectuant des mouvements circulaires ou;
2. Prélever une colonie et l’émulsionner dans une goutte d’eau distillée stérile déposée sur une lame.

* **Fixation du frottis**

1. Laisser sécher le frottis à une température ambiante.
2. Fixer le frottis en le passant 3 à 4 fois sur la flamme du bec Bunsen.
3. Laisser refroidir.

* **Coloration au bleu de méthylène**

1. Recouvrir le frottis à l’aide du colorant jusqu’à ce que toute la lame soit couverte.

2. Laisser agir pendant une minute.

3. Rincer abondamment à l’eau distillée jusqu’à l’élimination du colorant en excès.

4. Déposer au centre du frottis coloré une goutte d’huile à immersion.

5. Examiner au microscope optique, objectifs x100 (à immersion).

**III. Observation après coloration complexe: COLORATION DE GRAM**

C’est la coloration de base en bactériologie qui permet en plus de l’étude de la morphologie cellulaire, la différenciation entre les bactéries GRAM positive et GRAM négative, cette distinction est fondamentale pour leur identification.

1. **Principe**

Cet examen consiste à observer à l’aide d’un microscope optique les frottis microbiens subissant une coloration différentielle de GRAM.

1. **Matériel et réactifs utilisés**

Bec Bunsen, pipette Pasteur, anse de platine, lames, une pince, papier buvard (absorbant), microscope optique, cristallisoir contenant un désinfectant, eau physiologique stérile, eau distillée, Violet de Gentiane, Lugol, Ethanol à 96%, Fuschine et l’huile à immersion.

1. **La coloration de GRAM**

1-Préparation et fixation du frottis par un passage rapide sur la flamme du bec Bunsen.

2-Couvrir le frottis par le violet de Gentiane pendant 30s à 1min (COLORATION).

3-verser l’excès du colorant.

4-Couvrir la lame avec du Lugol pendent 30s à 1min (MORDANÇAGE)

5-Laver à l’eau distillée.

6-Rincer le frotti avec l’éthanol 96°en inclinant la lame et par goutte à goutte jusqu’ à la disparition complète de la coloration violette.

7-Laver immédiatement à l’eau distillée.

8-Couvrir la lame avec la Fuschine pendant 30s à 1min (CONTRE COLORATION).

9-Laver à l’eau distillée.

10- séchage du frottis.

11-Déposer une goutte d’huile à immersion sur le frottis et observer au microscope, objectif x100.