

Centre universitaire Abdelhafid BOUSSOUF, Mila
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

TP N° 03: Etapes du diagnostic bactériologique

Etude des caractères morphologiques (aspect macroscopique et microscopique)

Il est possible d'observer les microorganismes:

- Soit lorsqu'ils sont regroupés en colonies sur boîte visible à l'œil, il s'agit alors d'une observation macroscopique ;
- Soit à l'état de cellule, il s'agit alors d'une observation microscopique.

1. Observation macroscopique des colonies en surface sur milieu solide (GN)

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées. La colonie peut apparaître à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies, ou être en profondeur pour les germes anaérobies.

La taille

- **Colonies punctiformes:** Colonies à peine visibles, dont la taille est **inférieure au millimètre**.
- **Petites colonies:** Colonies dont le **diamètre est compris entre 1 et 2 mm**.
- **Colonies moyennes:** Colonies dont le **diamètre est compris entre 3 et 5 mm**.
- **Grosses colonies:** Colonies dont le **diamètre est supérieur à 5 mm**.

La forme : Régulière (ronde) en forme de lentille, irrégulière (de formes diffusées), filiformes, légèrement envahissantes avec bords ondulés, légèrement envahissantes avec bords érodés et envahissante.

L'aspect de la surface : lisse, rugueux, renvoyer la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

L'opacité : Opaques (ne laissent pas passer la lumière), Translucides (laissent passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli) ou Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre).

Le relief : Aplatis, surface, bombée (concave), demi-bombée. Centre: parfois surélevé, parfois ombilique (en creux ou concave).

Allure de contours (le bord) : Dentelé, lisse, déchiquetés, irréguliers, Uniforme ou Filamenteux.

La consistance : au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).

La couleur et/ou pigment : plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanche, grise). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donnent un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge ...), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu.

2. Observation microscopique des cellules bactériennes

2.1. 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.

a. 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).

b. Mode opératoire

✓ Préparation du frottis

1. Prélever une colonie bactérienne et la déposer sur une lame ;
2. Emulsionner la colonie dans une goutte de l'eau physiologique stérile ;
3. Etaler sur lame en effectuant des mouvements circulaires ou;

✓ 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. Sécher le frottis à l'aide du papier buvard;
5. Déposer au centre du frottis coloré une goutte d'huile à immersion ;
6. Examiner au microscope optique, objectifs x100 (à immersion).

Voir le lien : https://www.youtube.com/watch?v=AwxBHfb-_M0 coloration au Bleu de Méthylène.

2.2. 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.

a. Principe

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

b. 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.

c. 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 pendant 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.

Voir le lien : <https://www.youtube.com/watch?v=r-LppOSeckM-coloration> Coloration de Gram.

Compte-rendu

- Décrire l'aspect macroscopique de la culture bactérienne sur G.N.
- Décrire l'aspect macroscopique d'une colonie isolée d'une souche pure sur boîtes de Pétri ;
- Décrire l'aspect microscopique des cellules bactériennes des souches A, B, C, D et E (forme de cellules et mode de regroupement)
- Décrire le Gram de chaque souche bactérienne ; A, B, C, D et E.