

TP N° 2 : Examen microscopique des micro-organismes "L'état frais"

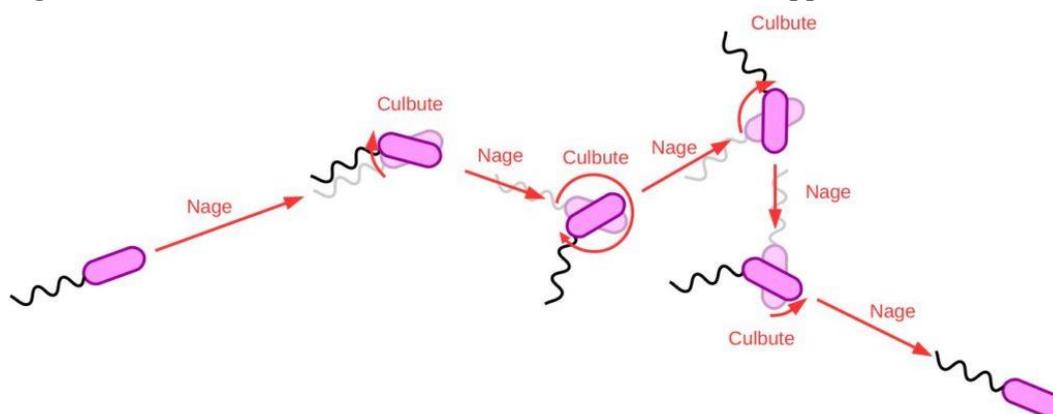
1- **Introduction** : L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des micro-organismes. Elle comprend :

- I. Examen à l'état frais
- II. Examen après coloration

L'état frais : est l'examen microscopique des micro-organismes **vivants**. Ce type d'observation permet d'apprécier, par le biais du microscope optique, le pouvoir **locomoteur** si l'espèce étudiée est mobile.

La mobilité bactérienne

Certaines bactéries sont mobiles et peuvent se déplacer grâce à un ou plusieurs flagelles. Le déplacement d'une bactérie est composé d'une répétition de phases de nage puis de changement de directions (culbute). Ce mode de déplacement peut sembler désordonné, à première vue. Cependant, les bactéries sont capables de réguler la durée des phases de nage et de culbute pour s'approcher d'un environnement favorable ou au contraire s'éloigner d'un environnement défavorable : ce mécanisme est appelé **chimiotactisme**.



Les flagelles des bactéries sont de longs appendices protéiques flexibles. Leur nombre et leur position peuvent différer selon les espèces de bactéries.

Certaines bactéries possèdent un seul flagelle, d'autres une dizaine tandis que certaines comme "*Candidatus Ovobacter*" en possèdent plus de 400. La position des flagelles sur la bactérie peut aussi changer. Le terme **ciliature** est utilisé pour désigner la position des flagelles. Selon le nombre et la position de flagelles, la ciliature est qualifiée de :

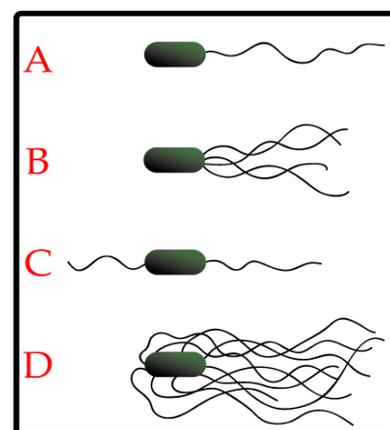
• Ciliature ou flagellation polaire

✓ **Monotriche** correspond à la présence d'un seul flagelle à un pôle de la bactérie (exemple des *Vibrio*), avec un déplacement fléchant

✓ **Lophotriche** correspond à la présence de plusieurs flagelles au pôle de la bactérie (*Pseudomonas* par exemple) avec déplacement fléchant et oscillant ;

✓ **Amphitriche** (Ex: *Spirillum volutans*): un seul flagelle sur chacune des deux extrémités opposées avec déplacement oscillant; un seul flagelle fonctionne à la fois, ce qui permet à la bactérie d'inverser le cours rapidement en commutant quel flagelle est actif.

• **Ciliature péritriche** : des cils/flagelles entourant la cellule, tous les flagelles vont dans le même sens, avec un déplacement fléchant hélicoïdal (EX: *Escherichia coli*)



2- Objectif

- Utiliser le microscope optique et réaliser la mise au point ;
- Observation microscopique des micro-organismes à l'état frais.

3- Matériel

- Suspensions bactériennes pures (*Escherichia coli* et *Bacillus sp.*).
- Lames, lamelles, anses de platine.
- Bec bunsen, microscopes.
- Huile d'immersion
- Papier absorbant

4- Technique

A. À partir d'une culture en milieu liquide

- Déposer sur une lame 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 ;
- Recouvrir la goutte d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air ;
- Ne pas prolonger l'observation au-delà de 3 à 10 minutes ;
- Le liquide ne doit pas déborder

B. À partir d'une culture sur milieu solide :

- Déposer une gouttelette de l'eau distillée ou eau physiologique stérile sur la lame ;
- Prélever une fraction de colonie sur le milieu de culture gélosé à l'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 ;
- Ne pas prolonger l'observation au-delà de 3 à 10 minutes ;
- Le liquide ne doit pas déborder

5- L'observation

Faire une observation à immersion (objectif X100 et huile à immersion).

□ Les bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions).

Il ne faut pas confondre avec les mouvements liquidiens entraînent toutes les bactéries dans le même sens et à la même vitesse (ils peuvent apparaître lors déplacement de la lamelle).

Attention Une bactérie mobile peut apparaître immobile si les conditions de l'observation ne sont pas optimales :

- 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.

Après observation, jeter la lame et lamelle dans un bac contenant un désinfectant (eau de Javel) car les bactéries sont vivantes.

