

## TP 3

### Observation microscopique des bactéries après coloration de GRAM

La coloration des bactéries est un moyen d'augmenter leur contraste de manière afin de faciliter leur observation au microscope à fond clair. On distingue :

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

#### Objectif

Réalisation d'un frottis bactérien et application des étapes de la coloration de Gram.

#### Matériel

- **Colorant** Violet de Gentiane.
- **Colorant** Lugol.
- **Colorant** Fuch sine.
- Décolorant (alcool 70 à 90%)
- Bec Bunsen
- Bac de coloration
- Pissette d'eau.
- Eau distillée stérile
- Lames de verres + pince pour lames (en bois)  
Ecouillons.
- Microscope optique
- Souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*

#### Méthodes

Les manipulations suivantes vont être réalisées pour les deux bactéries.

**1- Préparation du frottis :** Toutes les techniques de coloration sur des bactéries tuées requièrent la préparation d'un frottis bactérien

« Un **frottis** c'est l'étalement en couche mince d'un liquide biologique sur une lame de verre ».

Pour ce faire il faut suivre les étapes suivantes

#### a) Etalement sur lame de verre

- Mettez quelques gouttes d'eau distillée stérile sur une lame propre et **dégraissée** (voir TD3).
- Prélevez stérilement à l'aide d'une anse de platine une parcelle d'une colonie bactérienne préalablement ensemencée sur un milieu gélosé (gélose nutritive).
- Faites émulsionner cette colonie dans les gouttes d'eau sur lame.
- Etalez en couche mince par l'anse avec des mouvements circulaires.
- Séchez à l'aire libre dans la zone stérile jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

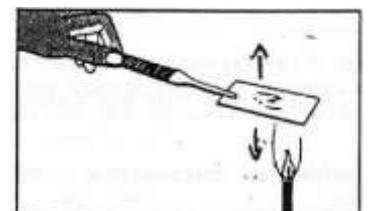
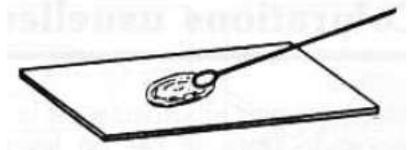
#### b) Fixation du frottis sec :

 Cette étape a pour but :

- ✚ De tuer les bactéries ; ce qui rend leurs membranes plus perméables aux colorants.
- ✚ De fixer la structure cytotologique des bactéries et donc fixer la forme sans l'en altérer.
- ✚ De faire coller les bactéries à la surface de la lame.

La fixation s'effectue soit par l'alcool flambé, soit par la chaleur

Fixation par 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, notre frottis est prêt aux différents types de coloration.



Fixation par la chaleur.

## 2- Coloration de GRAM

C'est une technique de coloration largement utilisée en microbiologie, développée par Hans Christian Gram en 1884. Elle permet de différencier les bactéries en deux groupes principaux : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif selon la différence de la composition de leurs **parois** cellulaires ; et par conséquent selon leur aptitude à fixer ou non un colorant.

Elle permet de donner également des indications sur leurs **formes** et leurs **modes** de regroupement.

### Principe

- Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques, à cette étape de coloration, toutes les bactéries sont violettes.

- Le Lugol renforce cette coloration par la formation d'un complexe avec le violet de gentiane

- Décoloration : les lipides sont très solubles dans l'alcool, en effet :

✚ Chez les bactéries à GRAM négatif, dont la paroi est riche en lipides, pauvre en peptidoglycane, l'alcool dissout ces lipides ce qui aboutit à une augmentation de la perméabilité de la paroi. L'alcool pénètre facilement au cytoplasme et le **décolore** (l'alcool dissout le violet de gentiane).

✚ Chez les bactéries à GRAM positif, la paroi est pauvre en lipides, riche en peptidoglycane, ce dernier constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure alors coloré en violet.

- La fuchisine est utilisée afin de pouvoir observer les bactéries à GRAM négatif qui sont devenues incolores, elles se recolorent en rose, tandis que les GRAM positifs gardent leur couleur violette.

### Mode opératoire

Sur le frottis fixé et refroidi :

- Recouvrir le frottis à l'aide d'une solution de cristal violet (violet de gentiane), laisser agir 1 minute ;
- Rincer à l'eau du robinet jusqu'à élimination du colorant en excès.
- Recouvrir la préparation avec du Lugol, laisser agir 1 minute ;
- Rincer à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool 95°, laisser agir 15 sec ;
- Rincer à l'eau courante ;
- Recouvrir la lame par la solution de Fuchisine, laisser agir 1 minute ;
- Rincer abondamment à l'eau
- Egoutter et sécher délicatement entre deux feuilles de papier fin propre sans frotter.
- Observez au microscope optique grossissement 100 avec une goutte de l'huile à immersion.

### Résultats

A l'issue de cette coloration, on peut distinguer :

- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, elles sont dites « Gram positif » ;

- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, elles sont dites « Gram négatif ».

