

Module M4: Microbiologie Générale



Manuel des travaux pratiques

**Réalisé par :
Dr. Khalid BOUTOIAL & Dr. L. Hasna ZINELABIDINE**

Filière : DUT Agro-Industrie

Année universitaire : 2020-2021

AVANT PROPOS

Ce polycopié de travaux pratiques s'adresse aux étudiants de première année de DUT Agro-Industrie. Dans le cadre d'acquérir une bonne pratique au laboratoire de microbiologie, ce document vise à fournir les bases indispensables en microbiologie générale.

Ce recueil de travaux pratiques comprend trois séances des travaux pratiques. Chaque séance comporte des parties théoriques, matériels utilisés et modes opératoires. Il est nécessaire à tout étudiant de connaître parfaitement le côté théorique avant d'exécuter les travaux pratiques proposés.

La séance de TP devra être préparée à l'avance.

Le port de la blouse est obligatoire en TP.

Chaque étudiant doit nettoyer son paillasse avant d'abandonner la salle de TP.

Un travail mal présenté, qui manque de soin ou de rigueur est sanctionné par le responsable de TP.

SOMMAIRE

TP N° 1 - RÈGLES À SUIVRE DURANT LES TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE.....	5
TP N2. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DES MICRO-ORGANISMES DANS L’AIR, LE MANIPULATEUR, ET LE MATERIEL	14
TP N3- EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CULTURES	16
TP N°4 - EXAMEN MICROSCOPIQUE DES BACTÉRIES ET COLORATION DIFFERENTIELLE	19

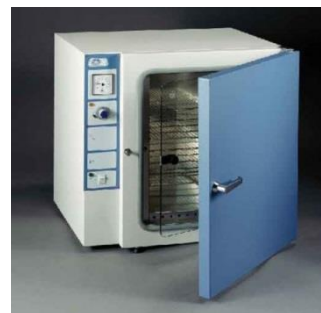
Matériel :



Boîtes de Pétri.



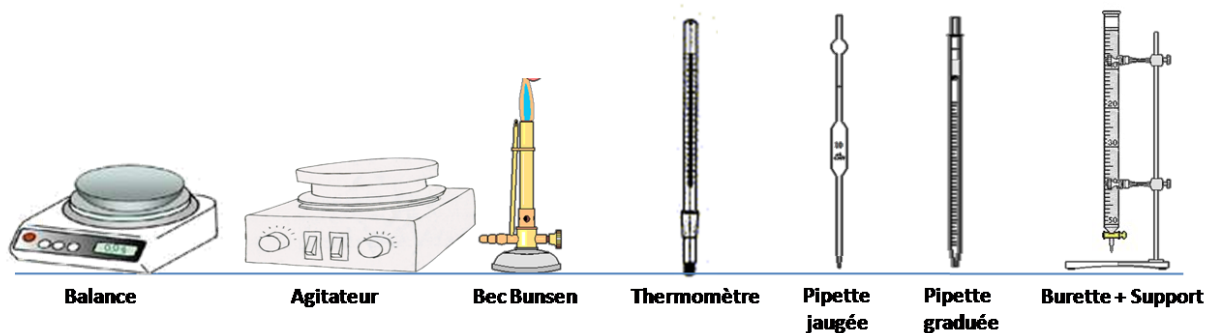
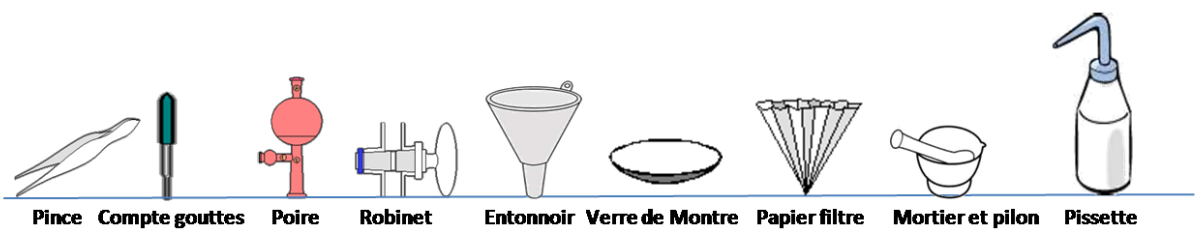
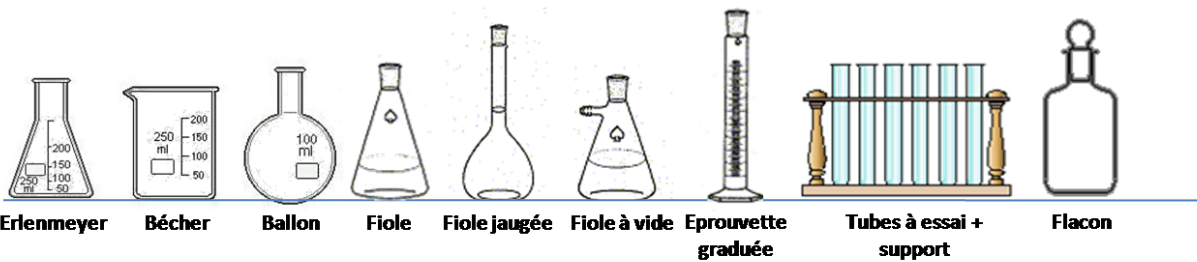
Autoclave.



Etuve



Anse.



TP. N° 1. MATEREILS ET RÈGLES À SUIVRE DURANT LES TRAVAUX PRATIQUES DE MICROBIOLOGIE

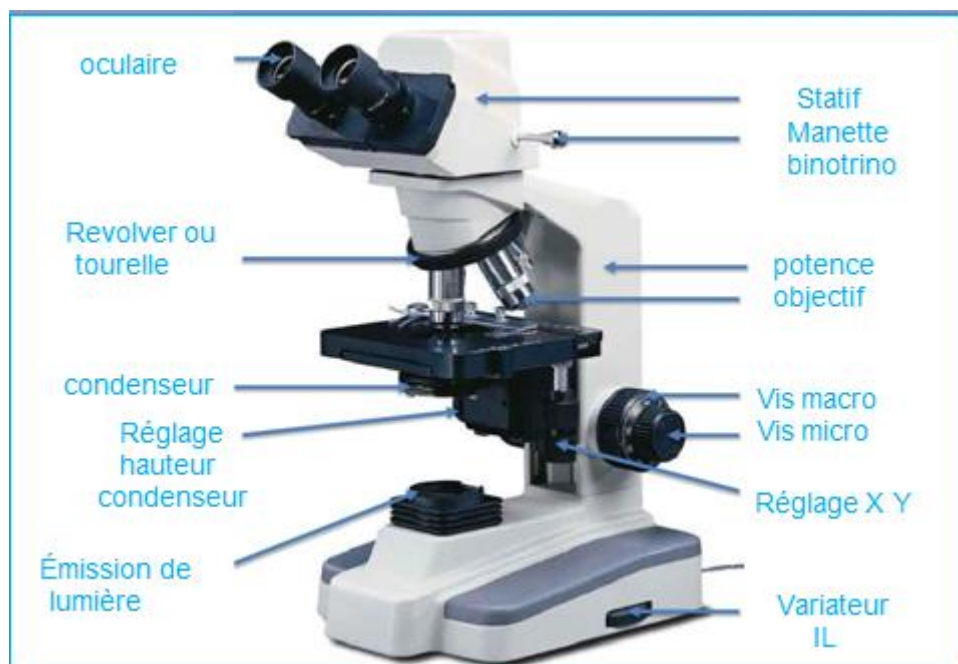
I. OBJECTIFS

Se familiariser avec un laboratoire de microbiologie, son équipement et son fonctionnement.

II. LE MATEREILS UTILISES EN MICROBIOLOGIE

1- Le Microscope

C'est un appareil utilisé dans l'observation des différents micro-organismes



Les différentes composantes d'un microscope

❖ Précaution à prendre lors de l'emploi du microscope

- S'assurer de la propreté des parties optiques (oculaires, objectifs, lentille frontale du condenseur...)
- Si nécessaire les essuyer avec du papier Joseph.
- Abaisser la platine pour y déposer la lame (après avoir nettoyé à l'alcool, la partie inférieure de la lame)
- Choisir une intensité lumineuse moyenne
- Utiliser les objectifs en ordre croissant de grossissement x 4, x 10, x 60, x 100

- Régler l'éclairage à l'aide des diaphragmes et du condenseur
- Remonter la platine en regardant latéralement afin d'amener la lame à quelques mm de l'objectif choisi.
- Descendre doucement la platine à l'aide de la vis micrométrique jusqu'à la vue de l'objet à observer
- Pour utiliser des objectifs plus forts que celui choisi précédemment, centrer la zone à observer, changer d'objectif, régler l'éclairage.

❖ **Précaution d'installation du microscope**

Le microscope doit être installé :

- Sur une surface non glissante
- A une hauteur permettant les observations prolongées sans fatigue
- A contre-jour pour éviter la fatigue des yeux

2- La verrerie

- **La pipette pasteur** : C'est une pipette à bout effilée et à usage unique. Elle peut être fabriquée au labo à partir d'un tube en verre spécial.
- **Les pipettes graduées** : elles ont des formes et des volumes différents. Après chaque utilisation elles sont lavées séchées, enveloppées dans du papier Kraft puis stérilisation au four à 180°C pendant 30 mn
- **Les boîtes de Pétri** : ce sont des récipients ronds en verre et qui servent pour la culture des microorganismes et doivent après chaque utilisation de la boîte être stérilisés.
- **Les tubes à essais** : sont utilisés pour la préparation des milieux de culture et des dilutions comme ils peuvent contenir des réactifs.
- **Les lames et les lamelles** : sont utilisées pour les observations microscopiques. Les lamelles sont jetées après utilisation par contre les lames sont récupérées.
- Autres verreries : Bucher, Éprouvettes, Ballon...

3- Autres matériels

- L'étuve.

- Le bain-marie : c'est un bac métallique équipé d'une résistance plongée dans l'eau distillée. Qui est utilisé dans l'incubation.
- Le réfrigérateur.
- Le congélateur.
- La pince.
- La balance.
- Le compteur de colonies.
- L'anse de platine : c'est une anse qui possède un fil de platine, utilisée pour l'ensemencement en stries ou en zigzag.

III. LES CONSIGNES DE SECURITE

Le travail du microbiologiste dans le laboratoire demande une prudence puisque le laboratoire c'est une source de différents accidents. Pour cela la conduite à tenir et les précautions à prendre afin d'éviter ces accidents sont :

- Le port de la blouse est obligatoire, il doit être en coton et tenu fermée.
- Eviter d'avoir des ongles longs et attacher les cheveux longs avant chaque manipulation.
- Nettoyer la paillasse à l'aide d'un chiffon imbibé d'eau de javel ou alcool 68 % avant et après chaque manipulation.
- Se laver les mains et les désinfecter à l'eau avec brossage des ongles avant et après les manipulations, et avant toute sortie même momentanée de la salle de TP.
- Éviter les courants d'air ; limiter les déplacements ; éviter de parler
- Ouvrir avec précaution les récipients contenant des cultures microbiennes, afin d'éviter toute projection.
- Prévenir immédiatement le responsable de TP en cas de bris d'un récipient contenant une culture, en cas de contamination accidentelle d'un manipulateur ou tout incident dispersant le matériel microbien.
- Ne pas porter ses doigts ou tout objet à sa bouche. Ne pas manger, boire, fumer.
- Stériliser tout le matériel septique à la fin de la manipulation.
- Prendre toutes dispositions indispensables pour la mise à l'abri des souches microbiennes ainsi que leur destruction afin d'éviter toute contamination.
- Aucun pipetage à la bouche n'est permis.
- Eviter de mettre tout objet personnel en contact avec les bactéries.
- Marquer soigneusement les lames, tubes, boîtes, etc.... avec un feutre permanent.

- Les manipulations seront faites dans un rayon de 10 cm autour de la flamme du bec Bunsen.
- Ne pas éteindre la flamme sans couper l'arrivée du gaz.
- Ne pas laisser à proximité de la flamme des objets ou liquides inflammables (papiers, alcool, etc...).

Gestion des déchets

- Matériels non contaminés (papier, allumettes, etc...) : poubelle à papier.
- Cultures bactériennes en boîtes et bouillons : grands containers pour déchets contaminés en bout de paille.
- Pipettes Pasteur, lames et lamelles : petits containers posés sur les pailles pour chaque binôme.

IV. LA STÉRILISATION

IV.1. Méthode de stérilisation

La destruction des microorganismes ou stérilisation est indispensable lors de la préparation du matériel et des milieux destinés aux manipulations, ainsi qu'avant le lavage ou l'élimination du matériel et des milieux utilisés. Dans le premier cas, il est indispensable d'utiliser des méthodes qui ne sont pas susceptibles de gêner la prolifération ultérieure des germes étudiés : on utilise essentiellement des méthodes physiques.

Dans le deuxième cas, il sera possible d'utiliser des méthodes plus variées et à effet plus durable (méthodes physiques ou chimiques). Il faut opposer la stérilisation qui est la destruction totale des germes, à la désinfection qui est une destruction plus grossière.

1. La stérilisation par la chaleur

La chaleur détruit les bactéries et les spores. On distingue les procédés à chaleur «sèche» ou «humide».

A. Chaleur sèche

- **Flambage**

Il est basé sur l'emploi du bec Bunsen. Cette méthode est utilisée pour la stérilisation immédiate du matériel de manipulation : extrémité de l'anse, extérieur des pipettes Pasteur et pipettes graduées, col des tubes à essai, tubes contenant des milieux de culture, erlenmeyers et flacons divers, étaloirs ...

Il est à noter que le bec Bunsen, réglé avec une flamme bleue, la plus chaude, crée une zone de stérilité d'un diamètre d'environ 20 cm, par ascendance de l'air de cette zone. Toutes les manipulations d'ouverture de tubes et boîtes de culture, d'ensemencement, devront être réalisées dans ce diamètre. Pour que cette zone soit effectivement stérile, les courants d'air et déplacements de personnes sont à proscrire.

Zone de stérilité d'un bec bunsen

- **Orifice des tubes** : flamber 1 à 2 secondes. A faire après chaque ouverture et avant chaque fermeture de tube.

-**Anse de platine** : tenir l'anse verticalement ; placer la boucle métallique dans la flamme ; attendre qu'elle devienne rouge. La maintenir 5 secondes. A faire avant et après chaque utilisation.

- **Pipette Pasteur** : La pipette est utilisée soit boutonnée (fermée) pour prendre une colonie, soit ouverte pour prélever un liquide. Il faut l'ouvrir avant le flambage. Tenir la pipette horizontalement et passer lentement la partie effilée de la pipette 5 à 6 fois dans la flamme. Laisser refroidir anses et pipettes environ 10 secondes avant tout contact avec un liquide, une colonie bactérienne...

Ne jamais passer du plastique ou la pince en bois dans la flamme. N'utilisez pas les mains

9

mouillées en alcool

- Four pasteur

C'est un four - étuve à air chaud et sec. Il est utilisé pour la stérilisation de la verrerie vide (tubes à essai, boîtes de Pétri, tubes à culture et bouchons, pipettes Pasteur et récipients divers).

La verrerie à stériliser doit être propre et parfaitement sèche, éventuellement bouchée avec du coton et emballée dans du papier solide. Elle est alors disposée à l'intérieur du four et subit un chauffage de :

- 30 minutes à 1 heure à 170° - 180°C ou
- 2 heures à 160°C ce qui a pour but d'éviter le brunissement du coton.

Le matériel ainsi stérilisé sera laissé dans l'étuve jusqu'à son refroidissement complet, puis stocké à l'abri des poussières. Pour ces opérations, compte tenu des températures relativement élevées, il est conseillé d'utiliser le plus possible de la verrerie de type "pyrex".

B. Chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide, reconnaît trois modalités

- La stérilisation à l'autoclave,
- La Pasteurisation,
- La Tyndallisation,

a. Autoclave

C'est un appareil très performant qui est indispensable dans une unité de microbiologie. Il est utilisé pour stériliser les milieux de culture neufs ou souillés, mais peut également stériliser tout autre matériel de microbiologie.

Le chauffage a lieu sous pression de vapeur d'eau, à une température de 100° à 130°C, pendant une durée qui varie en fonction du milieu, de la température utilisée et du volume des récipients.

En milieu saturé d'humidité et sous pression, la stérilisation s'opère à des températures inférieures à celles qui sont nécessaires en milieu sec.

Le matériel à stériliser est déposé dans les paniers métalliques de l'autoclave dont on aura vérifié le niveau d'eau avant chaque opération de stérilisation. Les récipients sont préalablement bouchés avec du coton (éviter de le prendre avec les doigts ; utiliser de

préférence une pince) et recouverts de papier d'aluminium ou de papier d'emballage très résistant.

Pour la suite des opérations : mise en chauffe, jet de vapeur, montée de pression, lire attentivement la notice du constructeur.

b. Pasteurisation

La pasteurisation est un traitement à chaud de liquides, tuant des pathogènes mais pas forcément toutes les bactéries. Les températures de la pasteurisation se situent entre 75 à 80°C.

c. Tyndallisation

John TYNDALL: physicien irlandais (Leighlin-Bridge 1820 - Hinhead, Surrey, 1893). Il a découvert le phénomène de regel de la glace (1871), grâce auquel il a expliqué la marche des glaciers, ainsi que l'effet qui porte son nom.

Il a imaginé une méthode de stérilisation qui consiste en chauffages discontinus à une température relativement basse (60 ou 70°C suivant le cas), suivis de refroidissements. On admet qu'au cours de ces périodes de chauffage discontinu, les bactéries perdent leur aptitude à sporuler.

Actuellement, la tyndallisation consiste en une série de 3 pasteurisations de 1h. à 70 - 80°C, séparées par un intervalle de 24 heures à température ambiante, ce qui permet la germination et la destruction des spores, sans l'emploi d'une température excessive. Cette méthode est utilisée pour les milieux fragiles contenant sérum, œuf ou toute substance thermosensible de forte viscosité qui ne peut être stérilisée par filtration.

Dans le cas de son utilisation, il faut veiller à la protection des cotons, car l'humidité excessive entraîne des contaminations

2. La filtration

La filtration est une technique qui consiste à faire passer un liquide à travers un filtre dont les pores ont un diamètre de 0,2 µm. Les micro-organismes sont trop gros et sont donc retenus par le filtre.

Cette méthode est utilisée pour les milieux sensibles à la chaleur, mais n'est possible que lorsque la viscosité de ces milieux est faible. On utilise alors, suivant le cas, les bougies de porcelaine (type Chamberland), les filtres de verre poreux (le verre fritté N°5 arrête de nombreuses bactéries) ou les membranes filtrantes à usage unique, de type Millipore ou Sartorius.

Ces dernières sont actuellement les plus utilisées dans les laboratoires.

3. Autres procédés de stérilisation

Certaines matières (Plastiques, Caoutchoucs ...) ne tolèrent pas l'autoclave ou se détériorent rapidement après des expositions répétées à la chaleur.

a. Radiations

La stérilisation par les U.V. est utilisée au laboratoire pour la décontamination de l'air et des paillasse situées sous la hotte de protection. Le rayonnement n'agit que de façon directe et sa pénétration est faible. D'autres radiations (rayons X), peuvent servir pour la stérilisation industrielle des boîtes de Pétri en matière plastique et de produit pharmaceutiques.

b. Agents chimiques :

Ils sont utilisés en général pour la désinfection des salles de travail et pour la destruction des germes portés par des instruments souillés. Ce mode de stérilisation doit être systématiquement pratiqué dans le laboratoire pour les lames et pour la verrerie qui ne passe pas en autoclave.

LES ANTISEPTIQUES LIQUIDES

L'alcool éthylique à 60% pour la désinfection des paillasse et des instruments. Mais certains germes étant résistants, la désinfection n'est pas toujours évidente.

L'hypochlorite de sodium (eau de Javel) est utilisé dilué au 1/4 dans les bacs destinés à recevoir les lames usagées, ou en pissette pour la désinfection des mains, des paillasse et des sols. Rappelons que l'eau de Javel est toujours largement employée en milieu hospitalier, dans certaines industries et à domicile.

Les savons et détergents agissent surtout par leur pouvoir mouillant, ce qui facilite l'élimination des germes.

LES ANTISEPTIQUES GAZEUX

Les vapeurs d'une solution chauffée de formol sont utilisées pour désinfecter les pièces et les étuves

V. PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE POUR LE CONTROLE BIOLOGIQUE DES ALIMENTS

La culture des micro-organismes se fait soit sur milieu solide (gélose) ou sur milieu liquide (bouillon). Les milieux sont à l'origine sous forme de poudre, qu'il faut ensuite préparer.

Les milieux de culture sont pour la plupart sélectifs, c'est-à-dire qu'ils apportent les nutriments essentiels au développement de certains germes, mais contiennent des composés qui inhibent la croissance des autres micro-organismes.

1. Matériel utilisé

Verrerie selon besoins (béchers, éprouvettes, flacons), thermomètre, balance de précision, agitateur, becs bunsen, boîtes de pétri, autoclave, plaque chauffante.

2. Produits

- ✓ Milieux de culture sous forme de poudre
- ✓ Eau distillée
- ✓ HCl et NaOH (ajustement du pH)

3. Protocole

- ✓ Peser la masse nécessaire de poudre (indiquée sur sa boîte).
- ✓ Dissoudre la poudre dans l'eau distillée à l'aide de l'agitateur.
- ✓ Chauffer sur plaque chauffante jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène
- ✓ Ajuster le pH au besoin (par ajout de NaOH ou de HCl)
- ✓ Autoclaver le bouillon, si cela est indiqué sur la boîte du produit, ou alors ;

- ✓ Laisser refroidir la préparation
- ✓ Lorsque la préparation a atteint une température inférieure à 60°C couler dans des boîtes de pétri.

Exemple d'un milieu de culture solide à préparer :

Les ingrédients : milieu de culture

Les ingrédients	Quantité en gramme et en litre
Extrait de viande de bœuf	5g
Peptone tryptique	10g
Chlore de sodium	5g
Agar-Agar	15g
Eau distillée	1L

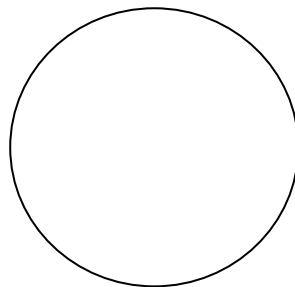
TP2. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DES MICRO-ORGANISMES DANS L'AIR, LE MANIPULATEUR, ET LE MATERIEL

Par imprudence le manipulateur en microbiologie peut éventuellement contaminer le milieu de culture sur lequel il travail.

Le but de ces manipulations est de caractériser les différentes sources de contaminations et sensibiliser le stagiaire à prendre les précautions nécessaires durant chaque manipulation pour éviter la contamination de sa culture microbienne.

➤ Contamination par l'air :

On laisse la boîte de Pétri (contient un milieu de culture) ouverte et exposée pendant 15 min à l'air ambiant et puis on la met sous incubation dans l'étuve à 30°C pendant 72h.



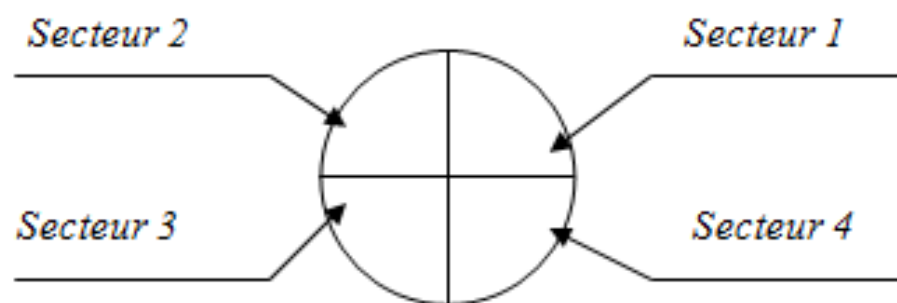
➤ Contamination par le manipulateur :

Cette expérience contient trois manipulations à réaliser:

1. Contamination par les doigts

On divise la gélose coulée dans la boîte de Pétri en 4 secteurs sur lesquels on applique successivement un doigt qu'on lave chaque fois de façon plus efficace :

- Secteur 1 : doigt non lavé.
- Secteur 2 : doigt lavé à l'eau.
- Secteur 3 : doigt lavé à l'eau et au savon.
- Secteur 4 : doigt lavé avec l'alcool ou à l'eau de javel (désinfection).



2. Contamination par les cheveux

Prendre une partie de vos cheveux et le mettre en boîte de pétri contenant le milieu de culture solide, en fermant la boîte de pétri dans la zone aseptique.

Incuber la boîte de pétri à 30° C pendant 48-72h

Après incubation d'un milieu de culture contaminé par un cheveu, observer le développement des microorganismes au long des cheveux.

3. Contamination par la voie rhinopharyngique

Souffler dans la boîte de pétrie contenant le milieu de culture solide et observer le développement des microorganismes après son incubation à l'étuve à 30°C pendant 48-72h..

➤ Contamination par le matériel

Mise en évidence des microorganismes présents dans le matériel de laboratoire non stérile : anse, pipette... par passage de ces instruments dans la boîte de pétri contenant le milieu de culture solide dans la zone aseptique. Faire incuber la boîte de pétri à une température de 30°C pendant 48-72h.

TP. N° 3 - EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CULTURES

I. Examen macroscopique

1. Aspect de colonies en surface sur milieu solide

1.1. La taille

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. On distingue les petites colonies ($< 1\text{ mm}$), les moyennes ($1\text{ à }3\text{ mm}$), les grandes colonies ($> 3\text{ mm}$). Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible pour mesurer la taille des petites colonies en utilisant de micromètres oculaires.

1.2. La forme

- Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers, ronde, bords dentelés, en étoile, ovoïde...
- La forme avec vue de profil (bombée, plate, ombiliquée, à bords surélevés ou en oeuf au plat)
- Centre : parfois surélève, parfois ombiliquée (en creux)

1.3. L'aspect de la surface

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueux, renvoyer la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

1.4. L'opacité

Les colonies sont décrites comme :

- ✓ 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)
- ✓ Transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre, on ne parle de gouttes de rosée).

1.5. 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).

1.6. La couleur et/ou pigment

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). 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. Aspect des colonies en profondeur

- Colonies régulières en formes de lentilles,
- Colonies irrégulières de formes diffuses et floues.

3. Aspect des colonies en surface sur gélose linéaire

- Filiformes
- Légèrement envahissantes avec bords ondulés
- Légèrement envahissantes avec bord érodé
- Envahissante

4. Aspect de la pousse en milieu liquide

Elle se manifeste sous différentes formes :

- * Trouble : les microorganismes se trouvent en suspension dans le bouillon.
- * Voile : les micro-organismes aérobies poussent à la surface du bouillon.
- * Culot : dépôt au fond du tube.

Cette description aboutit à distinguer 3 types principaux de colonies :

- **Colonies S (smooth en anglais)** : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées de consistance crémeuse. Elles donnent des suspensions homogènes.
- **Colonies R (rough en anglais)** : colonies à surface rugueuse et bords souvent dentelés, plates, de consistance sèche. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- **Colonies M (pour muqueuse)** : colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées mais filantes au prélèvement à l'anse. Elles donnent des suspensions hétérogènes.
- Tous les intermédiaires sont possibles (ex. SR).

5. Mode opératoire

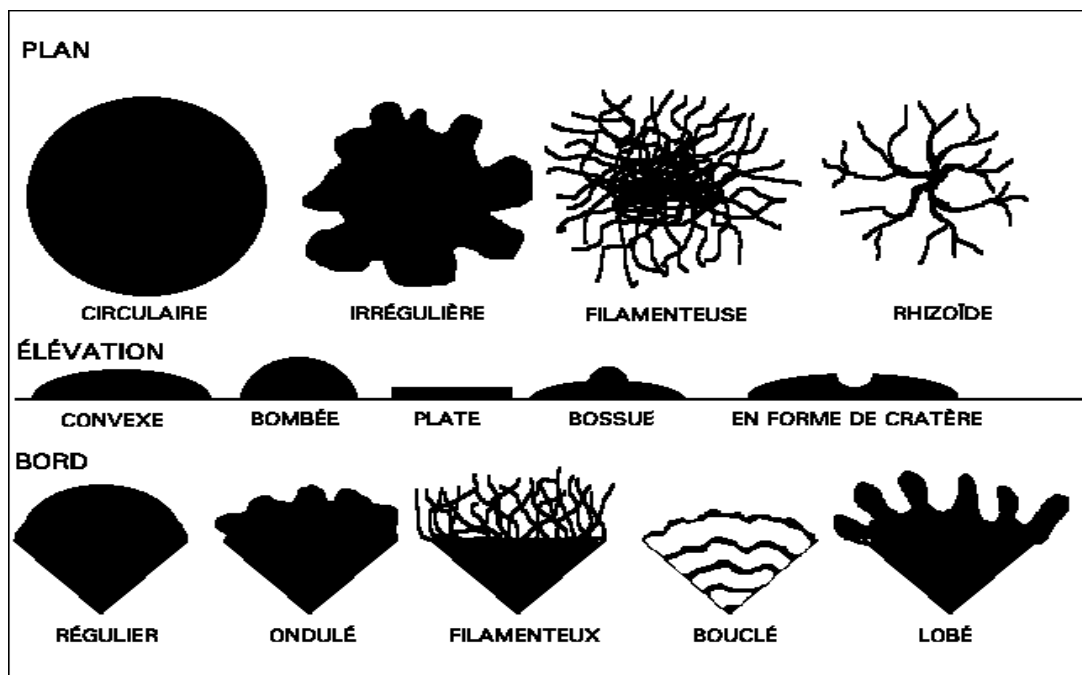
a. Milieu solide

- ✓ Repiquer différents aspects et formes de colonies sur des tubes de gélose linéaire
- ✓ Incuber à 37°C pendant 24 h

- ✓ Observer les différents aspects.

b. Milieu liquide

- ✓ Repiquer à l'aide d'une anse de platine des colonies différentes dans des tubes de bouillon nutritifs
- ✓ Flamber l'anse après chaque repiquage
- ✓ Incuber à 37 °C pendant 24 à 48h
- ✓ Observer les différents aspects de pousse en milieu liquide



TP. N°4 - L'EXAMEN MICROSCOPIQUE DES BACTÉRIES ET COLORATION DIFFERENTIELLE

Deux possibilités se présentent : observation des cellules vivantes (à l'état frais) ou observation des cellules mortes (après fixation) :

I. EXAMEN MICROSCOPIQUE

1- Observation à l'état frais

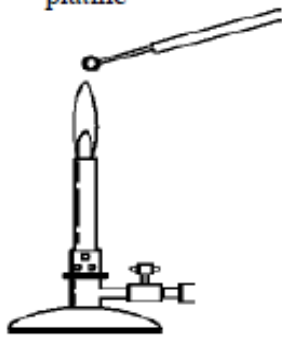
Cet examen nous renseigne sur la forme et la mobilité des cellules microbiennes.

A faire uniquement à partir d'un bouillon. Déposer la suspension bactérienne avec l'anse de platine totalement refroidie (1 ou 2 anses) sur la zone centrale de la lame. Éviter les excès de liquide (risque de contamination et gêne l'observation)

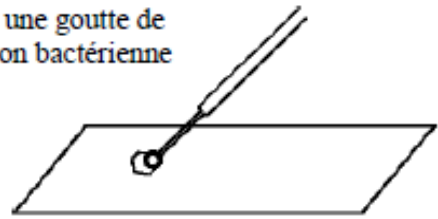
- Recouvrir d'une lamelle le liquide. Éviter les bulles d'air. Recommencer au besoin.
- Observer rapidement en faible luminosité sans huile : poser la lame avec lamelle sur la platine de microscope, faire la première observation à l'aide de l'objectif X 10. Puis passer à l'objectif X 40. Veuillez ajuster par le vis micrométrique jusqu'au avoir la netteté de l'observation.

Récupérez les lames et lamelles dans bécchers remplies en eau de javel.

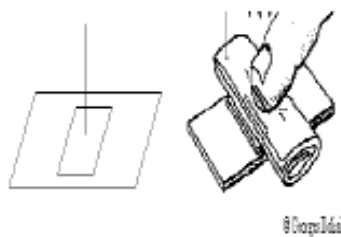
1. Flamber l'anse de platine



2. Déposer une goutte de la suspension bactérienne



3. Recouvrir d'une lamelle



2- Observation après fixation et coloration

Avant de faire une coloration, on doit préparer le frottis puis procéder à la fixation qui se fait soit par la chaleur soit par immersion dans un alcool. Le but de la fixation est de donner aux microorganismes une mort brutale et rapide afin qu'ils puissent garder leur forme initiale.

La coloration peut être simple (à l'aide d'un seul colorant, exemple : bleu de méthylène) ou double (à l'aide de deux colorants, exemple : la coloration de GRAM avec le bleu de gentiane et la fushine). Ce type d'observation donne une idée sur la forme et le mode d'arrangement des cellules microbiennes.

L'observation microscopique permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce bactérienne.

A. Réalisation des frottis : Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière, puis séchés et fixés.

- a. Notez la référence de l'échantillon sur une lame parfaitement propres et dégraissées,
- b. **A partir d'une culture en milieu liquide :** Déposer sur une lame propre soit le contenu d'une « anse de platine » soit « une petite goutte » à l'aide d'une pipette

Pasteur. Recouvrir la goutte en utilisant une lamelle, échapper l'air existant entre lame et lamelle par glissement de la lamelle.

A partir d'une culture sur milieu solide : Déposer une gouttelette de liquide (milieu liquide ou eau) sur la lame. Prélever une trace de culture à l'anse de platine et l'émulsionner dans le liquide.

- c. Séchage :** Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.
- d. 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 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. Ne pas brûler les bactéries sinon l'observation sera délicate voire impossible. La lame doit être totalement sèche. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.

B. COLORATIONS SIMPLES : (Coloration au bleu de Méthylène)

La coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes.

Mode opératoire :

Sur le frottis fixé et refroidi :

- ✓ Faire couler la solution de bleu de méthylène phéniqué jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte.
- ✓ Laisser agir 1 minute.
- ✓ Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès.
- ✓ Sécher à l'air ou sur une platine chauffante, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans frotter.
- ✓ Examiner au microscope, objectif à immersion.

C. COLORATION DIFFERENTIELLE DE GRAM

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries en Gram positif et en Gram négatif, cette distinction est fondamentale pour leur identification.

En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Réactifs :

- ✓ Violet de gentiane phénique
- ✓ Lugol (iodo-iodure de potassium)
- ✓ Alcool à 95% (ou mélange alcool absolu+ 1/5ème d'acétone)
- ✓ Safranine (ou Fuchsine phéniquée de ziehl).

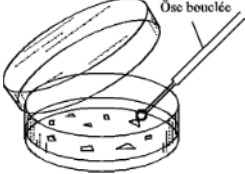
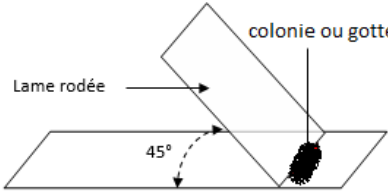
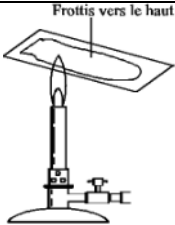
Mode opératoire :

1. préparer un frottis et le fixer à la flamme
2. Verser le Violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1 minute
3. Jeter le colorant et finir de la chasser par la solution de Lugol ; laisser agir le Lugol environ 1 min
4. Jeter le Lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; rincer immédiatement à l'eau.
5. Recouvrir la préparation de Safranine, laisser agir environ 1 min et laver abondamment.
6. Sécher au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen ou un papier jetable. Nettoyer au besoin le dessous de la lame avec un papier jetable. La lame doit être totalement sèche.
7. Observer à l'immersion en pleine lumière : Mettre une goutte d'huile à immersion sur la lame totalement sèche. Observer à l'objectif x 100 (objectif à immersion). Ouvrir le diaphragme. (Monter le condensateur si le microscope le permet). L'objectif doit toucher la goutte d'huile

Résultats :

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

- Des bactéries colorées en violet foncé ; elles ont gardé le violet, 'le Gram' elles sont dites 'Gram positif' ;
- Des bactéries colorées en rose ou rouge pâle ; elles ont perdu le violet, 'le Gram' elles sont dites 'Gram négatif'.

Prélever une partie d'une colonie isolée	
Réaliser un étalement sur lame	
Fixer à la chaleur	
Réaliser les étapes de coloration	