

INATAA/Université Frères Mentouri, Constantine 1
Travaux pratiques de microbiologie générale
1^{ère} année Licence Sciences Alimentaires

TP3: Examen microscopique des bactéries après colorations simple

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées, fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants. Les colorations, réalisées sur des frottis secs et fixés, sont classées en :

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

Remarque:

La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration.

1. Réalisation des frottis :

Les frottis doivent être étalés en couche mince et régulière, puis séchés et fixés.

1.1. Etalement sur lame de verre :

Prélever stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne et l'étaler.

1.2. Séchage :

Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

1.3. 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. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.

2- Coloration simple:

Par définition, une coloration simple veut dire colorer un frottis microbien par l'utilisation d'un seul colorant.

Objectif:

Déterminer la morphologie des cellules étudiées ainsi que leur mode de regroupement.

Matériel:

- Suspensions bactériennes pures (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).
- Lames, anses de platine.
- Bleu de méthylène, eau distillée.
- Bec bunsen, microscopes.
- Huile de paraffine, papier filtre, xylène, papier Joseph, coton.

Méthodes:

- Préparer un frottis.
- Fixer le frottis par la chaleur.
- Inonder le frottis de bleu de méthylène, attendre 5 minutes.
- Rincer le frottis à l'eau distillée.
- Sécher la lame avec du papier filtre (sans froter) puis au bec bunsen.
- Faire une observation à immersion.