

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

TP4: Examen microscopique des bactéries après coloration de Gram

La coloration de Gram 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 toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool 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.

Objectif:

Déterminer le Gram des cellules observées, leur morphologie ainsi que leur mode de regroupement.

Matériel:

- Suspensions bactériennes pures (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*).
- Lames, anses de platine.
- Violet de gentiane, lugol, fushine, alcool et eau distillée.
- Bec bunsen, microscopes.
- Huile de paraffine, papier filtre, xylene, papier Joseph, coton.

Méthodes:

- Préparer un frottis.
- Fixer le frottis par la chaleur.
- Inonder le frottis de violet de gentiane, attendre 2 minutes.
- Verser le violet de gentiane et recouvrir le frottis de lugol, laisser agir 2 minutes.
- Verser le lugol, rincer à l'alcool puis à l'eau distillée.
- Recouvrir le frottis de fushine, laisser 2 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.

Résultats:

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

- Des bactéries colorées en violet foncé; elles ont gardé le violet de gentiane, elles sont dites «bactéries à paroi Gram positif».
- Des bactéries colorées en rose; elles ont perdu le violet de gentiane, elles sont dites «bactéries à paroi Gram négatif».