**Université Echahid Hamma Lakhdar d'El Oued**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie Département de biologie**

**Dr. MEKHADMI Nour Elhouda**

**Travaux Pratiques en Microbiologie Générale 2eme Année Ecologie et Agronomie**

**TP N 2 Observation Microscopique et Coloration de GRAM**

**1-Méthodes d’étude :**

Compte tenu de leur mille (de l'ordre du micron), elles seront visualisées par le microscope.

**Microscopie électronique:** G x > 10.000 fois .

**Microscopie optique:** G x 1000 -1500 fois.

La présence de bactéries est habituellement recherchée avec un microscope optique sans coloration (état frais) ou après coloration (travaux pratiques).

1. **Observation a Etat frais :**

C'est une technique rapide et facile qui permet de voir la bactérie vivante et d'apprécier sa mobilité, sa morphologie et son mode de groupement. Il se fait directement à partir du produit pathologique (urine ,LCR,...) ou à partir d'une suspension bactérienne. Pour observer la mobilité, on doit prendre garde à ne pas détruire les flagelles bactériens lors du prélèvement et de la préparation de la lame. Différents supports peuvent être utilisés : [lame et lamelle](https://microbiologie-clinique.com/examenmicroscopique.html#lame) ,[cellule de MALASSEZ](https://microbiologie-clinique.com/examenmicroscopique.html#malassez),[cellule de NAGEOTTE](https://microbiologie-clinique.com/examenmicroscopique.html#nageotte)

**Example**

 Voici un examen d'urine mettant en évidence des polynucléaires neutrophiles (G x 400).

**b-Après coloration:** Voici un examen de pus urétral après avoir coloré la lame avec une solution de bleu de méthylène: il y a mise en évidence de polynucléaires neutrophiles ayant phagocyté des bactéries de type diplocoque (G x 1000) .

 **Diverses techniques de coloration**: existent, mettant en évidence des affinités tinctoriales différentes telle la coloration de Gram, très utilisées en pratique courante ou encore celle de l'imprégnation argentique pour révéler les spirochètes ou encore celle révélant le caractère acido-alcoolo-résistant de certains bacilles (BAAR mycobactéries).



**2- La coloration de Gram :**

**Principe :**

Les différences de constitution et de structure chimique des parois Gram (+) et Gram (-) permettent d’établir le principe de la coloration élaborée par Christian GRAM (1884) :

* Procédure de la coloration de Gram :
* Après fixation du frottis on colore avec le violet de gentiane.
* On rince avec de l’eau.
* On rajoute un fixateur qui est le lugol. On rince avec de l’eau distillée.
* On procède ensuite à une étape de décoloration par un mélange d’alcool et d’acétone.

Ce dernier pénètre dans les bactéries Gram négatives et non dans les bactéries Gram positives dont les pores ont fermés par déshydratation par l’alcool. On rince et on procède à

* une contre coloration à la safranine. Les Gram positives vont apparaître violets et les Gram négatives roses.

Se dit d'une observation au microscope au fort grossissement (x1000). Cette observation nécessite l'utilisation d'une goutte d'huile d’immersion qui s'interpose entre l'objectif (100) et la lame porte-objet.

