

Travaux pratiques de microbiologie générale

TPN°2 : Examens macroscopique et microscopique des micro-organismes

Introduction

L'étude morphologique d'une bactérie inconnue est la première étape d'identification de ce micro-organismes, suivie de plusieurs autres (étude physiologique, chimio-taxonomique, moléculaire). Toutes les données recueillies, mèneront le chercheur à identifier le micro-organisme c'est-à-dire attribué à ce dernier le nom du genre et celui de l'espèce.

I. Etude macroscopique

Il s'agit d'un examen à l'œil nu ou à faible grossissement les boîtes de Pétri et de noter l'aspect des colonies bactérienne, ceci requière certaines conditions :

- La culture doit être pure
- Les colonies doivent être isolées (pas collées entre elles)
- La culture doit être jeune (aux environs de 24 heures)

Les caractéristiques d'une colonie bactérienne sont les suivantes :

1. La taille

Colonie punctiforme si le diamètre est inférieur à 1mm, s'il est supérieur à 1 mm on le mesure

2. La transparence

Apprécies en lumière naturelle ou artificielle

- Colonies transparentes
- Colonies translucides
- Colonies opaques

3. La consistance

Grasses, sèches, visqueuses...

4. Aspect de la surface

C'est un aspect particulièrement important. Il sert à différencier les colonies lisses « S » (Smooth), souvent formées par les germes pathogènes, des colonies rugueuses « R » (Rough) constituées généralement par des germes saprophytes. Il existe donc des colonies, lisses, rugueuses, brillantes, sèches, poudreuses, plissées, muqueuses...

5. La pigmentation

La production d'un pigment (la couleur) et la diffusion (soluble ou non).

6. L'odeur

Certaines bactéries présentent une odeur caractéristique

7. Elévation des colonies

Plates, surélevées, bombées, colonies à centre ombiliqué...

8. Contours des colonies

Lisses ou irréguliers, colonies circulaires, ondulées, amiboïdes...

II. Etude microscopique

L'étude microscopique consiste à étudier :

- La forme de la cellule bactérienne : Cocci, bâtonnet, spiralee, filamenteuse.
- L'arrangement cellulaire : isolées, en chaîne, en grappe...
- La mobilité
- La sporulation : présence ou absence, forme et position de la spore
- Le type de Gram : positif ou négatif.

L'examen morphologique des micro-organismes peut se faire soit à l'état frais, soit après coloration :

1. Examen à l'état frais (manipulation)

Cet examen donne certains renseignements sur « la forme », « le nombre de bactéries », mais son intérêt réside surtout dans l'étude de la « mobilité » des germes.

La bactérie mobile doit se déplacer dans le champ microscopique avec un mouvement qui lui est propre. Cette mobilité ne doit pas être confondue ni avec les mouvements browniens, se traduisant par des mouvements désordonnés autour d'un axe sans déplacement véritable, ni avec les mouvements transmis par les courants de convection entraînant toutes les bactéries dans le même sens.

1.1. Prélèvement à partir de culture en milieu liquide

- Flamber la pipette Pasteur ou l'anse de platine, tenue par la main droite, sur toute sa longueur
- Agiter la culture bactérienne prise de la main gauche, saisir le bouchon dans le pli du cinquième doigt de la main droite (entre l'auriculaire et la paume de la main) et l'enlever en lui imprimant un mouvement de rotation. Incliner légèrement le tube ouvert et flamber son ouverture aussitôt qu'il aura été débouché, y plonger alors l'anse de platine refroidie, elle est alors chargée de bactéries.
- Retirer l'anse de platine en la remontant horizontalement, reflamber l'ouverture du tube et le reboucher
- Déposer une goutte de la culture bactérienne sur la lame. Repasser l'anse de platine sur la flamme du bec Bunsen jusqu'à rougissement du fil de platine, en cas d'utilisation de pipette Pasteur, celle-ci est déposée, après usage, dans un récipient contenant un désinfectant.
- Ne jamais oublier de laisser refroidir la pipette ou le fil de platine avant d'effectuer le prélèvement, sinon les bactéries seront tuées par la chaleur.
- Poser ensuite délicatement la lamelle, bien orientée. La goutte doit être suffisante mais proportionnée à la lamelle choisie : le liquide ne doit pas déborder.

- Répartir le liquide sous la lamelle en appuyant très légèrement avec l'extrémité d'une pince, mais jamais avec la pulpe du doigt (les traces grasses rendent impossible tout examen microscopique).
- Examiner la préparation sous le microscope à sec à l'aide des objectifs (X10) et (X40)
- Après avoir examiné la culture, désinfecter et laver les lames avec une solution désinfectante.
- Les bactéries manipulées sont vivantes : toutes les précautions doivent être prises pour éviter de se contaminer ou de contaminer l'environnement.

1.2. Prélèvement à partir de culture sur milieu solide

- L'examen doit être fait dans la mesure du possible à partir de « culture jeune ». Préparer une suspension de la colonie dans de l'eau physiologique et prélever comme il a été décrit précédemment (à partir d'une suspension liquide). Le prélèvement peut aussi être effectué directement à partir du milieu solide et l'on procède comme suit :
- Déposer au centre de la lame une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique, y dissocier une très petite quantité de culture à l'anse flambée et refroidie.
- Poser la lamelle comme il a été décrit précédemment.

Il y a souvent un intérêt à effectuer une suspension épaisse dans une microgoutte déposée à côté de la goutte normale et l'incorporer peu à peu à la totalité du liquide. Cette technique permet d'obtenir une suspension plus homogène et moins riche en bactéries.

2. Examen microscopique après coloration

Les colorations sont indispensables à l'étude précise de la morphologie, voire la structure des bactéries. Par ailleurs les préparations colorées peuvent se conserver très longtemps.

2.1. Préparation des frottis : (manipulation)

Le frottis destiné à la coloration doit être étalé en couche mince et régulière, séché et le plus souvent fixé

- Etalement

Les lames utilisées doivent être parfaitement propres et dégraissées. La technique de prélèvement est celle décrite pour l'examen à l'état frais. Etaler donc la goutte de culture ou de suspension bactérienne en un film mince et régulier. L'étalement est effectué de préférence, par un mouvement circulaire régulier à l'aide de l'anse de platine.

- Séchage

Il doit se faire autant que possible à la température du laboratoire. Il est très rapide si la lame est parfaitement dégraissée et le frottis mince et régulier. Le frottis peut, éventuellement, être séché en utilisant la chaleur douce, en posant la lame sur une platine chauffante réglé à 37°C, ou en maintenant la préparation dans l'air chaud au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.

-Fixation

Elle consiste à tuer les bactéries et à les fixer sur la lame, sans en altérer la structure. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées:

Fixation par l'alcool flambé

Elle consiste à mettre sur la lame quelques gouttes d'alcool à 95° et enflammer après quelques secondes de contact. Il faut attendre le refroidissement de la lame avant de commencer toute coloration.

Fixation par la chaleur

Elle consiste à passer la lame dans une flamme chauffante, le geste doit être lent et la lame doit écraser 3 à 4 fois la flamme. Il faut attendre le refroidissement de la lame avant de commencer toute coloration.

2.2. Coloration

A) Coloration simple : Elle consiste à faire agir sur le frottis un seul colorant.

Coloration simple au bleu de méthylène

Cette coloration consiste à déterminer la forme des bactéries (bacille, cocci..) qui sont colorées en bleu sombre et leur groupement (isolés, amas diplocoques, chaînettes), pour cela :

- Déposer une goutte de l'échantillon sur une lame puis sécher et fixer sur la flamme du bec Bunsen (éviter un chauffage trop violent).
- Inonder la lame avec du bleu de méthylène, laisser agir quelques minutes selon la concentration du colorant.
- Rincer à l'eau du robinet et sécher entre deux feuilles de papier filtre ou devant la flamme du bec Bunsen.
- Examiner au microscope optique, grossissement x100 à immersion.

B) Colorations différentielles

Les colorations différentielles sont des méthodes permettant de distinguer entre eux les différents types bactériens.

Coloration de Gram : (manipulation)

Elle consiste à déterminer le type de Gram (positif ou négatif) de la bactérie étudiée.

La coloration de Gram est la coloration de base en microbiologie, permettant de colorer les cellules bactériennes et de les distinguer à l'examen direct en fonction de la structure de leur paroi.

La coloration de Gram est basée sur l'action successive de plusieurs substances; dans un premier temps, le colorant (violet de gentiane) pénètre dans le cytoplasme à travers la paroi, dans un second temps, une solution iodée (lugol) réagit avec le colorant et le rend insoluble. La décoloration par l'alcool des bactéries à Gram négatif est due à la présence de membrane externe riche lipides (phospholipides) et une très fine couche de peptidoglycane, tandis que les bactéries à Gram positif restent colorées en violet du fait de leur imperméabilité due à la présence d'une couche épaisse de peptidoglycane. Une accentuation de coloration (rose par la fuschine), permet de visualiser à nouveau les bactéries à Gram négatif.

- Préparation d'un frottis : Déposer une goutte d'eau physiologique sur une lame propre, prélever une colonie bactérienne et l'étaler sur la lame, sécher et fixer la préparation devant le bec Bunsen.

- **Coloration** : Recouvrir le frottis d'une solution de violet de gentiane, laisser agir 1 minute.

- Recouvrir la lame de lugol en et laisser agir 1 minute.

- Laver à l'eau courante (eau distillée).

- **Décoloration** : Décolorer la préparation à l'alcool à 95° pendant 30 secondes. Pour cela, verser l'alcool sur la surface de la préparation placée obliquement et observer sa couleur en s'écoulant, il est d'abord violet puis bleuté et enfin incolore ; arrêter à ce stade.

- Laver rapidement à l'eau courante (eau distillée).

- **Contre coloration** : Recouvrir la lame de solution de fuschine et laisser agir 30 secondes à 1 minute.

- Rincer à l'eau et sécher entre deux feuilles de papier filtre.

- Observer en immersion (X100).

- Noter les résultats observés.

B) Colorations spécifiques

- La spore

Il existe des espèces bactériennes produisant des spores dans des conditions de vie défavorables. Ces spores résistent aux conditions physico-chimiques du milieu plus facilement que les cellules végétatives. Elles ont ainsi la particularité d'être thermorésistantes.

- Préparer un frottis à partir d'une vieille culture de *Bacillus*.

- Couvrir le frottis de vert de malachite, laisser agir 3 à 5 minutes, chauffer sur la veilleuse du bec bunsen jusqu'à émission de vapeurs blanches.

- Rincer à l'eau et recouvrir d'une solution de fuschine basique à 0,85% et laisser agir 1 minute.

- Rincer, sécher entre deux feuilles de papier filtre et observer au grossissement x100 à immersion.

- Les spores de couleur vertes sont libres ou incluses dans des corps bactériens roses.

-La capsule

- Prépare une suspension bactérienne sur une lame à partir d'une souche de *Klebsiella pneumoniae*.

- Déposer à côté une petite goutte d'encre de Chine.

- Recouvrir d'une lamelle (les deux gouttes se mélangent).

- Examiner la préparation à l'objectif x 40, en particulier dans la zone où l'encre de Chine est diluée.

- La capsule apparaît comme un halo clair autour des corps bactériens

Mr : SADRATI. N