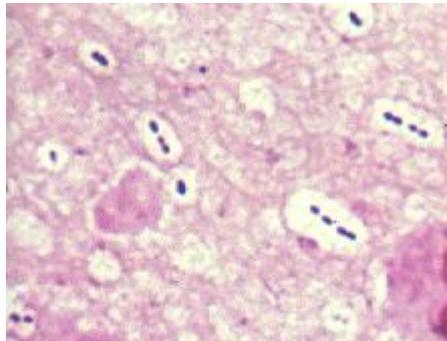


UNIVERSITE DE MOULAY TAHAR SAIDA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
TRAVAUX PRATIQUES
DE MICROBIOLOGIE
Niveau 2^{ème} année licence.



**TP4 : EXAMEN MICROSCOPIQUE APRES COLORATIONS
SIMPLES : (Coloration au bleu de Méthylène)**

Préparé par : M . Hansal Nabila

2019-2020

TP4 : EXAMEN APRÈS COLORATION (Coloration au bleu de Méthylène)

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 sèches et fixes, sont classées en :

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

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

I. Réalisation des frottis :

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

1. Etalement sur lame de verre :

1. Notez la référence de l'échantillon sur une lame parfaitement propres et dégraissées,
2. Prélevez stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de culture bactérienne et étalez un film mince,

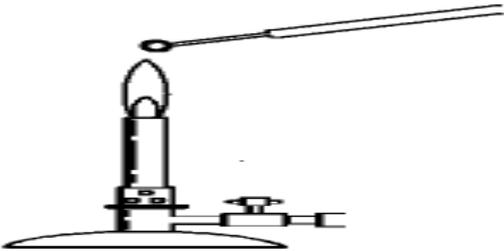
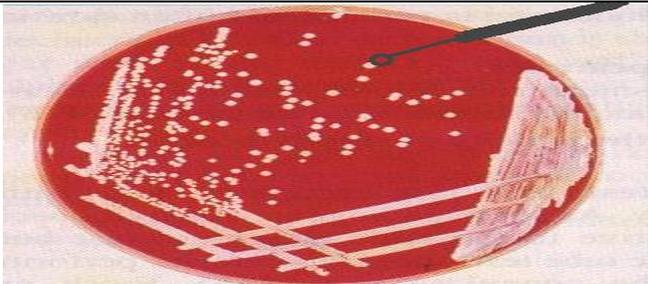
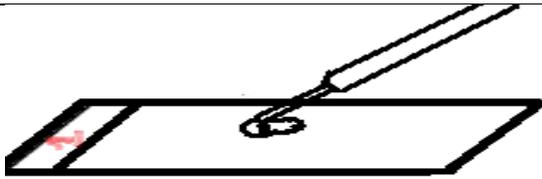
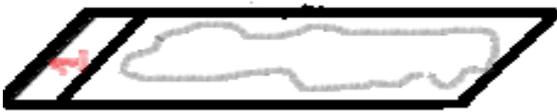
2. Séchage :

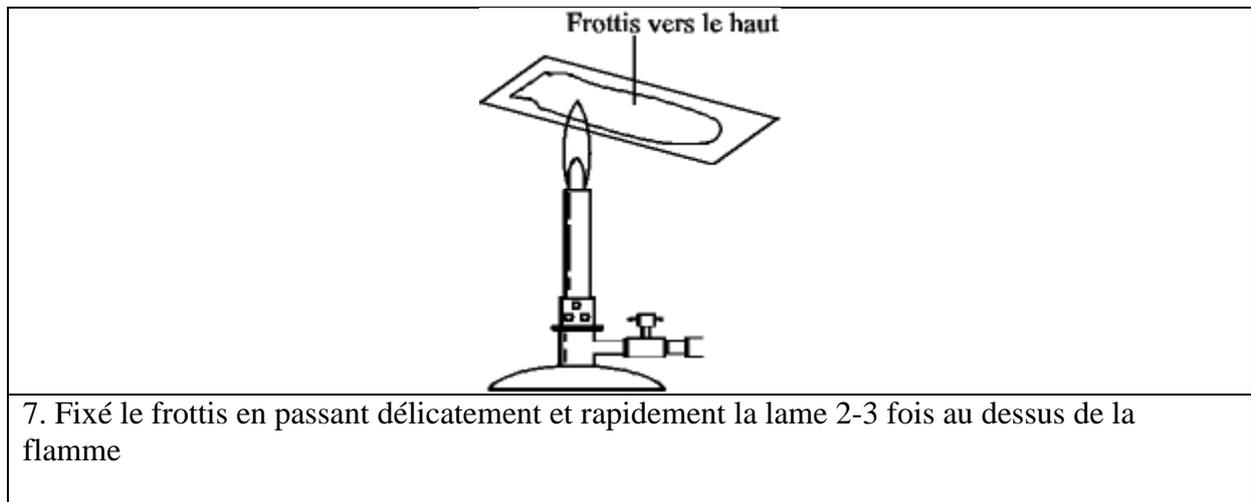
Le séchage est effectué à l'aire libre jusqu'à ce que le frottis présente un aspect mat.

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 3ou 4 fois dans la flamme du bec Bunsen. Laisser refroidir avant d'entreprendre une coloration.

	
1. Identifier la lame	2. Déposer une goutte d'eau
	
3. Flamber l'anse	4. Prélever une partie d'une colonie isolée
	
5. Mélanger les bactéries avec la goutte d'eau	6. Laisser sécher l'étalement à l'air



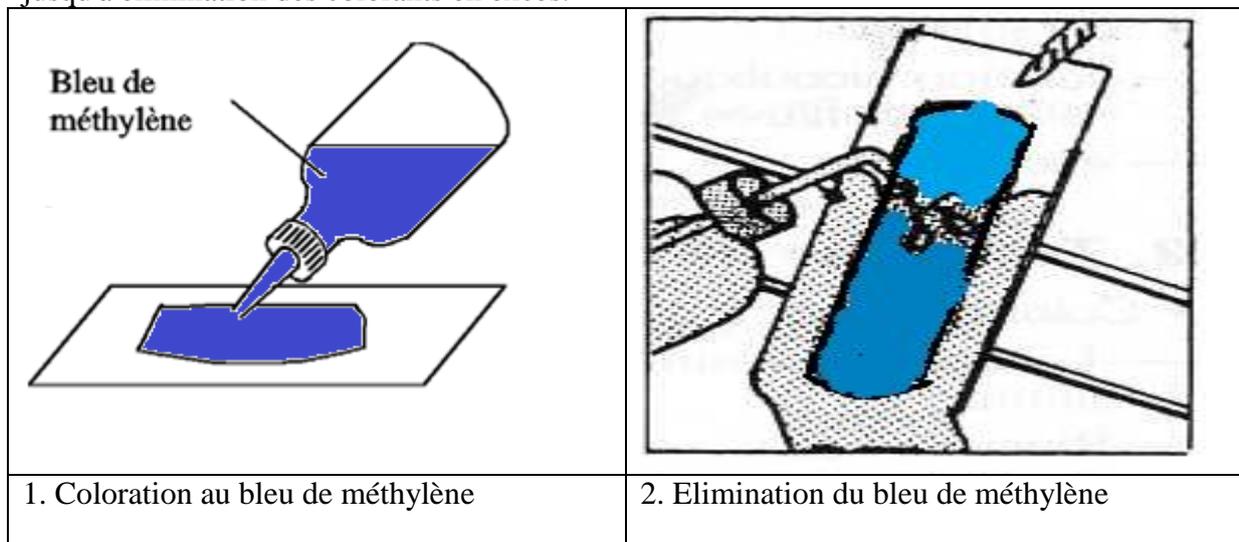
II. COLORATIONS SIMPLES : (Coloration au bleu de Méthylène)

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.

Résultats

Les bactéries sont colorées en bleu sombre. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries.