

## Observations microscopiques au laboratoire de microbiologie : 2 techniques de base

### 1. Réalisation et observation d'un état frais en microscopie à fond clair

Une préparation est obtenue avec le dépôt d'une goutte entre lame et lamelle, puis on observe au microscope. Si cette technique permet des observations morphologiques, elle est surtout utilisée pour des observations de mobilité. Il faut alors réaliser la préparation à partir d'une culture jeune en milieu liquide.

Ci-dessous le mode opératoire avec une analyse des risques et de sécurité (adapté des analyses de mode opératoire 3rb, partenariat Éducation Nationale / INRS sur [www.3rb-bgb.com](http://www.3rb-bgb.com))

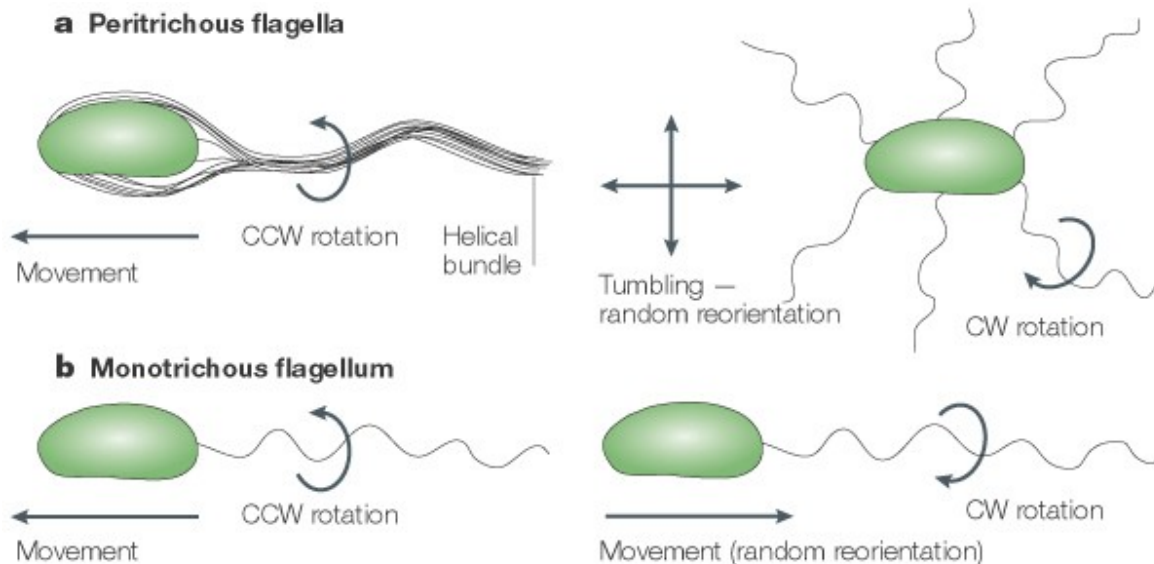
Étapes du mode opératoire	Analyse de risque	Prévention
Préparer le matériel.	Connaître l'origine de l'échantillon et le risque micro biologique associé afin de gérer les conditions générales des manipulations. Organiser la paillasse.	
Préparer le matériel de prélèvement de culture	Bris de verre/blessure par coupure + brûlure si utilisation de pipettes Pasteur traditionnelles à stériliser à la flamme	Utiliser du matériel plastique stérile à usage unique.
Homogénéiser la suspension microbienne. Ouvrir le tube .	Aérosol contamination par inhalation	Limiter l'agitation créant les aérosols Attendre quelques secondes, le tube fermé
Une goutte de suspension sur une lame.	Produits biologiques potentiellement infectieux	Déposer une petite goutte. Attention à ne pas contaminer la paillasse ... (si problème, désinfecter...)
Éliminer la pipette dans un conteneur pour déchets contaminés.	Si pipette Pasteur traditionnelle : déchet piquant potentiellement infectieux / contamination par piqûre	Conteneur approprié situé à proximité.
Déposer une lamelle sur la goutte de suspension sans débordement. Observer au microscope (x400).	Produits biologiques potentiellement infectieux contamination par contact des mains et du matériel	Recommencer la manipulation s'il y a débordement après avoir éliminé la lame.
Éliminer la lame après observation.	Objet coupant potentiellement infectieux contamination par coupure	Placer la lame immédiatement après observation dans un conteneur approprié.
Éliminer les déchets et matériel contaminés. Nettoyer et désinfecter la paillasse. Se laver les mains.	Produits biologiques potentiellement infectieux contamination des mains et du matériel	Organiser le tri des déchets et le rangement

Pour observer la mobilité il faudra toujours tenir compte des mouvements browniens et d'éventuels courants liquidiens.

Les bactéries à ciliature polaire (monotriche : un seul flagelle polaire ou lophotriche : une touffe de flagelles polaires) se déplacent en ligne droite avec des changements de sens réguliers. Par exemple le flagelle polaire tourne et propulse puis s'arrête ; la bactérie se réoriente (au hasard) ; la propulsion par le flagelle reprend. Il existe des flagelles à rotation anti-horaire ou horaire : la bactérie peut ainsi nager en propulsion ou en traction.

Les bactéries à ciliature péritriche (flagelles entourant toute la surface bactérienne) présentent des mouvements tournoyant (effets de culbute quand quelques uns des flagelles changent de sens de rotation). Les bactéries à ciliature amphitriche (un flagelle à chaque pôle) se déplacent en zig-zag.

Les spirochètes ont un « flagelle interne », le filament axial qui donne la mobilité caractéristique en translation, rotation, flexion.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
**Nature Reviews | Microbiology**

There are many schemes for flagellation in bacteria, of which peritrichous flagella and a single polar (monotrichous) flagellum are two types. a | In the case of peritrichous flagella, such as those found in *Escherichia coli*, counter-clockwise (CCW) flagellar rotation results in the formation of a helical bundle that propels the cell forward in one direction in a smooth-swimming motion (a 'run'). By contrast, the presence of clockwise (CW) rotation causes unbundling of the helical bundle, allowing the bacterium to randomly reorient its direction (a 'tumble'). b | In the case of a single polar flagellum, CCW rotation propels the cell forward in a run, whereas CW rotation propels the cell backward with a concomitant random reorientation.

## 2. Coloration de Gram

### Mode opératoire type commenté

<p><b>Specimen Preparation :</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Apply the test specimen to a clean glass slide in a manner that will yield a thin, uniform smear.</li> <li>2. <u>Allow the smear to air dry.</u></li> <li>3. <u>Fix smear</u> to slide using one of the following fixation techniques:</li> </ol>	<p>Il est fondamental d'assurer le séchage complet des frottis avant fixation : permet une bonne fixation et évite la formation d'aérosols (= argument de sécurité). Il est vivement recommandé d'utiliser du matériel de prélèvement à usage unique. L'utilisation d'une anse devant être flambée exige généralement son passage en mélange de décontamination sable/crésyl ou sable/alcool 70 % avant flambage pour éviter des risques liés aux aérosols.</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Heat fix by passing slide through a low flame 3-4 times or by placing on a heat block (56-65 °C.) for several minutes. Allow slide to cool to room temperature before staining. <b>Note:</b> Do not overheat slide. Excessive heating will cause atypical staining.</li> <li>• Methanol fix slide by flooding with absolute methanol for 1-2 minutes and rinse with tap water before staining.</li> <li>• Ethanol fix slide by flooding with ethanol 60%-95 % for 5-15 minutes and rinse with tap water before staining.</li> </ul>	<p>Le choix d'une méthode de fixation dépend beaucoup du contexte, en particulier de l'analyse des risques éventuels. Les fixations à la chaleur (flamme ou bloc chauffant) sont déconseillées dans les cas de risques par transmission aéroportée (de nombreux germes ne sont pas tués !). La fixation traditionnelle à l'éthanol flambée est source d'aérosols (d'après INRS). L'éthanol est un très mauvais sporicide. Ainsi, parmi les fixations citées, la fixation au méthanol semble la meilleure. Malheureusement, Le méthanol est volatil et très toxique par inhalation, contact avec la peau et ingestion. Consulter les données fournies par l'INRS (<a href="http://www.inrs.fr">www.inrs.fr</a>). Cette fixation (surtout si répétée) exige des protections adaptées.</p>

<p><b>Staining Procedure :</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cover slide with Crystal Violet Reagent for one minute.</li> <li>2. Rinse slide with deionized or tap water.</li> <li>3. Cover slide with Iodine Reagent for one minute.</li> <li>4. Gently rinse the slide with deionized or tap water and allow to drain.</li> <li>5. Rinse slide with Decolorizer until the Decolorizer runs off the slide with no color.</li> <li>6. Rinse slide gently with deionized or tap water.</li> <li>7. Cover slide with Safranin counterstain for one minute.</li> <li>8. Rinse slide gently with deionized or tap water.</li> <li>9. Allow slide to drain and air dry, or gently dry with paper towel.</li> <li>10. Examine slide under oil immersion lens.</li> </ol>	<p>Les réactifs de coloration au cristal violet sont inflammables, toxiques et suspectés de pouvoir causer le cancer (ne pas s'exposer au produit : absorption, inhalation, danger oculaire élevé). Ne pas rejeter dans l'environnement.</p> <p>Le diode en milieu ioduré étant peu stable, il est recommandé d'utiliser des réactifs stabilisés au PVP (polyvinyl pyrrolidone)</p> <p>On pourra évidemment réaliser la coloration par plongées de lames dans des bains, par exemple en tube de Borel</p> <p>Les formules de décolorant sont variables : éthanol à 95% ou mélanges éthanol-acétone aux proportions variées. On peut aussi décolorer en bain (par exemple 25 à 30 s en bain d'éthanol).</p>
<p><b>Note:</b> Use caution so that slides are not over decolorized, causing gram-positive bacteria to appear gram-negative.</p>	
<p>Sources bibliographiques : INRS, ED 999,2007, conception des labo. d'analyses biologiques,  <a href="http://www.inrs.fr/accueil/produits/mediatheque/doc/publications.html?refINRS=ED%20999">http://www.inrs.fr/accueil/produits/mediatheque/doc/publications.html?refINRS=ED%20999</a>    Instituut voor Tropische Geneeskunde, POSTGRADUAT EN MEDECINE TROPICALE ET SANTE, INTERNATIONALE, Module 1 &amp; Module 2, Notes pratiques de bactériologie tropicale, fev. 2010, <a href="http://www.labquality.be/documents/ANALYSIS/BACTERIOLOGY/090803%20Notes%20pratiques%20de%20Bact%C3%A9riologie%20M%C3%A9dicale.pdf">http://www.labquality.be/documents/ANALYSIS/BACTERIOLOGY/090803%20Notes%20pratiques%20de%20Bact%C3%A9riologie%20M%C3%A9dicale.pdf</a>    District Laboratory Practice in Tropical Countries, Volume 2, Par Monica Cheesbrough, Cambridge university press, 2006    documentation Becton Dickinson à propos de la coloration de Gram    Vardaxis ... Sporocidal activity of chemical and physical tissue fixation methods J Clin Pathol. 1997 May; 50(5): 429-433. <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC499947/pdf/jclinpath00254-0071.pdf">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC499947/pdf/jclinpath00254-0071.pdf</a></p>	

## Documents à analyser

Extrait de Beveridge, J Bacteriol. 1990 mars ;  
172(3): 1609-1620

As in our previous studies (4, 9) and the work of Salton (19), it is apparent that for eubacteria, the underlying principle of the Gram stain resides in the innate character of the cell wall. During staining, gram-positive bacteria such as *Micrococcus (lysodeikticus) luteus* stain intensely purple because their thick robust walls resist ethanol decolorization and the crystal violet-iodide complex is retained within the protoplast (19). The wall of *Escherichia coli* is so strongly affected by decolorization that the outer membrane is removed, the thin peptidoglycan layer is breached, and the crystal violet-iodide complex is removed to make these cells gram negative (4). These staining responses are clear-cut and unequivocal. In the study described here, even in those eubacteria that undergo erratic staining, the response to the dye is controlled by the cell wall. Indeed, two bacterial groups with distinctly different walls are defined by the degree of their gram variability. Members of the *Actinomyces-Arthrobacter-Corynebacterium-Mycobacterium-Propionibacterium* group are similar to most other gram-positive bacteria in that they have relatively thick and robust walls, but their initial septal sites do not appear to be as highly integrated into the side wall as in other varieties. This may indicate a common mode of septum initiation even though each genus within the group has subtle chemical differences to its wall fabric. Members of the *Bacillus-Butyrivibrio-Clostridium* group possess distinctly different walls. Each appears to have a reduced complement of peptidoglycan (i.e., a thinner peptidoglycan-containing layer) that is overlaid by an S layer. Initially, at low cell doubling rates, this combination of two layers is hardy enough to ensure that the cells stain gram positive. Yet with time, the peptidoglycan layer grows thinner and the cells become more prone to gram negativity. Each of these two gram-variable staining groups is distinct from the other in cell wall architecture, and each owes its particular brand of staining response to its wall design.

« Abstract » et Extrait de Davies et col., J. of Bacteriology, 1983, vol. 156,2:837-845

Crystal violet (hexamethyl-para-rosaniline chloride) interacts with aqueous KI-I2 during the Gram stain via a simple metathetical anion exchange to produce a chemical precipitate. There is an apparent 1:1 stoichiometry between anion (I-, I3-) and cation (hexamethyl-para-rosaniline+) during the reaction and, since the small chloride anion is replaced by the bulkier iodide, the complex formed becomes insoluble in water. It is this same precipitate which forms in the cellular substance of bacteria (both gram-positive and gram-negative types) and which initiates the Gram reaction.

**determines the staining response (4). Certainly gram-positive bacteria relinquish their capacity to retain the CV-I complex when their envelope is perturbed by mechanical crushing (2) or by lysozyme digestion (23, 26). These same cells stain gram-negative after protoplast formation (11). Salton has clearly demonstrated that more**

« Abstract » de Beveridge et col., J. of Bacteriology, 1983,  
vol. 156,2:846-858

Exponentially growing cells of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* were Gram stained with potassium trichloro(eta 2-ethylene)platinum(II) (TPt) in place of the usual KI-I2 mordant. This electron-dense probe allowed the staining mechanism to be followed and compared with cellular perturbations throughout the staining process. A crystal violet (CV)-TPt chemical complex was formed within the cell substance and at the cell surface of *B. subtilis* when the dye and Pt mordant were added. The ethanol decolorization step dissolved the precipitate from the cell surface, but the internal complex was retained by the cell wall and remained within the cell. This was not the case for *E. coli*; the ethanol decolorization step removed both surface-bound and cellular CV-TPt. During its removal, the outer membrane was sloughed off the cells until only the murein sacculus and plasma membrane remained. We suspect that the plasma membrane was also perturbed, but that it was retained within the cell by the murein sacculus. Occasionally, small holes within the murein and plasma membrane could be distinguished through which leaked CV-TPt and some cellular debris. Biochemical identification of distinct envelope markers confirmed the accuracy of these images.