

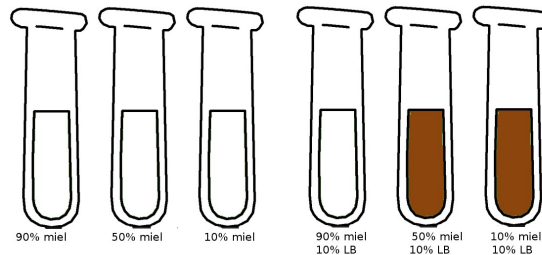
Andrew Tolonen (atolonen@gmail.com)
06 février 2013

L2 Microbiologie: TD2

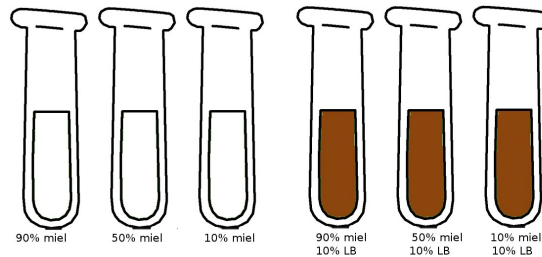
Exercice 1 On trouve le microorganisme *Rhizopus* sur du pain moisi. Pourquoi les moisissures poussent-elles plus facilement que des bactéries? La contamination d'autres aliments est facile. Pourquoi?

Exercice 2 On inocule les milieux de culture suivants avec d' *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Comment est-ce qu'on explique les résultats de croissance?

Cultures d'*E. Coli*



Cultures de *S. cerevisiae*

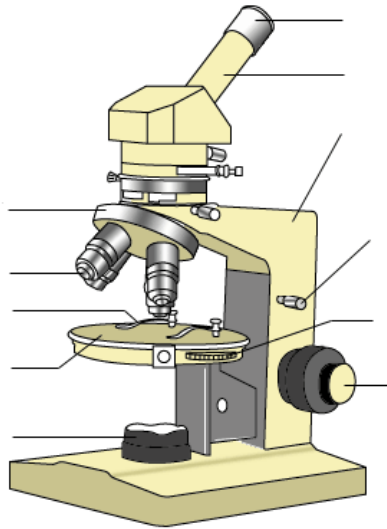


Exercice 3 Quel est le rôle de l'algue dans un lichen? Quel est le rôle du mycète?

Exercice 4 Complétez les espaces ci-dessous

- 1- $1 \mu\text{m} = \dots\dots\dots\text{m}$
- 2- $1\dots\dots\dots = 10^{-9}\text{m}$
- 3- $1 \mu\text{m} = \dots\dots\dots\text{nm}$

Exercice 5 : Décrivez les parties de ce microscope:



Calculez le grossissement total d'une cellule que l'on observe au microscope optique à l'aide d'un oculaire 10x et d'un objectif de 50x.

Exercice 6 : Pourquoi les colorants basiques colorent-ils les bactéries et pas les colorants acides ?

Exercice 7 : Quel est le rôle du mordant dans la coloration de Gram ? dans la coloration du flagelle ?

Exercice 8 : En coloration de Gram, dans quel but doit-on décolorer ?

Exercice 9 : complétez le tableau suivant en précisant à chaque étape la couleur de la coloration

Etapes	Bactéries à Gram +	Bactéries à Gram -
Violet de cristal		
Iode		
Ethanol à 95%		
Safranine		

Exercice 10 : Questions à choix multiples

1- Vous désirez procéder à l'identification d'une bactérie à Gram négatif inconnue. Laquelle (lesquelles) des colorations suivantes sera (seront) superflue(s) ?

- a- coloration négative:
- b- coloration acido-alcoolo-résistante:
- c- coloration du flagelle:
- d- coloration des endospores:

2- Vous chauffez un frottis de *Clostridium* en présence d'un colorant, le vert de malachite, vous lavez à l'eau, puis vous contre-colorez avec un autre colorant, la safranine. Au microscope, les endospores vont paraître 1 et les cellules, 2 .

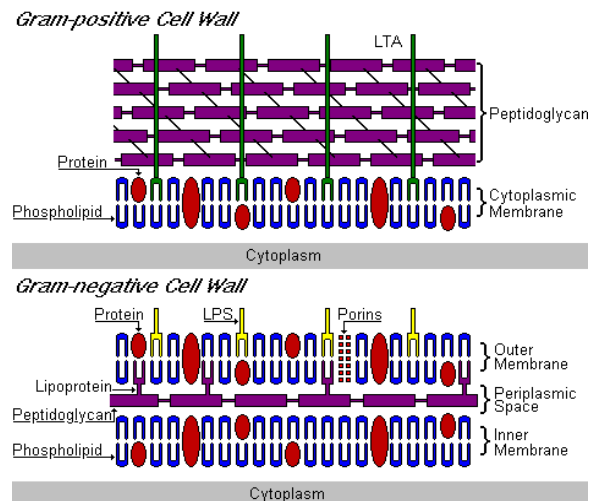
- a- 1- vertes ; 2- roses
- b- 1- roses ; 2- transparentes
- c- 1- transparentes ; 2- roses
- d- 1- vertes ; 2- transparentes
- e- 1- roses ; 2- vertes

3- Le bleu de méthylène

- a- augmente la visibilité des organismes observés au microscope optique
- b- est un colorant basique
- c- peut servir de colorant pour une coloration simple
- d- peut servir de contre-colorant dans la coloration acido-alcoolo-résistant

#####

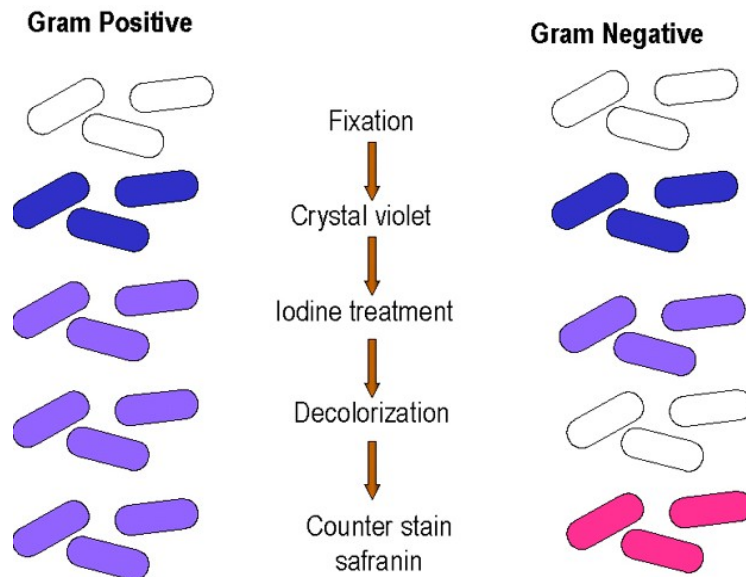
La paroi cellulaire: gram-negative, gram-positive



La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer en deux genres (Gram+ et Gram-). Bactéries gram-positives ont une paroi épaisse de peptidoglycane qui est colorée pourpe par le cristal violet. Les bactéries Gram négatif ont une couche plus mince. Elles sont colorées en rose par la contre-coloration.

Protocole:

- 1 Etaler une goutte de culture sur une lame
- 2 Laisser bien sécher à l'air ou à la flamme (fixation)
- 3 Recouvrir la lame avec du crystal violet:
CV dissocie en CV⁺ et passe dans la cellule
- 4 Ajouter le lugol ou l'iode (mordant):
CV⁺ et I⁻ forment les complexes de CV-I qui ne sortent pas de la cellule
- 5 Ajouter de l'alcool pour éliminer les colorants (décoloration):
dégradation de membrane, fuite des complexes CV-I des cellules gram-négatives
- 6 Rincer à l'eau pour arrêter la décoloration
- 7 Recouvrir la lame de Fuchsine (contre-coloration): coloration de la paroi
- 8 Rincer à l'eau et laisser sécher à l'air (ou à la flamme)



D'autres colorants

- 1 Vert de malachite: coloration verte des endospores.
- 2 Bleu de méthylène: coloration basique bleue des acides nucléiques (ADN, ARN). Contre-coloration dans le protocole Ziehl-Neelsen stain.
- 3 Safranine: contre-coloration rouge des acides nucléiques et peptidoglycane
- 4 coloration acido-alcool-résistante: protocole pour la coloration des bactéries qui résistent la décoloration, Mycobactérie