

Les bactéries peuvent être groupées en 2 catégories selon la méthode de coloration de Gram. Cette technique a été mise au point en 1884 par Hans Christian Gram, un bactériologiste danois. Après coloration, les bactéries Gram+ deviennent violettes alors que les bactéries Gram- apparaissent en rose. La répartition des bactéries en Gram+ ou Gram- est un critère systématique important pour la classification des bactéries.

**1. Principe de la coloration**

Le violet de gentiane est un colorant qui colore l'intérieur des bactéries. Celles-ci sont ensuite décolorées à l'alcool-acétone. Certaines bactéries gardent leur couleur violette : ce sont les bactéries Gram + grâce à la composition chimique de leur paroi et de sa structure plus épaisse. D'autres perdent cette couleur violette à cause de leur paroi fine et davantage perméable : ce sont les bactéries dites de Gram-.

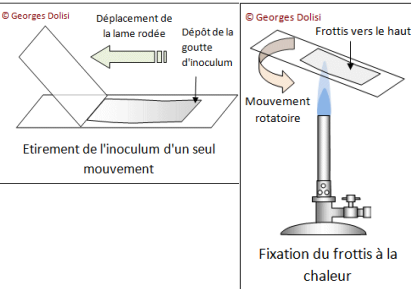
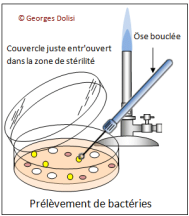
**Fiche méthode**

Matériel		Produits	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pissette d'eau</li> <li>• Lames</li> <li>• Ecouvillons</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Boîtes de Pétri</li> <li>• Cuve à coloration</li> </ul> <p>Microscopes, lames, lamelles, bec benzène, öses</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Violet de Gentiane</li> <li>• Décolorant</li> <li>• Safranine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lugol</li> <li>• Culture bactérienne</li> <li>• Eau de javel (pour désinfecter les lames à la fin)</li> </ul>

**Mode opératoire A partir de cultures bactériennes sur surface gélosées (lames de contact):**

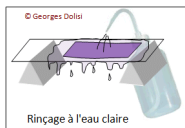
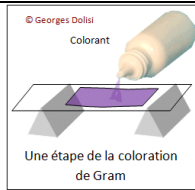
**1. Faire un frottis**

- ✓ Nettoyer une lame à l'alcool.
- ✓ Déposer une goutte d'H2O sur la lame.
- ✓ Toucher une colonie à l'aide d'une pointe jaune ou d'un cure-dent stérile pour prélever des bactéries. Il n'est pas nécessaire de prendre beaucoup de bactéries
- ✓ Frotter la pointe dans la goutte d'eau. Laisser sécher à l'air.
- ✓ Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.



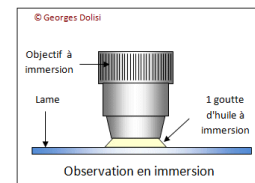
**2. Coloration au violet de gentiane**

- 1) Déposer quelques gouttes de solution de **de gentiane violet** sur le frottis fixé. 2) Laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries. 3) Eliminer l'excès de colorant dans un bécher. Rincer très brièvement en faisant couler l'eau sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis). 4) Déposer quelques gouttes de **lugol** sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries. Laisser agir 1 minute. Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l'eau comme précédemment.



**3. Décolorer**

- Faire couler la solution de **décoloration** (mélange d'alcool et d'acétone) sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes).
- Rincer à l'eau
- Les pores de la paroi des Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette Contre-colorer en déposant la solution de **safranine** (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- Rincer à l'H2O.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope



(grossissement 400x ou, avec une goutte d'huile à immersion, au grossissement 1000x).