

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.

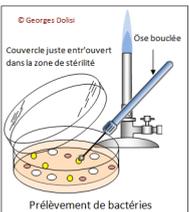
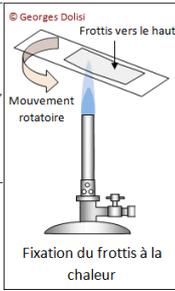
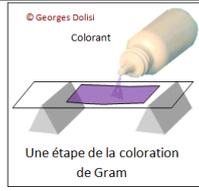
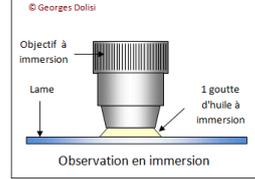
1. Principe de la coloration

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

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

1. Faire un frottis	2. Coloration au violet de gentiane	3. Décolorer
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 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.  <p>Prélèvement de bactéries</p>  <p>Fixation du frottis à la chaleur</p>	<p>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.</p>  <p>Une étape de la coloration de Gram</p>  	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 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).  <p>Observation en immersion</p>