

## **Kit de coloration rapide Gram Hucker** Réf. COLGRAM

### **A RECEPTION DU COLIS :**

- ☑ **Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- ☑ **⚠ Stocker** l'ensemble du colis à température ambiante ⚠
- ☑ **Avant toute manipulation**, étudier les conseils de **sécurité**

### **COMPOSITION**

- 80 ml de cristal violet oxalate
- 80 ml de liquide de lugol stabilisé
- 80 ml de différentiateur rapide
- 80 ml de safranine
- 4 poires compte-gouttes
- Une notice pédagogique et technique

### **MATERIEL NECESSAIRE**

- Frottis bactérien ou frottis de yaourt, fromage (**voir page 3 : Réalisation de frottis de yaourt**)
- Lames et lamelles
- Bac ou support pour lames
- Pince à lames
- Papier absorbant
- Eau du robinet et eau distillée
- Tubes à essai

### **OBJECTIFS COGNITIFS**

Réalisation d'une coloration rapide de frottis bactérien pour la caractérisation des microorganismes.

**COLLEGE : Pour identifier les bactéries lactifères du yaourt, nous vous conseillons d'utiliser de la faisselle qui donne la meilleure densité de microorganismes lors de l'observation.** Les yaourts classiques donnent des frottis à faible densité en microorganismes (voir page 3 : Manipulation / réalisation d'un frottis à partir du yaourt).

Un frottis réalisé à partir d'une croute de fromage type camembert donnera aussi des résultats intéressants à comparer avec le frottis de yaourt (voir page 4).

### **RAPPELS**

La coloration de Gram Hucker permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

Suite à la coloration Gram Hucker, les bactéries Gram négatives prennent une teinte rose alors que les bactéries à Gram positif apparaissent violettes.

Ainsi, les scientifiques peuvent distinguer les bactéries à Gram positif, dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane, des bactéries à Gram négatif, composées de moins de peptidoglycane mais pourvues d'une membrane externe supplémentaire. Ce type de classification n'est pas sans conséquence dans le domaine médical (la résistance des bactéries et l'efficacité d'antibiotiques dépendant du type de bactérie).

**Il est possible de mettre en évidence la présence de bactéries lactifères dans le yaourt et le fromage grâce à cette coloration :** les bactéries apparaissent en violet ; les protéines du lait apparaissent en rose.

## MANIPULATION

### REALISATION D'UN FROTTIS :

- A partir de yaourt :
  - o Déposer l'équivalent d'une anse d'inoculation (ou d'une pointe de couteau) sur le bord d'une lame
  - o A l'aide d'une autre lame, étirer le dépôt de yaourt de façon à former une fine couche (à peine visible) sur les 2/3 de la lame. Garder 1/3 de lame en bord pour écrire au marqueur le nom du binôme
  - o Laisser sécher à l'air libre pendant 20 minutes. On pourra accélérer le séchage en utilisant un sèche-cheveu

**Nous vous conseillons d'utiliser de la faisselle qui donne une bonne densité d'observation.**

**Si vous souhaitez utiliser du yaourt classique, nous vous conseillons les yaourts au bifidus en veillant à les passer ouverts dans une étuve à 37°C pendant 24h avant afin d'augmenter la densité de bactéries lactifères.**

- A partir de croûte de fromage : (**à réaliser la veille**)
  - o Racler délicatement le dessus d'une croûte de fromage (type camembert) avec une anse d'inoculation (ou une pointe de couteau)
  - o Diluer le prélèvement dans 5ml d'eau stérile et secouer vigoureusement afin d'obtenir une solution homogène
  - o Déposer une goutte de cette solution au centre d'une lame et l'étirer au double de sa taille initiale afin de faciliter le séchage
  - o Laisser sécher à l'air libre pendant une nuit. On pourra accélérer le séchage en utilisant un sèche-cheveu

### REALISATION DE LA COLORATION RAPIDE :

- Disposer les lames de frottis horizontalement dans un bac à fond plat ou un support de lame
- Coloration par le cristal violet oxalate :
  - o Recouvrir la lame avec la solution de cristal violet
  - o Laissez agir 3 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet pour ôter toute trace de colorant en excès.
- Coloration au liquide de lugol stabilisé :
  - o Rincer avec un jet de solution de lugol pour ôter toute trace d'eau.
  - o Recouvrir la lame avec la solution de lugol
  - o Laissez agir 3 minutes.
- Rincez rapidement à l'eau du robinet.
- Décoloration rapide:
  - o Versez goutte à goutte le différentiateur rapide sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration.
  - o Rincez immédiatement à l'eau du robinet pour stopper la décoloration.

**Attention, l'utilisation abusive du différentiateur aura pour conséquence de rendre toutes les bactéries gram négatif.**

- Recoloration à la Safranine :
  - o Recouvrir la lame avec la solution de fuschine
  - o Laissez agir 3 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet pour ôter toute trace de colorant en excès.
- Séchez la lame sur une platine chauffante à 50°C ou au sèche-cheveu.

Observez à l'objectif 40X ou 60X.

Si besoin, on pourra passer à l'objectif 100X avec une goutte d'huile à immersion (grossissement x1000).

## RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

**Il est possible de mettre en évidence la présence de bactéries lactifères dans le yaourt et le fromage grâce à cette coloration :** les protéines du lait apparaissent en rose ; les bactéries apparaissent en violet et sont de forme ronde ou allongée, souvent organisées en chapelets associés aux protéines de lait.

La coloration par le cristal violet oxalate colore en violet le contenu de la bactérie. Le cristal violet se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries.

Le lugol permet de fixer cette coloration interne.

La décoloration rapide sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycanes - donc plus fine - qui va laisser passer le différentiateur à base d'alcool (molécule hydrophile), et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le cristal violet. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une « couche » de peptidoglycanes plus importante, donc de ce fait plus épaisse. Elles resteront alors de couleur violette.




La coloration à la fuschine est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme. La coloration de Gram permet de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactéries en deux grands groupes :

- Gram+ qui ont une paroi de peptidoglycanes épaisse (ex : Bacillus cereus)
- Gram- qui ont une paroi de peptidoglycanes fine, mais ont en plus une membrane externe lipidique (ex : Escherichia coli).

Ces différences de coloration et les différences de forme (bacille ou cocci) sont à l'origine de la classification des bactéries.

#### **FICHE SECURITE (guide non exhaustif)**

- Ne pas inhaler ni ingérer les produits contenus dans ce kit. Eviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau.
- Porter des gants et une blouse lors de l'utilisation de ces produits.

Produit	Pictogramme et risques normalisés	Actions à mener en cas			
		De contact avec la peau	d'inhalation	de projection dans les yeux	d'ingestion
<b>Cristal violet oxalate</b> (15% éthanol – violet cristallisé)	 Nocif	Rincer abondamment à l'eau claire	Donner de l' <b>air frais</b> . Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.	<b>Lavage</b> avec de l'eau en <b>écartant les paupières</b> plusieurs minutes. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.	Ne pas faire vomir. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.
<b>Différentiateur rapide</b> (48% éthanol – 49 % acétone)	 Facilement inflammable   Irritant	Rincer abondamment à l'eau claire	Donner de l' <b>air frais</b> . Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.	<b>Lavage</b> avec de l'eau en <b>écartant les paupières</b> plusieurs minutes. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.	Ne pas faire vomir. Si des troubles apparaissent, consulter un médecin.

#### **FICHE CONSERVATION**

Conservation des produits 2 ans à température ambiante.