

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

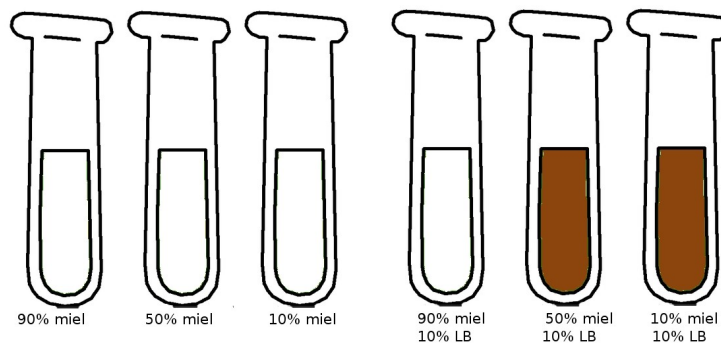
L2 Microbiologie: TD2

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?

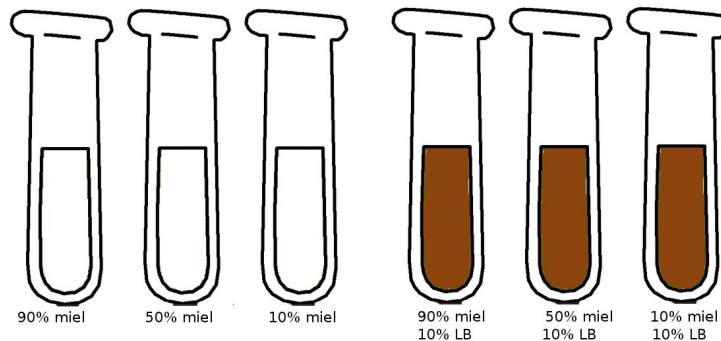
La croissance des bactéries exige un degré plus élevé d'humidité que celle des moisissures. Les moisissures donc poussent facilement sur une tranche de pain, contrairement aux bactéries. La moisissure qui contamine une tranche de pain ou le dessus du pain est capable de pousser malgré le peu d'humidité et de produire beaucoup de spores volatiles qui se disséminent partout dans l'air. Il importe donc de ne pas mettre le pain moisi en contact avec l'air et de ne pas le secouer afin d'éviter la propagation des spores.

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

Cultures d'*E. Coli*



Cultures de *S. cerevisiae*



Escherichia coli pousse sur un milieu de miel et LB s'il n'y a pas trop de pression osmotique. *S. cerevisiae* peut tolérer une plus grande pression osmotique et peut donc pousser dans un milieu qui contient 90% de miel.

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

Le rôle de l'algue consiste à nourrir le mycète en lui procurant les carbonydrates (sucres) qui lui sont

nécessaires. Si l'algue est une cyanobactérie, elle pourrait aussi fixer l'azote. L'algue y gagne aussi: le mycète lui procure à la fois une protection contre le dessèchement et les minéraux et une fixation à son habitat.

Exercice 4 Complétez les espaces ci-dessous

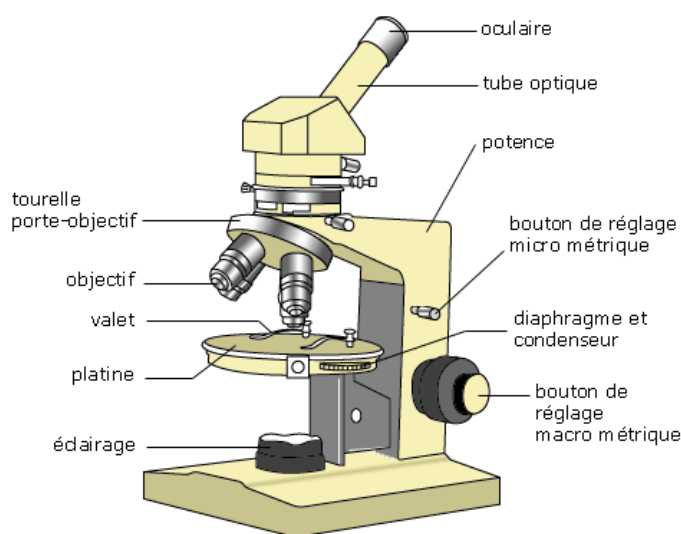
10 ¹⁸	10 ¹⁵	10 ¹²	10 ⁹	10 ⁶	10 ³	0	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹⁸
exa	peta	tera	giga	mega	kilo		milli	micro	nano	pico	femto	atto

1- 1 µm =m 10⁻⁶

2- 1.....= 10⁻⁹m nm

3- 1 µm =nm 1000

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.

Magnification totale 500x.

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

Les colorants basiques, en raison de leur charge positive, se lient électrostatiquement aux molécules négatives tels que les polysaccharides, de nombreuses protéines et des acides nucléiques. Colorants acides se lient aux molécules chargées positivement qui sont beaucoup moins fréquents. Colorants basiques: cristal violet, safranine (un colorant rouge) et bleu de méthylène.

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

Le mordant se lie au colorant pour former une complexe qui ne peut pas sortir de la cellule.

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

L'alcool dégrade la membrane et permet la fuite des complexes CV-I des cellules gram négatives.

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	violet	violet
Iode	violet	violet
Ethanol à 95%	violet	blanc
Safranine	violet	rose

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: **nécessaire pour la coloration de gram**
- b- coloration acido-alcool-résistante: **les bactéries qui résistent la décoloration, Mycobacterie**
- c- coloration du flagelle: les gram-négatives et gram-positives ont les flagelles.**
- d- coloration des endospores: **coloration Moeller. Les clostridia et bacille forment les 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 .

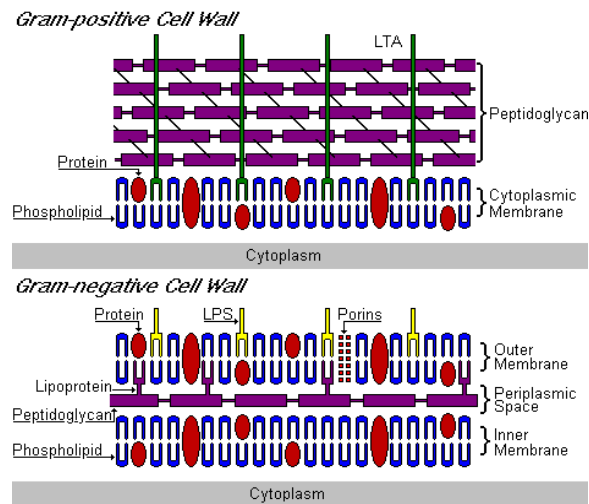
- a- 1- vertes ; 2- roses
- b- 1- roses ; 2- transparentes
- c- 1- transparentes ; 2- roses
- d- 1- vertes ; 2- transparentes
- e- 1- roses ; 2- vertes

3- Le bleu de méthylène : **toutes les réponses**

- 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-alcool-résistante

#####

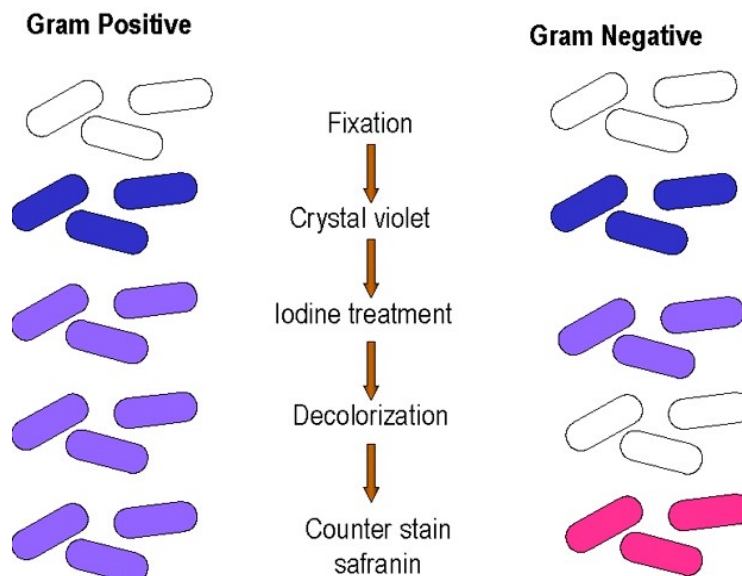
La paroi cellulaire: gram-negative, gram-positive



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 cristal 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, Mycobacterie