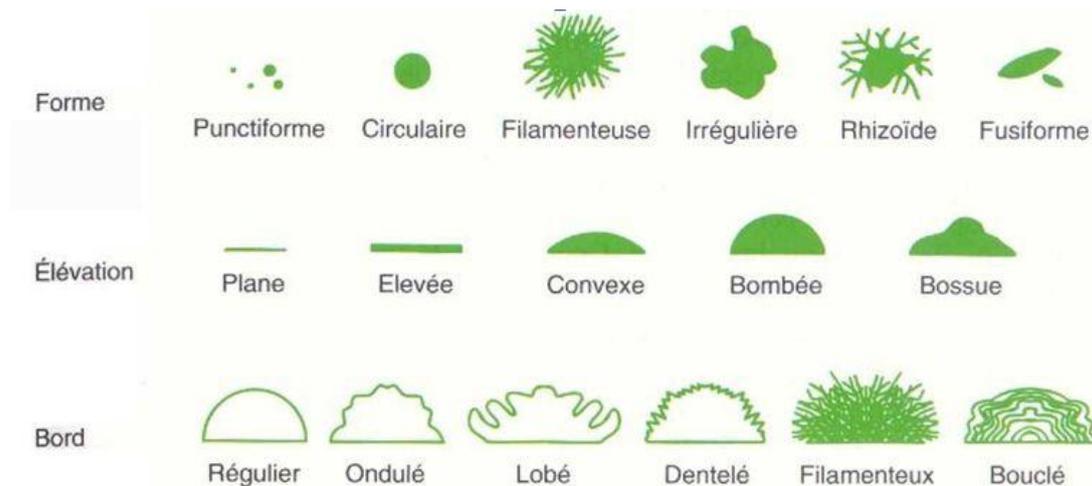


Définition d'une colonie

Une colonie bactérienne est définie comme un groupe de microorganismes vivant à la surface d'un milieu de culture solide, chacune de ces colonies est issue d'une seule bactérie ou **Unité Formatrice de Colonie** (UFC) qui s'est divisée à des centaines de reprises de façon asexuée et constitue donc un clone. Chaque espèce bactérienne a une forme et une couleur de colonie typique. La forme, la couleur, l'élévation, le contour et parfois même l'odeur des colonies sont des critères utilisés pour aider à les reconnaître.



La technique de coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui a mis au point le protocole en 1884. C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classer les bactéries en Gram+ et Gram-.

1- Réalisation du frottis

- Sur une lame, déposer une goutte d'eau distillée stérile (ou directement le prélèvement s'il est liquide) ;
- Ajouter à la goutte une colonie isolée ;
- Étaler et fixer à la chaleur ;
- Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration.

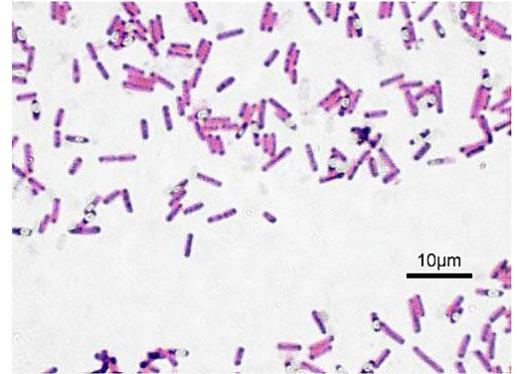
2- Coloration de Gram

- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincez à l'eau ;
- Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée I₂) : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau distillée (**à cette étape, toutes les bactéries sont violettes**) ;
- Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) est l'étape la plus importante de la coloration : versez goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. ;

- Rincez abondamment avec de l'eau distillée pour stopper la décoloration (à cette étape, si l'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-). Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+ qui restent violettes) ;
- Recoloration à la safranine ou à la fuchsine : mettez quelques gouttes de fuchsine et laissez agir de 30 secondes à 1 minute (à cette étape, le Gram- sont roses, par contre les Gram+ restent violettes) ;
- Lavez doucement à l'eau distillée ;
- laissez sécher la lame ;
- Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$).



Escherichia coli (Bacille Gram-)



Bacillus subtilis (Bacille Gram+)