

**2- En milieu solide : *cf. cours de microbiologie***

### **III- Techniques spectroscopiques**

Mesure de la turbidité : *cf. cours de microbiologie*

## IV- Pétrifilm 3M

### Principe:

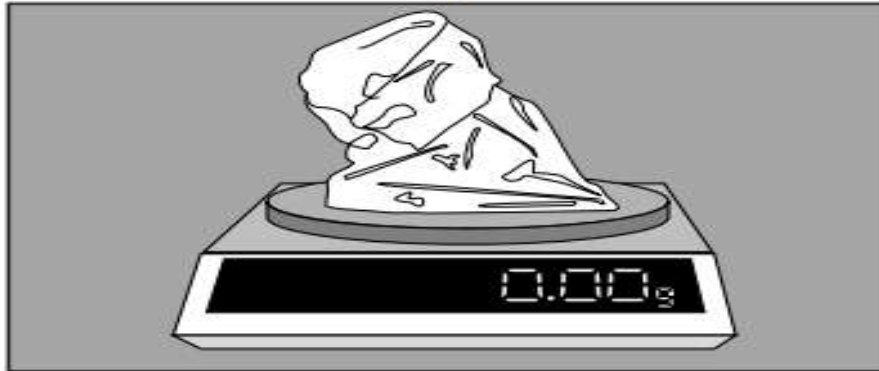
Le Petrifilm est constitué d'un film rigide quadrillé, dessinant des carrés de 1 cm<sup>2</sup> de surface, qui sert de support à un milieu gélifié approprié.



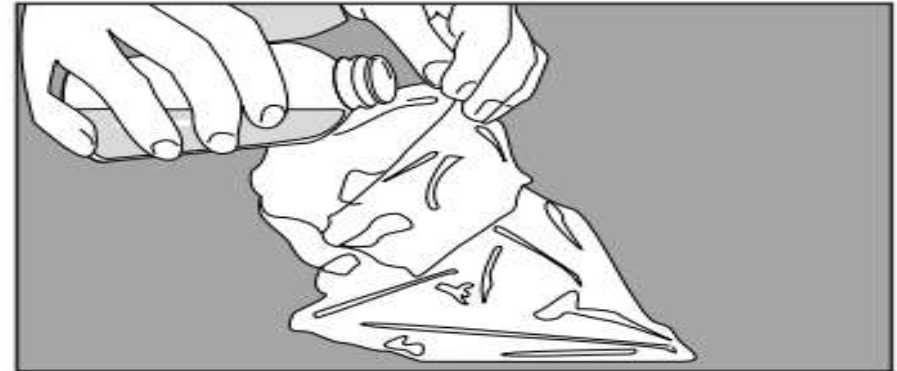
- Le milieu gélifié est protégé par un film souple, qui est soulevé lors de l'inoculation ; l'inoculum (1 ml) est déposé au centre du film rigide quadrillé.
- Le film souple protecteur est rabattu et un diffuseur est appliqué sur le tout pour que l'inoculum soit réparti sur toute la surface du quadrillage, soit 20 cm<sup>2</sup>.
- Les deux films sont perméables à l'oxygène.
- Après l'incubation, le dénombrement des colonies obtenues se fait à l'œil nu et se trouve facilité par le quadrillage ; on dénombre les films comprenant entre 30 et 300 colonies.

# Manipulation

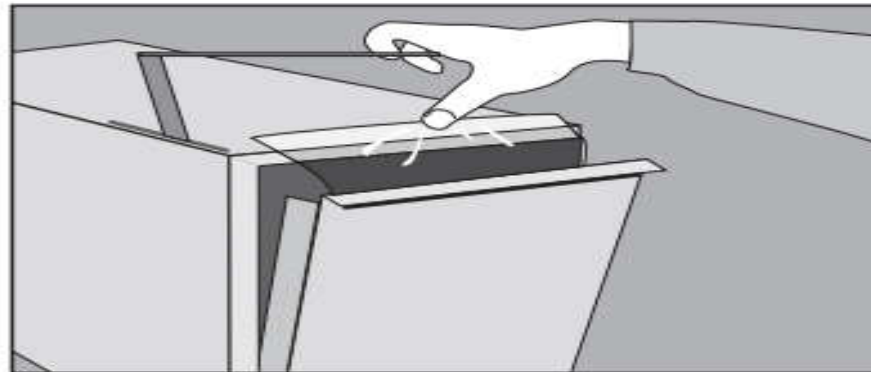
## Préparation



- 1** Préparer la suspension de l'échantillon.  
Peser ou pipetter le produit dans un container stérile (sac stomacher, bouteille stérile...).

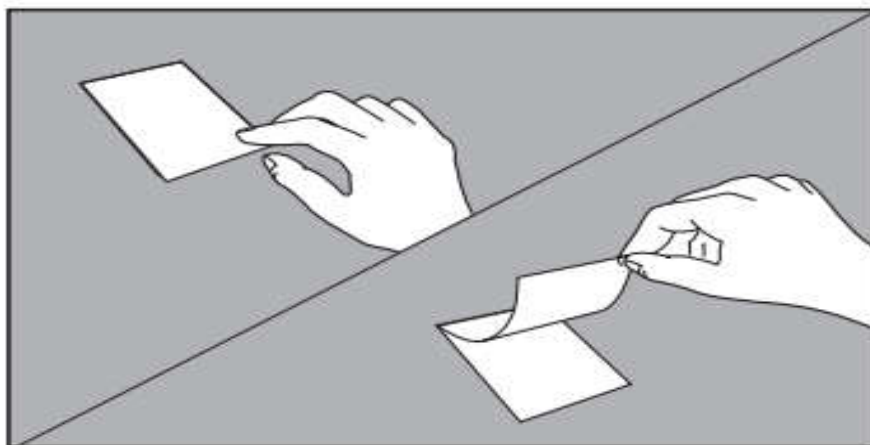


- 2** Ajouter la quantité nécessaire de l'un des diluants suivants :  
peptone sel, eau peptonée, eau distillée, tampon phosphate.  
Ne pas utiliser de tampon contenant du citrate de sodium ou du thiosulfate.

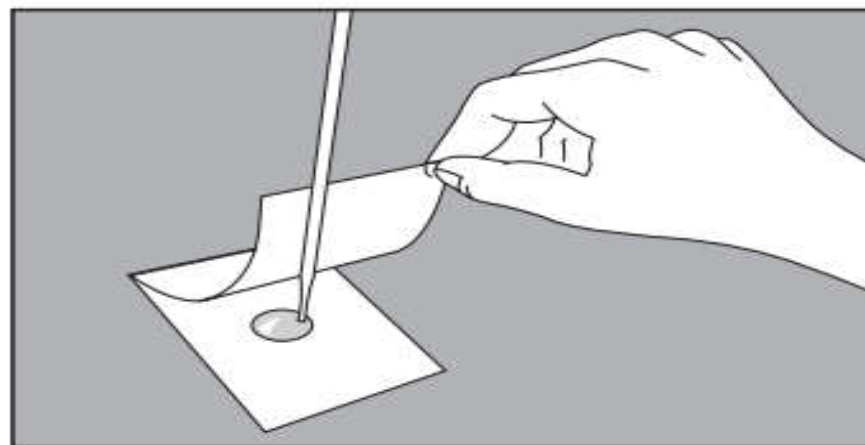


- 3** Broyer ou homogénéiser l'échantillon en utilisant la procédure habituelle.

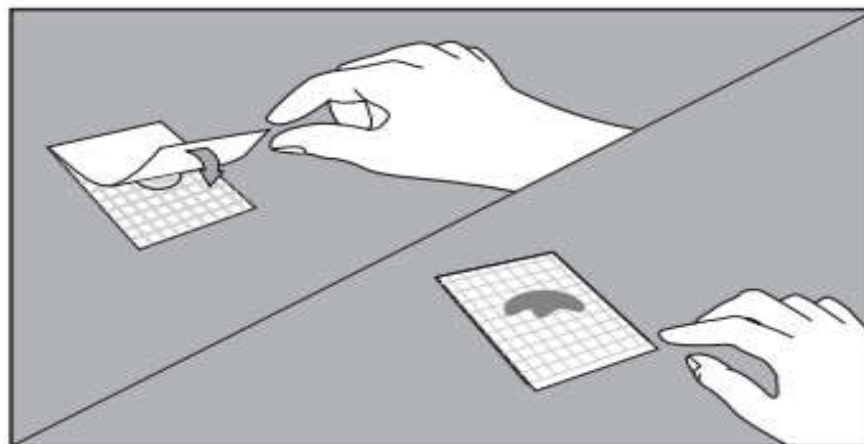
# Ensemencement



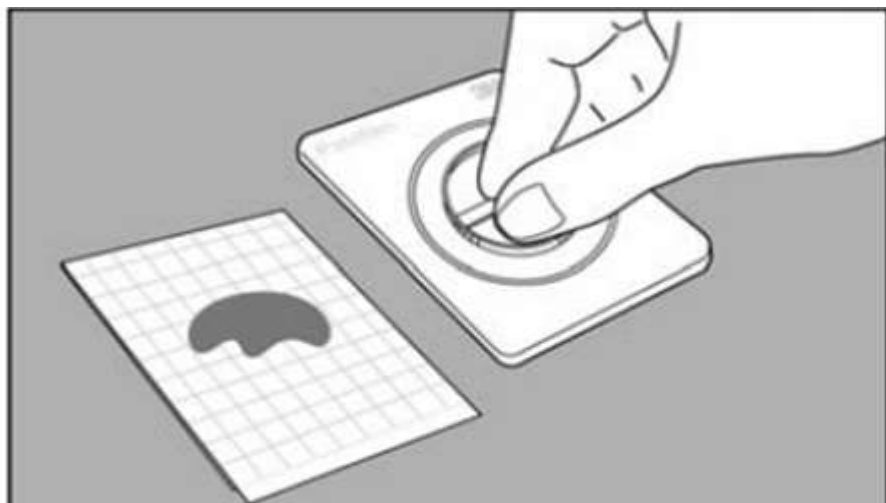
- 4** Placer le Petrifilm sur une surface plane.  
Soulever le film supérieur.



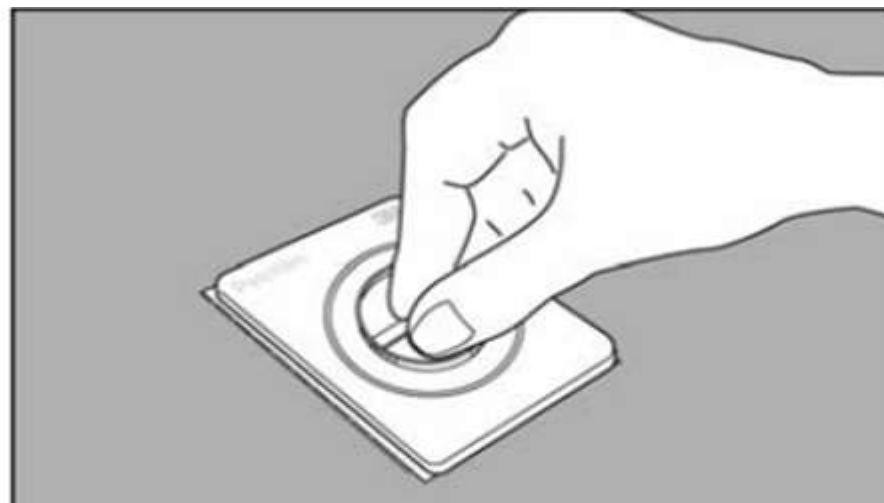
- 5** Avec une pipette tenue perpendiculairement au Petrifilm, déposer 1 ml de l'échantillon, ou de l'échantillon dilué au centre du film inférieur.



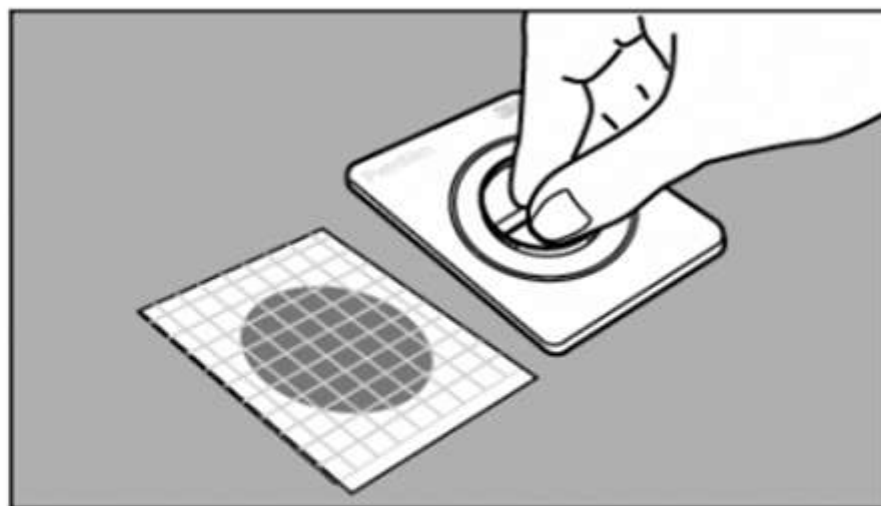
- 6** Relâcher le film supérieur. Ne pas le faire rouler.



**7** Placer le diffuseur  
au centre du film supérieur,  
au-dessus de l'inoculum.



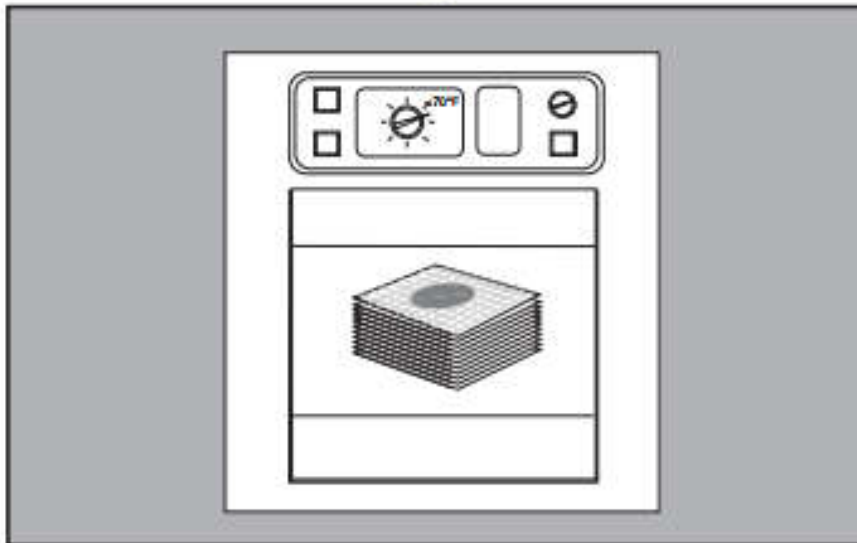
**8** Étaler l'échantillon en exerçant une  
légère pression sur la poignée  
du diffuseur. Ne pas tourner ou  
faire glisser le diffuseur !



**9** Retirer le diffuseur. Attendre 1  
minute pour permettre au gel de  
se solidifier.

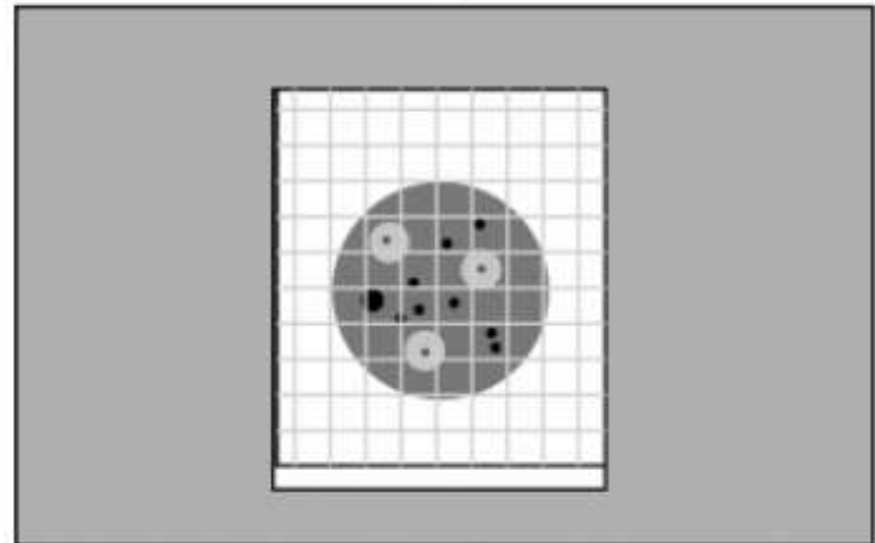


## Incubation



**10** Incuber le Petrifilm face supérieure vers le haut, sans empiler plus de 20 unités aux températures préconisées par les méthodes de référence,  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 3, 4 et 5 jours.

## Interprétation



**11** Lire le Petrifilm en se référant au guide d'interprétation. Pour l'expression des résultats, se référer à la norme ISO 7954 - NFV 08-022.

[https://www.youtube.com/watch?v=z8FCUy\\_aDEI](https://www.youtube.com/watch?v=z8FCUy_aDEI)

## **❑ Avantages:**

- ❑ La gélose peut être appliquée sur une surface non plane, par suite de la souplesse du film.
- ❑ La lecture est facilitée par la coloration des colonies.
- ❑ L'encombrement est faible, lors de l'incubation.
- ❑ Le film perméable qui recouvre la gélose limite les phénomènes d'envahissement par rapport à une gélose classique.

## **❑ Désavantages:**

- ❑ Nécessité d'une phase de préparation du Pétrifilm avant utilisation qui peut être un peu fastidieuse.
- ❑ Quantité de milieu disponible pour la croissance bactérienne faible.



## V- Analogue de substrats chromogènes (techniques enzymatiques)



# Principe

- Les milieux chromogènes sont utilisés pour la mise en évidence d'activités enzymatiques par l'apparition d'une coloration spécifique.
- Le principe se base sur l'utilisation des substrats synthétiques qui sont des analogues structuraux d'une molécule naturellement clivée par une enzyme caractéristique d'une espèce bactérienne ou d'un groupe d'espèces bactériennes.
- La coupure par l'enzyme d'un substrat dit chromogène produit une molécule colorée, le chromophore.

- La diffusion de l'utilisation de chromogènes est devenue très importante par leur incorporation dans les milieux de culture : les colonies sont ainsi colorées par le ou les chromophore(s).

**Attention :**

Des colonies sont naturellement colorées ; la lecture est alors complexe car les couleurs peuvent s'additionner...

- L'association de plusieurs chromogènes est souvent réalisée, par exemple la recherche de la  $\beta$ -glucuronidase et de la  $\beta$ -glucosidase dans les milieux destinées à l'analyse des urines en biologie médicale.