

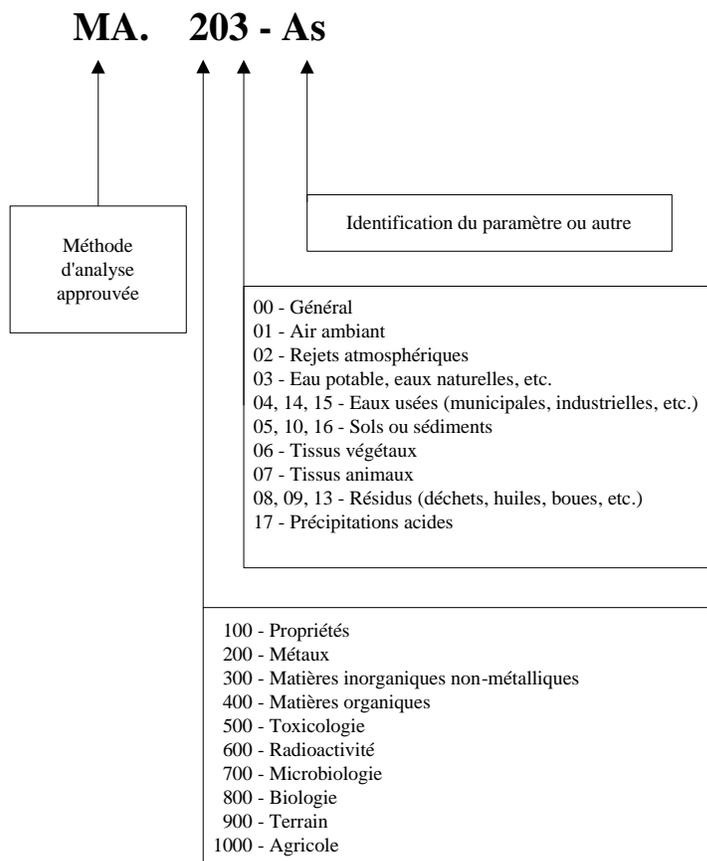
Méthode d'analyse



MA. 700 – Colph 1.0

Recherche des coliphages F-spécifiques: méthode
présence/absence

Comment fonctionne la codification ?



Note – Les méthodes publiées avant le 14 janvier 2014 ont deux chiffres à la fin de la codification de la méthode (ex. : MA. 203 – As 3.4). Le premier chiffre désigne le numéro de la méthode (3) et le deuxième chiffre désigne le numéro de l'édition (4).

Référence à citer :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Recherche des coliphages F-spécifiques: méthode présence/absence, MA. 700 – Colph 1.0,
Rév. 3, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les
changements climatiques du Québec, 2015, 24 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
2700, rue Einstein, bureau E.2.220
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301
Télécopieur : 418 528-1091
Courriel : ceaeq@mddelcc.gouv.qc.ca

© Gouvernement du Québec, 2015

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. INTERFÉRENCE	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	7
5. APPAREILLAGE	8
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	9
6.1. Réactifs généraux	10
6.2. Solutions d'antibiotiques	10
6.3. Milieux de culture	11
6.4. Stock de coliphage F-spécifique	13
6.5. Bactérie hôte	14
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	14
7.1. Préculture bactérienne d'une nuit pour l'analyse des coliphages F-spécifiques	14
7.2. Préparation d'une culture en phase exponentielle de croissance de la bactérie hôte	15
7.3. Procédure d'analyse en deux étapes	15
7.4. Observation des résultats	17
8. EXPRESSION DES RÉSULTATS	17
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	17
10. BIBLIOGRAPHIE	18
Annexe A – Préparation des lysats de coliphage F-spécifique (par ex. : MS2).....	19
Annexe B – Énumération des lysats coliphage F-spécifique employé comme contrôle	21
Annexe C – Étapes de la méthode	24

INTRODUCTION

Les coliphages sont des virus des coliformes qui peuvent être détectés de façon spécifique sur la bactérie *Escherichia coli*. Bien qu'ils partagent des caractéristiques morphologiques avec certains virus animaux, les coliphages ne sont pas pathogènes pour l'homme et les animaux. Les coliphages sont essentiellement constitués d'une molécule d'ADN ou d'ARN entourée par une couche de protéines appelée la capsid. La taille des coliphages varie de 25 à 120 nm environ alors que leur hôte, *E. coli* est un bâtonnet de 2 à 6 µm environ.

Il existe deux types de coliphages : les coliphages somatiques et les coliphages F-spécifiques (aussi appelés mâles-spécifiques). Les coliphages se distinguent par le récepteur bactérien auquel ils s'attachent sur la bactérie *E. coli*. Alors que les coliphages somatiques s'attachent à un récepteur situé sur la paroi bactérienne, les coliphages F-spécifiques s'attachent à une structure particulière appelée *pilus*. Les *pili* (pluriel de *pilus*) sont formés chez certaines cellules de *E. coli* porteuses d'une information génétique particulière, le plasmide F. Pour qu'il puisse y avoir formation du *pilus*, il faut que la cellule bactérienne soit en croissance dans un environnement à une température supérieure à 30 °C (Grabow, 2001).

Les coliphages peuvent se multiplier uniquement à l'intérieur d'une cellule hôte de *E. coli* qui est en croissance. Les conditions pour la multiplication des coliphages sont les mêmes que celles permettant la croissance optimale de leur bactérie hôte *E. coli*. Elles sont réunies dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux à sang chaud (Grabow, 2001). Par conséquent, les coliphages trouvés dans l'environnement proviennent principalement de contamination d'origine fécale et peuvent être utilisés comme indicateurs de la qualité microbiologique de l'eau.

L'emploi des coliphages comme paramètre de la qualité de l'eau d'origine souterraine est aussi recommandée par l'Environmental Protection Agency (USEPA) américaine. **Dans la réglementation *Ground Water Rule* proposée par l'USEPA et mise en application en 2007, (Ground Water Rule, USEPA, 2006), il y est fait mention que** plusieurs épidémies d'origines hydriques ayant eu lieu aux États-Unis étaient causées par des virus entériques et étaient associées à des eaux souterraines non traitées.

Les virus entériques humains responsables de ces éclosions d'origine hydrique peuvent migrer plus rapidement dans le sol que les bactéries en raison de leur petite taille. Par conséquent, il peut arriver que l'eau souterraine soit contaminée par des virus entériques humains même en absence des indicateurs bactériens traditionnels (bactéries coliformes). Malheureusement, les méthodes servant à détecter les virus entériques humains dans l'eau sont peu disponibles, dispendieuses et souvent longues à réaliser. Ainsi, en complément à *E. coli* et aux entérocoques, l'USEPA a recommandé l'utilisation des coliphages comme indicateurs viraux de la qualité de l'eau souterraine (Ground Water Rule, USEPA, 2006). En effet, ces derniers sont d'origine fécale, ils peuvent se déplacer dans le sol de manière similaire aux virus entériques humains et ils sont relativement simples et peu coûteux à analyser.

Les coliphages **F-spécifiques** constituent **aussi** un élément de contrôle bactériologique des eaux souterraines non désinfectées et vulnérables selon **plusieurs articles** du Règlement sur la qualité de l'eau potable (**RQEP**).

Le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec a donc implanté et validé une méthode en deux étapes pour la détection des coliphages F-spécifiques dans des échantillons d'eau. Cette méthode est largement inspirée de la méthode USEPA 821-R01-030, *Method 1601: Male-specific (F⁺) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure* (USEPA, 2001).

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode qualitative de type présence/absence (100 ml ou 1 litre d'échantillon) permet de détecter la présence de coliphages F-spécifiques dans l'eau par une procédure en deux étapes incluant un enrichissement suivi d'une mise en évidence. Cette méthode n'a été validée que pour de l'eau de consommation, mais elle pourrait être utilisée pour toute autre matrice liquide où la présence de coliphages est suspectée. Cette méthode ne permet pas le dénombrement.

Les coliphages **F-spécifiques** sont utilisés comme indicateurs de pollution fécale et comme indicateurs de la présence éventuelle de microorganismes pathogènes (incluant les virus entériques humains).

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La détection des coliphages est réalisée en deux étapes : l'enrichissement du coliphage suivi de sa mise en évidence. Lors de la première étape, un volume de 100 ml (ou 1 litre) de l'échantillon d'eau est mélangé avec un milieu de culture bactérien (TSB), du chlorure de magnésium, des antibiotiques ainsi qu'un inoculum de la bactérie hôte. Ce mélange est incubé pendant 16 à 24 heures à une température de 36 °C. Lors de l'incubation, le coliphage, lorsqu'il est présent dans l'échantillon, se réplique en infectant la bactérie hôte, qui est alors en croissance. Les coliphages font ensuite lyser les cellules bactériennes et se répandent dans le bouillon d'enrichissement. À la suite de cette première étape, le phénomène n'est pas encore visible et on ne peut pas se prononcer sur la présence ou non de coliphages dans l'échantillon.

À l'étape de mise en évidence, un volume de 10 µl du bouillon d'enrichissement est déposé sur un milieu de culture gélosé (TSA avec antibiotiques) qui contient un inoculum de la bactérie hôte. Lorsque la goutte du bouillon d'enrichissement est complètement absorbée par la gélose, celle-ci est incubée pendant une période de 16 à 24 heures à 36 °C. Le milieu de culture gélosé, qui était initialement transparent, devient opaque en raison de la croissance de la bactérie hôte. On parle d'un « tapis » de croissance bactérienne. Lorsque des coliphages sont présents dans le milieu d'enrichissement, une zone claire appelée « zone de lyse » s'observe à travers le tapis de croissance à l'endroit où la goutte a été déposée. La zone de lyse est causée par les coliphages de l'enrichissement qui infectent et font lyser les cellules bactériennes présentes dans le milieu de culture gélosé. On donne couramment le nom de « *spot test* » à cette procédure **de dépôt de la goutte**. Le résultat final peut être obtenu environ 48 h après le début de l'analyse.

Pour analyser les coliphages F-spécifiques, la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} (ATCC 700891), qui est dérivée d'une souche non pathogène d'*E. coli*, doit être utilisée. Cette bactérie hôte, résistante à plusieurs coliphages somatiques, est très sélective pour les coliphages F-spécifiques. En effet, lors d'une étude de Debartolomeis et Cabelli (1991), plus de 95 % des coliphages d'origine environnementale détectés avec la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} appartenaient à ce groupe. De plus, cette souche porte deux gènes de résistance à des antibiotiques sur son chromosome (streptomycine et acide nalidixique). La culture de la bactérie hôte en présence de l'un ou l'autre de ces antibiotiques évite les contaminations avec des *E. coli* provenant de l'échantillon. De plus, *E. coli* F_{amp} possède un gène de résistance à l'ampicilline situé sur son plasmide F, lequel contient l'information génétique nécessaire à la formation du *pilus*. La culture de la bactérie hôte en présence d'ampicilline fait en sorte que seules les bactéries contenant le plasmide F (donc la possibilité de produire un *pilus*) peuvent croître. Cette propriété de la souche est utile, puisqu'il arrive que les bactéries perdent leur plasmide en cours de croissance. La perte du plasmide F lors de la détection des coliphages F-spécifiques ferait en sorte de produire de faux résultats négatifs.

Avec chaque série d'analyses, des échantillons négatifs (eau stérile) de même qu'un échantillon de contrôle positif (eau stérile dans laquelle on a ajouté un coliphage F-spécifique tel que MS2) ou un contrôle de matrice (échantillon dans lequel on a ajouté un coliphage F-spécifique tel que MS2) sont analysés en suivant toutes les étapes de la méthode afin de s'assurer de l'absence d'une contamination croisée et de la fonctionnalité de la bactérie hôte.

3. INTERFÉRENCE

Les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml ou de 1000 ml remplies à pleine capacité ne permettent pas d'agiter l'échantillon. L'analyse de tels échantillons doit faire l'objet d'une remarque à cet effet dans le rapport d'analyse.

Le récepteur des coliphages F-spécifiques est le *pilus* formé à la surface de la bactérie hôte lorsqu'elle est en phase exponentielle. Afin d'éviter tout faux négatif, il est donc important d'employer la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} (ATCC 700891) en pleine croissance, soit à une DO₅₂₀ (densité optique à une longueur d'onde de 520 nm) située entre 0,1 et 0,5, tel qu'il est indiqué dans le protocole (cf. 7.2).

Durant la phase d'enrichissement, les bactéries retrouvées dans l'échantillon d'eau peuvent croître et potentiellement obscurcir la lecture des zones de lyse obtenues à l'étape de confirmation par « spot test ». De plus, des bactéries résistantes aux phages peuvent également apparaître au cours de l'incubation. La centrifugation du bouillon d'enrichissement avant son analyse par « spot test » permet de minimiser la récupération de ces bactéries résistantes.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Le prélèvement et la conservation des échantillons prélevés dans le cadre du RQEP doivent être effectués selon les instructions de l'annexe 4 de ce règlement. Des contenants d'une capacité de 1 litre peuvent être utilisés pour des projets particuliers.

À leur réception au laboratoire, les échantillons qui ne sont pas analysés dans les 4 heures qui suivent leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse.

Les échantillons reçus congelés dans des contenants non conformes ou selon des délais de prélèvement inacceptables (> 48 heures) ne doivent pas être analysés.

5. APPAREILLAGE

Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

- 5.1. Ensemble de micropipettes ajustables (10 à 1000 µl). Embouts ouatés 100 µl et 1000 µl Gibson ou Eppendorf
- 5.2. Pipettes stériles de 10,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.3. Tubes à essais 16 mm × 125 mm, 18 mm × 150 mm avec bouchons
- 5.4. Supports à tubes - grandeurs variées selon les tubes utilisés en 5.3
- 5.5. Fil à boucle
- 5.6. Anse à inoculer
- 5.7. Boîtes de Pétri 100 mm × 15 mm
- 5.8. Brûleur Bunsen
- 5.9. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.10. Incubateur dont la température est ajustée à 36 °C ± 1,0 °C
- 5.11. Fioles coniques (ou Erlenmeyers) stérilisables
- 5.12. Bains-marie dont la température est ajustée à 36 °C ± 1,0 °C et 45-48 °C
- 5.13. Bouteilles en polypropylène ou en verre, à large ouverture, 100 ml, 125 ml, 1 litre ou 1,5 litre avec bouchon vissé
- 5.14. Bouteilles en verre de plus de 150 ml ou 250 ml avec bouchons vissés (« milk dilution bottle »), stérilisables (ou autres contenants appropriés permettant une bonne homogénéisation).
- 5.15. Unités jetable de stérilisation par filtration (porosité : 0,22 µm et 0,45 µm)
- 5.16. Pompe à vide
- 5.17. Écouvillons stériles
- 5.18. Gants en latex
- 5.19. pH-mètre

- 5.20. Agitateur de type Vortex pour tubes à essais
- 5.21. Spectrophotomètre
- 5.22. Tubes 13 mm × 100 mm pour utiliser avec le spectrophotomètre
- 5.23. Incubateur à agitation rotatoire (100-150 tr/min) maintenant une température de 36 °C ± 1,0 °C
- 5.24. Cylindres gradués de 100 ml, 250 ml, 1 litre et 2 litres
- 5.25. Contenant à congélation 1 °C/minute « Mr. Frosty »
- 5.26. Vials cryogéniques stériles, capacité de 2,0 ml ou 5,0 ml
- 5.27. Tubes Eppendorf coniques stériles 1,5 ml
- 5.28. Support à tubes Eppendorf coniques 1,5 ml
- 5.29. Boîte cryogénique
- 5.30. Thermomètres
- 5.31. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.32. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 et 6 °C
- 5.33. Centrifugeuse ayant la capacité d'atteindre au moins 8000 × g (exemple : Biofuge B, tête angulaire C1715-21)
- 5.34. Transilluminateur (suggéré)
- 5.35. Autoclave
- 5.36. Congélateur -20 °C (de préférence -80 °C)

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS, à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultrapure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

6.1. RÉACTIFS GÉNÉRAUX

6.1.1. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n°7647-01-0). Solution commerciale 1 N

6.1.2. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n°1310-73-2), solution commerciale 10 N

6.1.3. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

Ajouter 100 ml de la solution commerciale de NaOH 10 N (*cf.* 6.1.2) dans environ 700 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à température ambiante.

6.1.4. Solution mère de chlorure de magnésium (80X, 4 M)

Dans une fiole Erlenmeyer de 1 000 ml, ajouter 814 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ dans 300 ml d'eau. Agiter jusqu'à dissolution et compléter le volume à 1 litre. Mélanger et répartir en volumes de 100 ml dans des bouteilles en verre de 250 ml. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.1.5. Glycérol

Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Après la fin du cycle de stérilisation, éviter de laisser séjourner le milieu dans l'autoclave, car la chaleur de l'appareil suffit à modifier la solution. Cette solution se conserve à température ambiante.

6.1.6. Éthanol 70 % ou plus

6.1.7. Isopropanol

6.2. SOLUTIONS D'ANTIBIOTIQUES

Note : Les antibiotiques doivent être ajoutés aux milieux après stérilisation, et lorsque la température du milieu est égale ou inférieure à 48 °C.

6.2.1. Solution mère ampicilline/streptomycine 100X

Dissoudre 0,15 g du sel de sodium ampicilline (Sigma A9518) et 0,15 g du sulfate de streptomycine (Sigma S6501) dans 100 ml d'eau nanopure. Stériliser à froid en filtrant la solution à travers une membrane 0,22 µm (*cf.* 5.15). Répartir la solution stérile en volumes de 4,5 ml dans des vials cryogéniques de 5,0 ml. Cette solution se conserve 1 an à -20 °C. Décongeler à température ambiante ou rapidement au bain-marie à 36 °C. Bien mélanger avant d'utiliser.

6.3. MILIEUX DE CULTURE

6.3.1. Bouillon trypticase soja (TSB)

6.3.1.1. TSB 1X : Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 30,0 g/l et sa formulation telle que présentée par le fabricant est la suivante (g/l) :

Digestion pancréatique de caséine	17,0 g
Digestion papaïque de germes de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Dextrose	2,5 g

Dans une fiole Erlenmeyer de 2 000 ml, peser 30,0 g de milieu déshydraté, et dissoudre dans un volume final de 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.1.1) ou de NaOH 1 N (cf. 6.1.2). Répartir dans des bouteilles en verre stériles. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

Ce milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.

6.3.1.1.1 Bouillon trypticase soja (TSB) avec ampicilline/streptomycine

En conditions aseptiques, ajouter 10 ml de la solution mère ampicilline/streptomycine (cf. 6.2.1) dans 1 000 ml de milieu TSB 1X (cf. 6.3.1.1) stérile et tempéré à une température inférieure à 48 °C. Bien mélanger. À préparer avant usage.

6.3.1.2. Bouillon trypticase soja (TSB) 10X

Dans une fiole Erlenmeyer de 2 000 ml, peser 300,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans environ 700 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Ajuster ensuite le volume à 1 000 ml avec de l'eau et bien homogénéiser. Le pH doit être de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.1.1) ou de NaOH 1 N (cf. 6.1.2). Répartir en volumes de 150 ml dans des bouteilles en verre de 250 ml. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Après la fin du cycle de stérilisation, éviter de laisser séjourner le milieu dans l'autoclave. Ce milieu se conserve à 4 °C à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.

6.3.2. Agar trypticase soja (TSA)

6.3.2.1. Agar trypticase soja (TSA) 1,5 %

Le TSA 1,5 % est utilisé comme agar de fond pour l'énumération du lysat de phage en milieu bicouche (annexe B).

Dans une fiole Erlenmeyer de 2 000 ml, peser 30 g de milieu déshydraté TSB (tel qu'indiqué à 6.3.1.1) et 15 g d'agar et faire dissoudre le tout dans un volume final de 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.1.1) ou de NaOH 1 N (cf. 6.1.2). Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Mélanger le milieu encore en ébullition afin de répartir uniformément l'agar. Refroidir au bain-marie à une température de 45-48 °C. Répartir de manière aseptique précisément en volumes de 100 ml dans des bouteilles en verre de plus de 150 ml stérilisées au préalable. Ce milieu se conserve à 4 °C pendant 4 à 6 semaines.

6.3.2.1.1 TSA 1,5 % avec ampicilline/streptomycine

Faire fondre le contenu d'une bouteille de milieu TSA 1,5 % en la déposant dans un bain-marie à une température de 100 °C. Tempérer ensuite le milieu liquéfié dans un second bain-marie ajusté à une température de 45-48 °C. Une fois le milieu tempéré, ajouter aseptiquement 1 ml de la solution mère ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) par 100 ml de milieu TSA 1,5 % stérile (cf. 6.3.2.1). Bien mélanger les antibiotiques avec le milieu et répartir en volumes d'environ 20 ml dans des boîtes de Pétri 100 mm × 15 mm. Ne pas utiliser les restes de milieu de culture qui ont déjà été fondus une fois. Ce milieu se conserve à 4 °C pendant 2 semaines.

6.3.2.2. Agar trypticase soja (TSA) 0,7 % (« top agar »)

Le TSA 0,7 % est utilisé comme « top agar » pour l'énumération du lysat de phage en milieu bicouche (annexe B).

Dans une fiole Erlenmeyer de 2 000 ml, peser 30 g de milieu déshydraté TSB (tel qu'indiqué à 6.3.1.1) et 7 g d'agar et faire dissoudre le tout dans un volume final de 1000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.1.1) ou de NaOH 1 N (cf. 6.1.2). Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Mélanger le milieu encore en ébullition afin de répartir uniformément l'agar. Répartir de manière aseptique précisément en volumes de 100 ml dans des bouteilles en verre de plus de 150 ml stérilisées au préalable. Le milieu se conserve à 4 °C à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.

6.3.2.2.1 TSA 0,7 % « Top agar » avec ampicilline/streptomycine, pour l'énumération du coliphage F-spécifique avec la bactérie *E. coli* F_{amp}

Faire fondre le contenu d'une bouteille de milieu TSA 0,7 % en la déposant dans un bain-marie à une température de 100 °C. Tempérer ensuite le milieu liquéfié dans un second bain-marie ajusté à une température de 45-48 °C.

Une fois le milieu tempéré, ajouter 1 ml de la solution mère ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) en conditions aseptiques par 100 ml de TSA 0,7 % (cf. 6.3.2.2). Répartir en volumes de 5 ml dans des tubes stériles de 16 mm × 125 mm. Conserver entre

45 °C et 48 °C jusqu'à leur utilisation. Les tubes doivent être utilisés le jour même de leur préparation. **Les restes de milieu de culture qui ont déjà été fondus une fois ne sont pas utilisés.**

6.3.2.3. Géloses pour les « spots tests » (tests du dépôt de la goutte)

Ces géloses sont utilisées dans la procédure d'analyse en deux étapes (cf. 7.3.2). Les géloses doivent être exemptes de condensation pour la procédure du « spot test ».

6.3.2.3.1 Ajouter 7,5 g d'agar à 1 000 ml de milieu TSB (cf. 6.3.1.1). Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.1.1) ou de NaOH 1 N (cf. 6.1.2). Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Mélanger le milieu encore en ébullition afin de répartir uniformément l'agar. Répartir de manière aseptique précisément en volumes de 100 ml dans des bouteilles en verre de plus de 150 ml stérilisées au préalable. Le milieu se conserve à 4 °C à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.

6.3.2.3.2 Préparer à l'avance une culture bactérienne d'*E. coli* F_{amp} en phase exponentielle de croissance (cf. 7.2).

6.3.2.3.3 Faire fondre le milieu TSA 0,75 % (cf. 6.3.2.3.1) en déposant une bouteille au bain-marie à une température de 100 °C, puis le refroidir dans un second bain-marie à une température de 45 - 48 °C. Ne pas utiliser les restes de milieu de culture qui ont déjà été fondus une fois.

6.3.2.3.4 Ajouter au milieu tempéré (cf. 6.3.2.3.3) 2,0 ml de la culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (cf. 6.3.2.3.2 et cf. 7.2) et 1 ml d'antibiotiques (solution mère ampicilline/ streptomycine 100X (cf. 6.2.1)). Bien mélanger et répartir en volumes de 20 ml par boîte de Pétri 100 mm × 15 mm. Les géloses peuvent être utilisées le jour même ou être conservées à 4 °C pendant 4 jours au maximum. Avec un crayon marqueur, dessiner une grille sur le fond de la boîte de Pétri pour délimiter les zones où seront faits les « spots tests ».

6.4. STOCK DE COLIPHAGE F-SPÉCIFIQUE

6.4.1. **Phage infectant spécifiquement une souche bactérienne d'*E. coli* productrice de *pilus F* en phase exponentielle de croissance (telle que la souche bactérienne *E. coli* ATCC* 700891). Un exemple d'un tel phage est le phage MS2 (pouvant provenir de la collection ATCC 15597-B1). La procédure d'amplification et de conservation des coliphages est décrite à l'annexe A. **La procédure d'énumération des coliphages du lysat est décrite à l'annexe B.****

6.4.2. De l'eau usée peut aussi être utilisée comme source de coliphages F-spécifiques pour les divers contrôles. Se référer à la méthode USEPA 1601 (USEPA, 2001a).

* ATCC : American Type Culture Collection, Manassas, Virginie, États-Unis. <http://www.atcc.org/>.

6.5. BACTÉRIE HÔTE

La souche bactérienne qui doit obligatoirement être utilisée dans la méthode des coliphages F-spécifiques est la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} (ATCC 700891).

6.5.1. Congélation d'un stock de bactéries hôtes. La culture congelée de la bactérie hôte est utilisée pour préparer la préculture bactérienne d'une nuit (cf. 7.1).

Pour obtenir des colonies isolées, établir par épuisement, une culture pure de la bactérie hôte sur un milieu TSA 1,5 % avec ampicilline/streptomycine (cf. 6.3.2.1.1). Incuber les géloses pendant une nuit (18-24 heures) à 36 °C. Repiquer ensuite quelques colonies isolées dans un bouillon TSB avec ampicilline/streptomycine (cf. 6.3.1.1.1) et faire croître avec agitation à 100-125 tr/min pendant 16 à 24 heures à 36 °C.

Récolter le bouillon de la bactérie hôte et le mélanger avec du glycérol stérile dans un ratio de 1 : 10 (exemple : 100 µl de glycérol stérile + 900 µl de bactérie hôte). Répartir aseptiquement en volumes de 1,5 ml dans des « vials » cryogéniques de 2,0 ml.

Étiqueter la souche et la date de congélation.

La culture stock de bactéries hôtes se conserve de préférence à -80 °C. Cette culture stock peut également être conservée à -20 °C pendant une période de deux mois.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillons, les recommandations applicables des *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02, sont suivies et tous les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité nécessaires sont réalisés en conformité à ces lignes directrices.

Dans le cas d'analyses de type présence/absence, comme cette méthode, un résultat positif peut avoir des conséquences importantes. Il est donc important d'être particulièrement vigilant et d'éviter toute possibilité d'obtention de faux résultats. En conséquence, un blanc de méthode (ou contrôle de stérilité) devra être préparé dès le début de chaque série d'analyses et un autre sera réalisé après la préparation des échantillons de la série. Un contrôle de stérilité supplémentaire pour chaque tranche de 10 échantillons de la série devra être ajouté et ces contrôles supplémentaires doivent être répartis uniformément. Enfin, le contrôle positif ou les contrôles de matrice doivent être préparés en tout dernier de la série d'analyses, soit après avoir préparé les blancs de méthode et tous les échantillons de cette série.

7.1. PRÉCULTURE BACTÉRIENNE D'UNE NUIT POUR L'ANALYSE DES COLIPHAGES F-SPÉCIFIQUES

Un inoculum provenant d'une préculture bactérienne d'une nuit atteindra plus rapidement la phase exponentielle de croissance qu'un inoculum provenant d'une culture congelée.

7.1.1. Dans une fiole Erlenmeyer stérile (ex. : de 125 ml), mélanger 25 ml de milieu TSB 1X (cf. 6.3.1.1) avec 250 µl de la solution d'antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1). Inoculer avec la culture congelée de la bactérie *E. coli* F_{amp} (cf. 6.5). Incuber à 36 °C avec agitation (100-150 tr/min) pendant une nuit (18 à 20 heures). Au terme de l'incubation, conserver à 4 °C jusqu'à utilisation.

7.2. PRÉPARATION D'UNE CULTURE EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE DE LA BACTÉRIE HÔTE

La quantité de culture bactérienne à préparer peut varier en fonction de la quantité d'échantillons à analyser. Chaque échantillon de 100 ml analysé de même que chaque échantillon de contrôle requiert 0,5 ml d'inoculum de la culture de la bactérie hôte en phase exponentielle de croissance.

Dans une fiole Erlenmeyer (ex : de 125 ml), mélanger 25 ml de milieu TSB 1X, 250 µl de la solution mère d'ampicilline/streptomycine 100X et 250 µl de la préculture bactérienne d'*E. coli* F_{amp} d'une nuit (cf. 7.1). Incuber à 36 °C ± 1 °C avec agitation (100-150 tr/min) pendant approximativement 1 h 30 à 2 h 30.

En conditions aseptiques, retirer 1 ml de la culture bactérienne, déposer dans un tube de 13 mm × 100 mm et lire la densité optique à 520 nm. Une lecture d'absorbance entre 0,1 et 0,5 unité de densité optique (DO₅₂₀) indique que la bactérie hôte est en phase exponentielle de croissance. Si la DO₅₂₀ n'est pas dans les limites recherchées, incuber de nouveau et lire la DO₅₂₀ toutes les 30 minutes jusqu'à l'atteinte d'une valeur se situant entre 0,1 et 0,5.

Refroidir rapidement à 4 °C pour ralentir la multiplication cellulaire. La suspension peut être conservée à 4 °C pendant 48 heures. Cependant, les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant la culture dans les 6 heures suivant l'atteinte de la phase exponentielle de croissance.

7.3. PROCÉDURE D'ANALYSE EN DEUX ÉTAPES

7.3.1. Enrichissement

7.3.1.1. Tous les échantillons d'eau doivent être amenés à température ambiante et homogénéisés en agitant les bouteilles d'un mouvement vertical.

Analyse d'échantillons de 100 ml :

7.3.1.2. Dans une bouteille stérile permettant un volume de plus de 150 ml, ajouter 100 ml de l'échantillon, 1,25 ml de MgCl₂ 80X (4 M) (cf. 6.1.4), 0,5 ml de la culture en phase exponentielle de croissance de la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} (cf. 7.2), 5 ml de milieu TSB 10X (cf. 6.3.1.2) et 1 ml de la solution d'antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1). Fermer hermétiquement la bouteille et l'inverser 5 fois pour mélanger. Incuber à 36 °C ± 1 °C, sans agitation, pendant 16 à 24 heures.

7.3.1.3. Blancs de méthode (contrôles de stérilité)

Dans une bouteille stérile permettant un volume de plus de 150 ml, ajouter 100 ml d'eau déminéralisée stérile, 1,25 ml de $MgCl_2$ 80X (4 M) (cf. 6.1.4), 0,5 ml de la culture en phase exponentielle de la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} (cf. 7.2), 5 ml de milieu TSB 10X (cf. 6.3.1.2) et 1 ml de la solution d'antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1). Fermer hermétiquement la bouteille et inverser 5 fois pour mélanger. Incuber à $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, sans agitation, pendant 16 à 24 heures.

7.3.1.4. Contrôle positif ou contrôle de la matrice

Dans une bouteille stérile permettant un volume de plus de 150 ml, ajouter 100 ml de l'échantillon (contrôle de matrice) ou 100 ml d'eau déminéralisée stérile, 1,25 ml de $MgCl_2$ 80X (4 M) (cf. 6.1.4), 0,5 ml de la culture en phase exponentielle de la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} (cf. 7.2), 5 ml de milieu TSB 10X (cf. 6.3.1.2), 1 ml de la solution d'antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) et X ml de la dilution 10-X du **coliphage F-spécifique (par ex. : MS2)** (cf. 6.4.1). [Le volume de phage à ajouter est déterminé à partir de la concentration du lysat de phage. La concentration recherchée est environ 20 UFP[†]/échantillon (annexe B)]. Fermer hermétiquement la bouteille et l'inverser 5 fois pour mélanger. Incuber à $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, sans agitation, pendant 16 à 24 heures.

Analyse d'échantillons de 1 000 ml :

7.3.1.5. Pour l'analyse d'échantillons de 1 000 ml de coliphages F-spécifiques par la technique de présence/absence, répéter les étapes 7.3.1.1 à 7.3.1.4 en utilisant une bouteille en verre stérile à large ouverture de 1 000 ml (capacité d'au moins 1 080 ml). Pour les échantillons, le contrôle positif et le blanc de méthode, multiplier par 10 le volume des solutions à ajouter de même que le volume de la culture en phase exponentielle de croissance.

7.3.2. Procédure de mise en évidence « spot test » des coliphages F-spécifiques

7.3.2.1. Préparer les plaques pour le « spot test » selon la section 6.3.2.3. Après la période d'enrichissement de 16 à 24 heures (cf. 7.3.1), mélanger les bouillons d'enrichissement en inversant doucement les bouteilles environ 25 fois.

7.3.2.2. Enlèvement de l'interférence causée par les bactéries résistantes

À l'aide d'une micropipette, transférer un volume de 1 000 µl de l'enrichissement dans un tube Eppendorf conique stérile de 1,5 ml. Centrifuger pendant 10 minutes à 10 000 tr/min (8832×g). L'USEPA (2001) recommande de centrifuger pendant 10 minutes à une force de 6 000 à 10 000×g ou d'utiliser la filtration pour enlever les bactéries.

[†] UFP : Unités formant des plages de lyse

Immédiatement, pipeter un volume de 10 µl du surnageant et le déposer sur une gélose enrichie par la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} (cf. 6.3.2.3). Laisser sécher la goutte de surnageant en déposant la boîte de Pétri ouverte sous la hotte à flux laminaire. Après l'absorption de la goutte par la gélose (environ 30 minutes), refermer la boîte de Pétri, inverser et incuber à 36 °C ± 1 °C pendant 16 à 24 heures.

7.4. OBSERVATION DES RÉSULTATS

Lorsque des coliphages sont présents dans le milieu d'enrichissement, une zone claire appelée « zone de lyse » s'observe à travers le tapis de croissance bactérienne à l'endroit où la goutte a été déposée.

L'absence de coliphages est observée par l'absence d'une zone de lyse à l'endroit où la goutte de l'enrichissement a été déposée. Le tapis bactérien y est alors identique à celui de l'ensemble de la gélose.

D'autres types de résultats positifs sont également possibles :

- plusieurs petites zones de lyse peuvent être présentes à l'endroit où la goutte a été déposée;
- une zone de lyse peut contenir plusieurs petites colonies. Ces colonies sont des bactéries mutantes résistantes au coliphage.

Un transilluminateur **peut être employé** pour l'observation des résultats.

8. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Quatre possibilités de résultats peuvent survenir lors de l'analyse d'échantillons avec cette méthode selon le volume d'échantillon analysé :

Coliphages F-spécifiques : présence dans 100 ml
Coliphages F-spécifiques : présence dans 1 litre
Coliphages F-spécifiques : absence dans 100 ml
Coliphages F-spécifiques : absence dans 1 litre

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les blancs de méthode (**ou contrôles de stérilité**) effectués au moment de l'analyse **doivent** démontrer l'absence de coliphage.

Le contrôle positif et le contrôle de la matrice effectués au moment de l'analyse doivent démontrer la présence de coliphages.

Le tapis de croissance de la bactérie hôte observé lors du « spot test » (cf. 7.3.2) est uniforme.

Toutes les exigences applicables précisées dans le document DR-12-SCA-02, intitulé *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, doivent être respectées.

10. BIBLIOGRAPHIE

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Faune et des Parcs, Édition courante.
http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA02_lignes_dir_micro.pdf

DEBARTOLOMEIS, J. and V. J. CABELLI, *Evaluation of an Escherichia coli Host Strain for Enumeration of F Male-Specific Bacteriophages*, Applied and Environmental Microbiology, 57: 1301-1305, 1991.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. *Règlement sur la qualité de l'eau potable*, c. Q-2, r. 40, Éditeur officiel du Québec.
[<http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/Q2/Q2R40.HTM>]

GRABOW, W., *Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water*, Water SA, 27: 251-268, 2001.

USEPA, *National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule*. Federal Register, Vol. 71, No. 216, 40 CFR, Parts 9, 141 and 142, 2006.

USEPA, *Method 1601: Male-specific (F^+) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure*, USEPA 821-R01-030, Office of Water, Engineering and Analysis Division, Washington, DC 20460, 2001a.

USEPA, *Method 1602: Male-specific (F^+) and Somatic Coliphage in Water by Single Agar Layer (SAL) Procedure*, USEPA 821-R01-029, Office of Water, Engineering and Analysis Division, Washington, DC 20460, 2001b.

Annexe A – Préparation des lysats de coliphages F-spécifiques (par ex. : MS2)

A.1 Amplification du phage

A.1.1 Dans un flacon Erlenmeyer de 125 ml, ajouter 250 µl d'une préculture bactérienne *E. coli* F_{amp} (cf. 7.1) dans 25 ml de milieu TSB 1X (cf. 6.3.1.1). Ajouter 315 µl de MgCl₂ 80X (4 M) (cf. 6.1.4), 250 µl d'une solution d'antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) et 100 µl d'un lysat du coliphage F-spécifique (par ex. : MS2) (cf. 6.4.1). Incuber à 36 °C ± 1 °C avec agitation (100-150 tr/min) pendant environ 4 heures. Une durée d'incubation plus ou moins longue pourrait être requise.

Habituellement, la réussite de l'amplification d'un bactériophage est visible par un éclaircissement complet du bouillon de culture après qu'une augmentation de la turbidité ait été observée. Cet éclaircissement est dû à la lyse de la bactérie hôte. Il n'y a pas d'éclaircissement du bouillon de culture après la multiplication d'un coliphage F-spécifique tel que MS2. Des cellules hôtes qui sont sans *pilus* et qui ne sont donc pas infectées par le coliphage F-spécifique maintiennent la turbidité du milieu. Pour vérifier que l'amplification a bien réussi, un « spot test » (cf. 7.3.2) doit être effectué.

A.1.2 En conditions aseptiques, retirer les bactéries du lysat en le filtrant à travers une membrane 0,45 µm (cf. 5.15). Conserver le filtrat; il constitue le lysat de phage. (Afin de faciliter la filtration, une étape de centrifugation peut être ajoutée au préalable. Pour ce faire, une fois l'amplification effectuée, centrifuger le résultat d'amplification pendant 10 min à 10 000 tours/min (8832 g), puis filtrer le surnageant récupéré sur membrane 0,45 µm).

A.1.3 Avant de congeler le lysat, effectuer les contrôles de qualité suivants (le lysat peut être conservé à 4 °C pendant la durée de ces contrôles) :

A.1.3.1 Efficacité lytique du lysat de phage :

Déposer 6 gouttes de 10 µl du lysat de phage préparé précédemment, sur une plaque TSB + 0,75 % agar + antibiotiques (ampicilline et streptomycine) contenant la souche *E. coli* F_{amp} en phase exponentielle (cf. 6.3.2.3). Incuber à 36 °C pendant 24 h.

Après la période d'incubation, les zones où ont été déposées les gouttes de lysat doivent toutes présenter une zone de lyse.

A.1.3.2 Absence de contamination bactérienne dans le lysat :

Déposer 1 ml de lysat de phage sur deux plaques TSB + 0,75 % agar sans antibiotique et sans bactéries. Incuber à 36 °C pendant 48 h. En parallèle, incuber une plaque TSB + 0,75 % agar sans antibiotique et sans bactéries à 36 °C pendant 48 h.

Après la période d'incubation, toutes les plaques incubées doivent être négatives (démontrer une absence de croissance).

A.2 Congélation du lysat

- A.2.1 Dans un flacon Erlenmeyer stérile, ajouter 100 µl de glycérol stérile (*cf.* 6.1.5) à 900 µl du lysat de **coliphage F-spécifique préparé (par ex. : MS2)** (rapport 1:10). Répartir en volume de 1,5 ml dans des vials cryogéniques (*cf.* 5.26) de 2,0 ml. Mélanger délicatement par inversion. Placer les cryovials dans un bain d'isopropanol (« Mr. Frosty » prérefroidi à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, (*cf.* 5.25) pour congélation rapide à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Annexe B – Énumération des lysats **coliphage F-spécifique employé comme contrôle**

- B.1 Afin d'énumérer le coliphage F-spécifique (par ex. : MS2) servant au contrôle positif et à valider la méthode, la procédure en bicouche est utilisée (à titre indicatif, cette procédure est indiquée en B.3 ci-après).
- B.2 Lorsque la concentration initiale du phage est connue, la méthode 1602 de l'USEPA peut également être employée pour effectuer ces contrôles (USEPA, 2001b). Cette méthode permet alors le dénombrement du phage par une procédure en simple couche. Pour ce faire, des stocks du phage préalablement préparés à la concentration désirée peuvent être conservés congelés jusqu'à utilisation.

B.3 Dilution du phage :

Jusqu'à neuf dilutions différentes du phage peuvent être nécessaires pour son énumération :

$$10^0 \text{ (non dilué), } 10^{-1}, 10^{-2}, \dots, \text{ et } 10^{-9}$$

Les dilutions du phage sont effectuées dans le milieu TSB 1X sans antibiotique (cf. 6.3.1.1). Le milieu TSB 1X sans phage est utilisé comme blanc de méthode lors de l'énumération.

- B.2.1 En conditions aseptiques, pipetter 9,0 ml de milieu TSB 1X sans antibiotique (cf. 6.3.1.1) dans la série de tubes stériles 18 × 150 mm (cf. B.3). Identifier les tubes « blanc de méthode », « 10^0 », « 10^{-1} », « 10^{-2} », « 10^{-3} », etc.
- B.2.2 Effectuer des dilutions en série de la façon suivante :
- B.2.2.1 Ajouter 1,0 ml du lysat **de coliphage F-spécifique** (dilution 10^0) dans le tube de TSB 1X identifié « 10^{-1} ». Boucher et agiter 5 secondes au Vortex (intensité moyenne-élevée, ne pas agiter à l'intensité maximale).
- B.2.2.2 Ajouter 1,0 ml de la dilution « 10^{-1} » dans le tube de 9,0 ml TSB 1X identifié « 10^{-2} ». Boucher et agiter 5 secondes au Vortex (intensité moyenne-élevée, ne pas agiter à l'intensité maximale).
- B.2.2.3 Répéter cette opération jusqu'à l'obtention de la dilution désirée.
- B.4 Énumération du lysat de phage par la technique bicouche : Dans cette procédure, un tube de milieu TSA 0,7 % appelé « top agar » et maintenu liquéfié est inoculé avec la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} et avec une dilution du lysat de **coliphage F-spécifique**. Ce mélange est versé dans une boîte de Pétri contenant une couche de fond de milieu TSA 1,5 % (cf. 6.3.2.1). Chaque dilution **de coliphage F-spécifique** est énumérée en duplicata.

Note : On ne doit pas ajouter de chlorure de magnésium ou de chlorure de calcium au milieu ou à l'échantillon lors de l'énumération du lysat de phage par la procédure en bicouche.

B.4.1 Préparation des tubes de « top agar »

Déposer les tubes de « top agar » (TSA 0,7 %) auxquels les antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X ont été ajoutés **pour la croissance de *E. coli* F_{amp}** (cf. 6.3.2.2.1), dans un bain-marie ajusté à une température de 45 °C à 48 °C. Les tubes de « top agar » doivent être maintenus liquéfiés jusqu'à leur utilisation.

B.4.2 Préparation des milieux pour l'énumération **du coliphage F-spécifique (tel que MS2)**

B.4.2.1 En conditions aseptiques, inoculer un tube de « top agar », maintenu au bain-marie et contenant les antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. B.4.1) avec 100 µl de la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} en phase exponentielle de croissance (cf. 7.2).

B.4.2.2 Ajouter immédiatement 500 µl du lysat du phage non dilué (10⁰) (cf. annexe A). Mélanger doucement par rotation du tube dans la paume de la main.

B.4.2.3 Verser et répartir uniformément le mélange de « top agar » sur l'agar de fond TSA 1,5 % agar (cf. 6.3.2.1.1) identifiée 10⁰ (non dilué). Répéter les étapes B.4.2 à B.4.2.3 pour chaque dilution et chaque duplicata. **Les tubes de « top agar » inoculés avec la bactérie hôte et le coliphage doivent demeurer le moins longtemps possible à la température de 45-48 °C.**

B.4.3 Préparation du blanc de méthode (**contrôle de stérilité**)

B.4.3.1 En conditions aseptiques, inoculer un tube de « top agar », maintenu au bain-marie et contenant l'ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1), avec 100 µl de la bactérie hôte *E. coli* F_{amp} en phase exponentielle de croissance (cf. 7.2).

B.4.3.2 Ajouter immédiatement 500 µl de TSB 1X (cf. 6.3.1.1). Mélanger doucement l'inoculum par rotation du tube dans la paume de la main.

B.4.3.3 Verser et répartir uniformément le mélange de « top agar » sur l'agar de fond TSA 1,5 % agar (cf. 6.3.2.1.1) identifiée « blanc de méthode ».

B.4.4 Lorsque le « top agar » est solidifié, refermer, inverser et incuber les boîtes de Pétri à 36 °C ± 1 °C pendant 16 à 24 heures.

B.4.5 Des « plages de lyse » (typiques : 1 à 10 mm de diamètre) apparaissent dans le tapis de croissance de la bactérie hôte après la période d'incubation. Dénombrer les plages de lyse. L'utilisation d'un transilluminateur est recommandée pour l'énumération. Pour les calculs, voir la section B.4.6.

B.4.6 Observation des résultats : énumération du lysat de phage (UFP/ml)

B.4.6.1 Les limites de quantification (inférieure et supérieure) pour l'énumération du phage sont respectivement 30 et 300 UFP par boîte de Pétri. Lorsque le dénombrement excède la limite de quantification, inscrire TNC comme résultat.

- B.4.6.2 Additionner le nombre d'UFP pour chaque dilution (additionner les duplicata : 500 µl + 500 µl = 1 ml) en excluant les dilutions ayant donné TNC ou zéro comme résultat (voir équation dans la section B.4.6.5).
- B.4.6.3 Additionner les volumes d'échantillons non dilués utilisés pour l'ensemble des répliques et l'ensemble des dilutions ayant des résultats compris entre 30 et 300 UFP (voir équation dans la section B.4.6.5).
- B.4.6.4 Diviser la somme des UFP par la somme des volumes d'échantillons non dilués pour obtenir des UFP/ml (voir équation dans la section B.4.6.5).
- B.4.6.5 Équation

$$UFP/ml = \frac{UFP_1 + UFP_2 + \dots + UFP_n}{V_1 + V_2 + \dots + V_n}$$

où

UFP : unité formant des plages de lyse provenant des échantillons des dilutions comptables;

V : volume total des échantillons non dilués comptables.

Annexe C – Étapes de la méthode

