

NORME  
INTERNATIONALE

**ISO**  
**10705-1**

Première édition  
1995-08-01

---

---

**Qualité de l'eau — Détection et  
dénombrement des bactériophages —**

**Partie 1:**

Dénombrement des bactériophages ARN F  
spécifiques

*iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f90cf50-29d4-4ece-a3ed-39aacf06cc9c/iso-10705-1-1995>

ISO 10705-1:1995  
*Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages —  
Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages*



Numéro de référence  
ISO 10705-1:1995(F)

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 10705-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f90cf50-29d4-4ece-a3ed->

L'ISO 10705 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages*:

- *Partie 1: Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques*
- *Partie 2: Dénombrement des coliphages somatiques*

L'annexe A fait partie intégrante de la présente partie de l'ISO 10705. Les annexes B et C sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1995

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

# Qualité de l'eau — Détection et dénombrement des bactériophages —

## Partie 1:

## Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques

iTeh STANDARD PREVIEW

### 1 Domaine d'application (standards.iteh.ai) 2 Références normatives

La présente partie de l'ISO 10705 prescrit une méthode de détection et de dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques par incubation de l'échantillon avec une souche-hôte appropriée. La méthode peut être appliquée à tous les types d'eaux, de sédiments et de boues, si nécessaire après dilution. Dans le cas de faible population, une étape de préconcentration peut être nécessaire pour laquelle une partie séparée sera élaborée. La méthode peut également être appliquée aux extraits de coquillage. Des essais supplémentaires de confirmation des résultats, également spécifiés dans la présente partie de l'ISO 10705, peuvent être nécessaires, suivant le nombre plus ou moins élevé des bactériophages ARN F spécifiques par rapport aux autres organismes présents.

La présence de bactériophages ARN F spécifiques dans un échantillon d'eau indique en général une pollution par des eaux usées contaminées par des matières fécales d'origine animale ou humaine. Les caractéristiques de leur résistance dans l'environnement, de leur élimination par des procédés courants de traitement de l'eau, ainsi que de leur concentration ou rétention par les coquillages, ressemble à celle des virus entériques humains présents dans l'eau et dans les aliments, par exemple les entérovirus, le virus de l'hépatite A et les rotavirus.

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 10705. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 10705 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai.*

ISO 5667-1:1980, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Guide général pour l'établissement des programmes d'échantillonnage.*

ISO 5667-2:1991, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

ISO 5667-3:1994, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3: Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.*

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 8199:1988, *Qualité de l'eau — Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.*

### 3 Définition

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 10705, la définition suivante s'applique.

**3.1 bactériophages ARN F spécifiques:** Virus bactériens capables d'infecter une souche-hôte possédant des pili sexuels ou F produisant des plages visibles de lyse bactérienne sur un tapis de bactéries confluentes développées dans des conditions appropriées, alors que le processus infectieux est inhibé en présence d'une concentration de 40 (parfois 400) µg/ml de RNase dans le milieu ensemencé.

### 4 Principe

Mélanger un échantillon avec un faible volume de milieu de culture nutritif semi-solide. Y ajouter une culture de souche-hôte et l'ensemencer sur un milieu nutritif solide. Incuber puis examiner les boîtes pour y repérer l'apparition de plaques. Si nécessaire, effectuer un examen simultané de boîtes préparées en parallèle avec ajout de RNase pour confirmer les résultats par comptages différentiels. Exprimer les résultats en concentration en nombre de particules formant des plages ( $C_{\text{pp}}$ ) par unité de volume.

### 5 Précautions relatives à la sécurité

**La souche-hôte utilisée est une souche mutée de *Salmonella typhimurium* faiblement pathogène, qu'il convient de manipuler conformément aux procédures (nationales ou internationales) de sécurité mises au point pour cette espèce bactérienne. Les bactériophages ARN F spécifiques ne sont pas pathogènes pour l'homme ou l'animal, mais ils sont très résistants au séchage. Il est donc recommandé de prendre des précautions appropriées pour empêcher des contaminations croisées des matériaux d'essai, et plus particulièrement lors des opérations de manipulation et d'examen des cultures bactériennes à forte concentration ou lors de l'ensemencement des cultures de souches-hôtes. Ces opérations**

**doivent être effectuées dans une enceinte pour risque biologique ou dans une zone séparée du laboratoire.**

## 6 Diluant, milieux de culture et réactifs

### 6.1 Matériaux de base

Pour la préparation des milieux de culture et des réactifs, utiliser des ingrédients de qualité uniforme et des réactifs de qualité analytique, et suivre les instructions données dans l'annexe A. En ce qui concerne la conservation, se reporter à l'ISO 8199, sauf si précisé dans la présente partie de l'ISO 10705. Des milieux complets déshydratés peuvent également être utilisés. Dans ce cas, suivre à la lettre les instructions du fabricant.

Pour la préparation des milieux de culture, utiliser de l'eau distillée dans des récipients en verre ou déionisée, exempte de substances pouvant inhiber la croissance des bactéries dans les conditions de l'essai, et conforme à l'ISO 3696.

### 6.2 Diluant

Pour diluer l'échantillon, utiliser une solution peptonée saline comme indiqué en A.8.

### 6.3 Réactifs

**6.3.1 RNase pancréatique bovine,** activité spécifique approximative de 50 unités/mg (Kunitz).

**6.3.2 Disques antibiotiques,** pour examiner la sensibilité à l'acide nalidixique (130 µg; 9 mm) et à la kanamycine (100 µg; 9 mm).

**6.3.3 Glycérol,** 870 g/litre.

### 6.4 Cultures microbiologiques de référence

Souche de *Salmonella typhimurium* WG49, de type phage 3 NaI<sup>f</sup> (F' 42 *lac*::Tn5), NCTC 12484.

Bactériophage MS2, NCTC 12487 ou ATCC 15597-B1.

*Escherichia coli* K-12 Hfr provenant d'une collection de cultures appropriées, par exemple NCTC 12486 ou ATCC 23631.

NOTE 1 Les souches NCTC sont disponibles à la National Collection of Type Cultures, 61 Colindale Avenue, London NW9 6HT, Angleterre. Les souches ATCC sont disponibles à l'American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, U.S.A.

## 7 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire pour analyses microbiologiques, et

**7.1 Étuve à air chaud pour stérilisation en chaleur sèche et autoclave.** Exception faite des appareillages fournis déjà stérilisés, la verrerie et autre matériel doivent être stérilisés suivant les instructions données dans l'ISO 8199.

**7.2 Incubateur ou bain d'eau,** contrôlé thermostatiquement à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**7.3 Incubateur ou bain d'eau,** contrôlé thermostatiquement à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  et équipé d'un plateau tournant à  $100\text{ min}^{-1} \pm 10\text{ min}^{-1}$ .

**7.4 Bain d'eau,** contrôlé thermostatiquement à  $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**7.5 Bain d'eau ou dispositif équivalent,** permettant de faire fondre la gélose.

**7.6 pH-mètre.**

**7.7 Appareil de comptage,** équipé d'une source de lumière indirecte, oblique.

**7.8 Congélateur,** contrôlé thermostatiquement à  $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ .

**7.9 Congélateur,** contrôlé thermostatiquement à  $-70\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$ .

**7.10 Spectromètre,** capable de contenir des cuves optiques de 1 cm ou le tube latéral de flacons néphélométriques (7.17) et muni d'un filtre de 500 nm à 650 nm avec une largeur de bande maximale de  $\pm 10\text{ nm}$ .

Verrerie de laboratoire stérile d'usage courant en microbiologie ou matériel à usage unique en plastique conformément à l'ISO 8199, et

**7.11 Boîtes de Petri,** de 9 cm à 15 cm de diamètre.

**7.12 Pipettes graduées,** de capacités 1 ml, 5 ml et 10 ml.

**7.13 Flacons en verre,** de volumes appropriés.

**7.14 Tubes de culture,** avec bouchons.

**7.15 Éprouvettes graduées,** de capacités appropriées.

**7.16 Fioles coniques,** de 250 ml à 300 ml de capacité, munies de bouchons en ouate ou de tout autre matériau approprié.

**7.17 Cuves optiques,** de 1 cm de trajet optique ou **fioles coniques néphélométriques,** de 250 ml à 300 ml de capacité, munies de tubes latéraux pouvant être adaptés sur un spectromètre (7.10) et de bouchons en ouate ou de tout autre matériau approprié. (Voir figure 1.)

**7.18 Unités de filtres sur membrane,** pour la stérilisation, de porosité  $0,2\text{ }\mu\text{m}$ .

**7.19 Fioles en plastique,** munies d'un couvercle, de 1,5 ml à 2 ml de capacité.

## 8 Échantillonnage

Prélever des échantillons et les livrer au laboratoire conformément à l'ISO 8199, l'ISO 5667-1, l'ISO 5667-2 et l'ISO 5667-3.

## 9 Préparation des matériaux d'essai

### 9.1 Mise en culture et maintien des souche-hôtes WG49 et de l'*E. coli* K12 Hfr

La mise en culture et le maintien des souches-hôtes impliquent le respect de différentes étapes résumées à la figure 2. Cette figure indique également à quel moment effectuer le contrôle qualité de la culture-hôte.

#### 9.1.1 Préparation des cultures mères

Réhydrater le contenu d'une ampoule lyophilisée de la culture de référence des souches-hôtes dans un faible volume de milieu (A.1) à l'aide d'une pipette Pasteur. Ajouter la suspension à 50 ml de milieu (A.1) dans une fiole conique de 300 ml (7.16). Incuber pendant  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$  à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  tout en agitant à  $100\text{ min}^{-1} \pm 10\text{ min}^{-1}$ . Ajouter 10 ml de glycérol (A.6) et mélanger soigneusement. Répartir dans des fioles en plastique (7.19) par portions aliquotes de 1,2 ml et conserver à  $-70\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$ .

NOTE 2 Il convient que cette première culture de la souche-hôte soit conservée comme étalon au laboratoire.

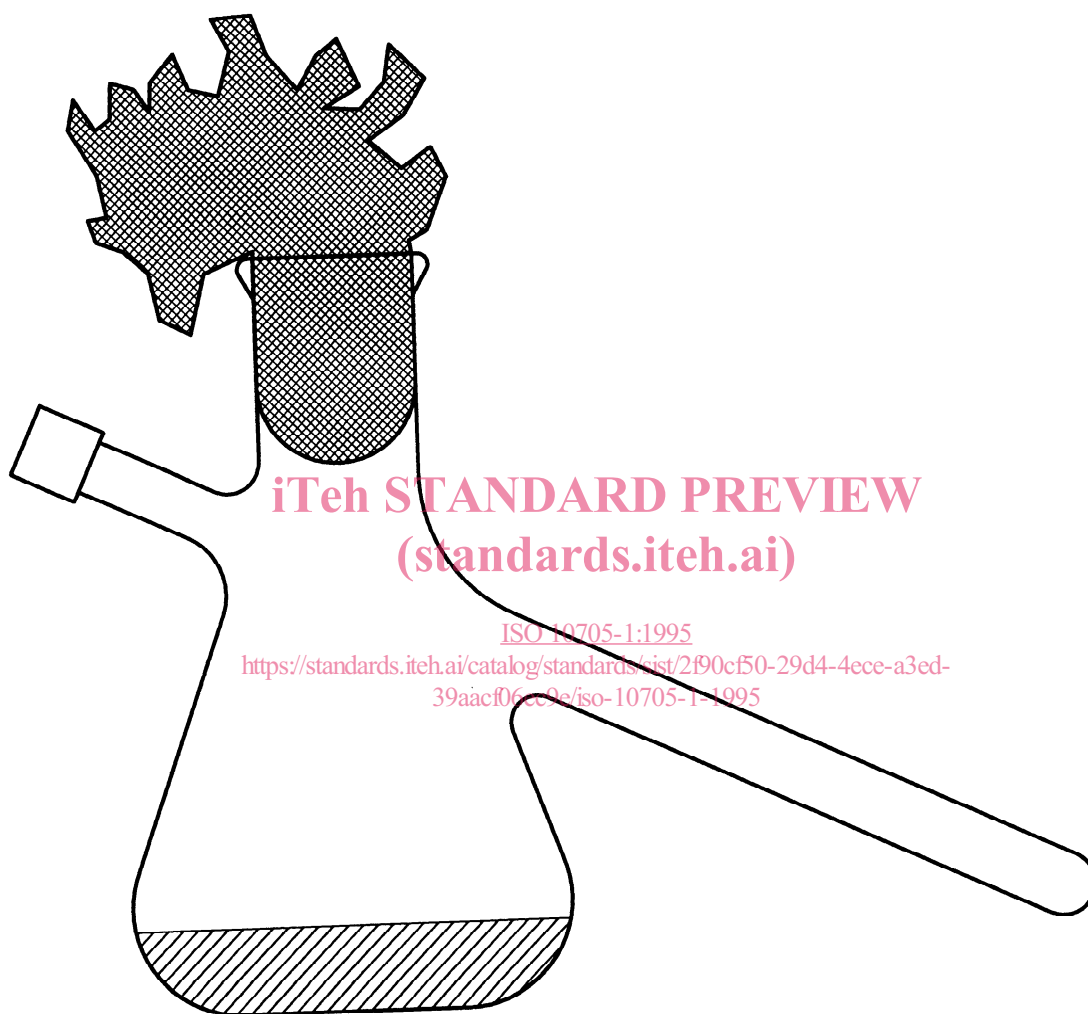


Figure 1 — Fioles coniques néphélométriques pour la mise en culture des souches-hôtes

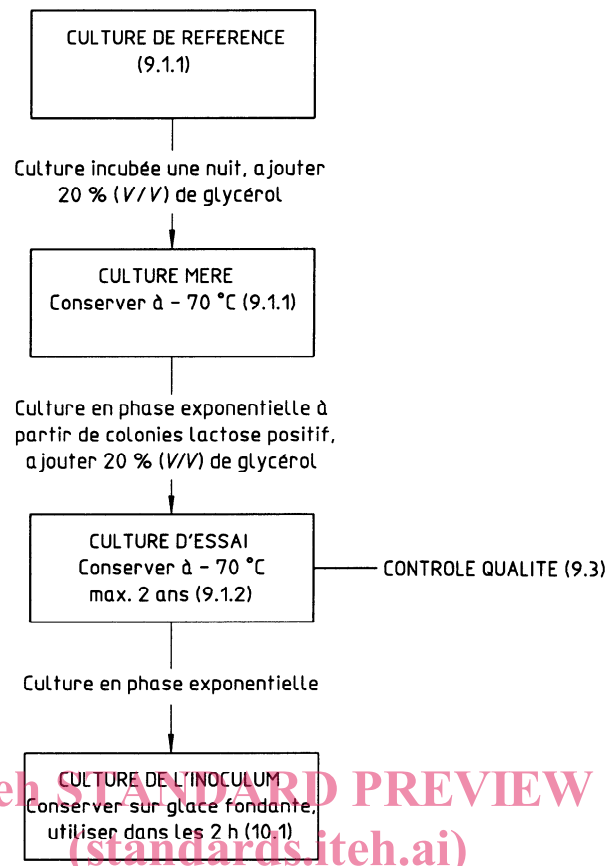


Figure 2 — Schéma de la mise en culture, du maintien et du contrôle qualité de la souche-hôte WG49

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2f90cf50-29d4-4ece-a3ed-39aacf06ec9e/iso-10705-1-1995>

### 9.1.2 Préparation des cultures d'essai

Laisser décongeler le contenu d'une fiole de la culture mère (9.1.1) à température ambiante et l'ensemencer dans une boîte contenant une gélose de McConkey (A.7), ou tout autre milieu contenant du lactose de façon à obtenir des colonies isolées. Incuber à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . Ajouter 50 ml de milieu (A.1) à une fiole conique de 300 ml (7.16) et réchauffer à température ambiante. Choisir trois à cinq colonies lactose positif à partir de la gélose de McConkey et ensemencer chacune de ces colonies dans la fiole contenant le milieu (A.1). Incuber à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $5\text{ h} \pm 1\text{ h}$  tout en agitant à  $100\text{ min}^{-1} \pm 10\text{ min}^{-1}$ . Ajouter 10 ml de glycérol (A.6) et mélanger soigneusement. Répartir dans les fioles en plastique (7.19) par portions aliquotes de 1,2 ml et conserver à  $-70\text{ °C} \pm 10\text{ °C}$  pendant 2 ans maximum. Contrôler la qualité des cultures de travail conformément à 9.3.

#### NOTES

3 Si l'on s'attend à un grand nombre d'essais, plusieurs fioles coniques peuvent être ensemencées en parallèle.

4 Si le contrôle qualité échoue, préparer de nouveaux inocula à partir de la culture mère. Si le contrôle qualité échoue plusieurs fois ou si la culture mère est épuisée, se procurer une nouvelle ampoule lyophilisée de la culture de référence. Ne pas procéder à des repiquages successifs dans le laboratoire.

### 9.2 Étalonnage des mesures de turbidité

Sortir du congélateur une fiole contenant la culture d'essai de la souche-hôte WG49 et la laisser décongeler à température ambiante. Ajouter 50 ml de milieu (A.1) à une fiole conique néphélométrique (7.17) et réchauffer à température ambiante. Ajuster le spectromètre à 0 avec le tube latéral rempli. On peut également utiliser des fioles coniques ordinaires (7.16) et ajuster le spectromètre à 0 après transvasement du bouillon dans la cuve optique (7.17). Ensemencer 0,5 ml de la culture d'essai. Incuber à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  tout en agitant à  $100\text{ min}^{-1} \pm 10\text{ min}^{-1}$  pendant 3 h. Mesurer la turbidité toutes les 30 min et prélever un échantillon de 1 ml pour le dénombrement des bactéries revivifiables, en ayant soin de réduire au maximum le temps où la fiole est hors de l'incubateur.

Diluer les échantillons à  $10^{-6}$  et répartir des volumes de 0,1 ml des dilutions à  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  dans les boîtes contenant le milieu (A.2) en double; incubé à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . Compter le nombre total de colonies sur chaque boîte produisant entre 30 et 300 colonies et calculer le nombre de pfc/ml (consulter l'ISO 8199 si nécessaire).

NOTE 5 Il convient de répéter cette procédure plusieurs fois pour établir un rapport entre les mesures de turbidité et les comptages de colonies. Si suffisamment de données ont été recueillies, la suite des travaux peut se fonder sur les seules mesures de turbidité.

### 9.3 Contrôle qualité de la souche-hôte WG49

Utiliser une culture comme préparée en 9.2.

Ensemencer également aux temps  $t = 0\text{ h}$  et  $t = 3\text{ h}$  des boîtes de gélose de McConkey (A.7) ou tout autre milieu contenant du lactose avec la même série de dilutions et incubé à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ . Sur les boîtes produisant de 30 à 300 colonies, compter le nombre de colonies lactose positif et lactose négatif et calculer le pourcentage de colonies lactose positif.

Aux temps  $t = 0\text{ h}$  et  $t = 3\text{ h}$ , répartir 0,1 ml de la dilution à  $10^{-2}$  dans une boîte de gélose de McConkey ou gélose lactosée équivalente, puis y placer un disque avec de l'acide nalidixique (Nal) et un disque de kanamycine (Km) et incubé à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

Mesurer les zones d'inhibition autour des disques antibiotiques.

La souche-hôte est déclarée acceptable si les critères suivants sont remplis:

le comptage de la boîte sur milieu (A.2) (voir 9.2) à 0 h est de 0,5 à  $3 \times 10^7$  pfc/ml;

le comptage de la boîte sur milieu (A.2) (voir 9.2) à 3 h est de 7 à  $40 \times 10^7$  pfc/ml;

la proportion de colonies lactose négatif (ségrégation des plasmides) est  $< 8\%$ ;

absence de zone d'inhibition autour du disque Nal;

zone d'inhibition autour du disque Km  $< 20\text{ mm}$ .

NOTE 6 Des disques antibiotiques de diamètre ou de concentration différents peuvent être utilisés. Dans ce cas, il convient de définir un nouveau critère pour la zone maximale d'inhibition autour du disque Km.

Vérifier la sensibilité de la souche-hôte vis à vis des bactériophages ARN F spécifiques comme suit.

Préparer une culture mère de bactériophage MS2 comme décrit dans l'annexe C et la conserver à  $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ . Préparer une série de dilutions décimales et les ensemencer conformément à 10.1 mais utiliser la souche-hôte *E. coli* K-12 Hfr. Conserver les séries de dilutions à  $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  pendant une nuit. Compter le nombre de plaques à partir de la série de dilution et préparer 100 ml à 1 000 ml d'une suspension de MS2 dans une solution peptonée saline (A.8) censée contenir environ 100 pfp/ml. Ajouter (5 g/l) de glycérol.

Répartir dans les fioles en plastique (7.19) par portions aliquotes de 1,2 ml et conserver à  $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  ou  $-70\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ .

Faire décongeler quatre flacons à température ambiante, les regrouper dans un seul tube et inoculer des volumes de 1 ml en double sur la souche de *E. coli* K-12 Hfr et sur la souche WG49 conformément à 10.1. Compter le nombre de plaques sur chaque boîte et calculer le rendement de WG49 par rapport à la souche de *E. coli*. Le WG49 est acceptable si le taux de récupération est  $> 80\%$ .

## 10 Mode opératoire

### 10.1 Mode opératoire normalisé

Sortir du congélateur une fiole de la culture de travail et la décongeler à température ambiante. Ajouter 50 ml de milieu (A.1) dans une fiole conique néphélométrique (7.17) ou dans une fiole conique simple (7.16). Ajuster le spectromètre à 0 comme décrit en 9.2 et préchauffer à température ambiante. Ensemencer 0,5 ml de la culture d'essai. Incuber à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  tout en agitant à  $100\text{ min}^{-1} \pm 10\text{ min}^{-1}$ . Mesurer la turbidité toutes les 30 min. À une turbidité correspondant à une densité cellulaire d'environ  $10^8$  ufc/ml (sur la base des données obtenues en 9.2), sortir de l'incubateur la culture de l'inoculum et refroidir rapidement sur de la glace fondante. Utiliser ce milieu dans les 2 h.

NOTE 7 Il est essentiel de refroidir rapidement la culture pour empêcher la perte de pili F par les cellules, ce qui aurait une influence néfaste sur le rendement.

Faire fondre les flacons de milieu (A.3), refroidir entre  $44\text{ °C}$  et  $50\text{ °C}$ , ajouter, dans des conditions d'aseptie, une solution calcium-glucose (0,5 ml/50 ml) (voir A.1) et répartir en portions aliquotes de 2,5 ml dans des tubes de culture avec bouchons, placés dans un bain d'eau à  $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Ajouter, à chaque tube, 1 ml



d'échantillon (dilué ou concentré). Examiner chaque volume ou niveau de dilution au moins en double.

Ajouter 1 ml de la culture de l'inoculum, mélanger soigneusement et couler le contenu dans les boîtes de 9 cm contenant le milieu (A.2). Répartir de façon homogène, laisser se solidifier sur une surface froide parfaitement horizontale et incubé les boîtes renversées à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$ .

#### NOTES

8 Ne pas empiler plus de six boîtes (de préférence, quatre).

9 L'ajout d'échantillon et de culture-hôte conservés dans la glace, à la surface de la gélose, peut entraîner une chute brutale de la température et la solidification du milieu. Veiller à respecter un délai suffisant entre ces deux étapes pour permettre le réchauffement. Cependant, veiller à ce que les tubesensemencés ne restent pas dans le bain d'eau plus de 10 min.

Compter, sous éclairage oblique, le nombre de plages de lyse apparues sur chaque boîte dans les 4 h.

### 10.2 Méthodes pour échantillons présentant une abondante flore bactérienne

Ajouter de l'acide nalidixique au milieu (A.3) jusqu'à obtention d'une concentration finale de  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

NOTE 10 L'acide nalidixique offre une bonne stabilité à la chaleur. Il peut soit être ajouté sous forme d'une solution stérilisée par filtration (A.4) ( $0,2\text{ ml}/50\text{ ml}$ ) après avoir fait fondre le milieu (A.3), soit être ajouté à cette gélose avant passage à l'autoclave.

### 10.3 Essai de confirmation

Parallèlement à la série de boîtes décrite en 10.1, préparer une série similaire contenant une solution RNase (A.5) ajoutée aux tubes de milieu (A.3) jusqu'à obtention d'une concentration finale de  $40\text{ }\mu\text{g/ml}$  [c'est-à-dire  $100\text{ }\mu\text{l}$  de solution RNase ajoutés à  $2,5\text{ ml}$  de milieu (A.3) dans un tube].

#### NOTES

11 Il convient que des essais de confirmation soient menés au moins

- lors de l'examen de nouveaux sites d'échantillonnage;
- à intervalles réguliers en des points d'échantillonnage fixes lorsque le rapport  $N_{RNase}/N$  (voir article 11) est en général inférieur à 10 %;
- toujours en des points fixes d'échantillonnage lorsque le rapport  $N_{RNase}/N$  est en général supérieur à 10 %;

d) lorsque de larges plages de lyse circulaires claires, avec des bords lisses (origine probable: phages somatiques de *Salmonella*) apparaissent régulièrement.

12 Exceptionnellement, les phages à ARN peuvent ne pas être inhibés par la RNase à  $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ ; il peut donc s'avérer nécessaire d'augmenter la concentration de RNase à  $400\text{ }\mu\text{g/ml}$ .

### 10.4 Échantillons contenant un petit nombre de phages

Procéder comme en 10.1 aux modifications suivantes près:

- $10\text{ ml}$  de milieu (A.3),  $1\text{ ml}$  de culture-hôte et  $5\text{ ml}$  d'échantillon en double par étape de dilution;
- couler  $50\text{ ml}$  de milieu (A.2) dans une boîte de Petri de  $14\text{ cm}$ .

NOTE 13 Ce mode opératoire permet de détecter jusqu'à  $1\text{ ufp}/50\text{ ml}$  ou  $100\text{ ml}$ , si 10 ou 20 boîtes sont ensemencées en parallèle. En raison d'une forte consommation de milieux de culture, il est recommandé d'utiliser des méthodes de concentration qui s'avéreront également nécessaires pour des comptages encore plus faibles.

### 10.5 Assurance qualité

Pour chaque série d'échantillons, examiner un blanc d'essai en utilisant comme échantillon un diluant stérile et une préparation étalon de MS2 (voir 9.3). Reporter les résultats sur une carte de contrôle.

Il est possible, en outre, d'utiliser un échantillon étalon naturellement pollué (eau de surface ou eau usée) dilué à environ  $100\text{ pfp/ml}$  dans une solution peptonée saline et de glycérol ( $5\text{ g/l}$ ) et conservée à  $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$  ou  $-70\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ . Rejeter les échantillons étalons si la concentration en phages à ARN décroît.

NOTE 14 En l'absence de matériaux de référence normalisés aisément disponibles, il y a lieu d'encourager tout programme d'échange d'échantillons étalons entre les laboratoires.

Si la sensibilité aux phages disparaît (ce n'est pas très fréquent, mais cela peut se produire soudainement et totalement), préparer un nouveau lot d'inocula conformément à 9.1.2.

## 11 Expression des résultats

Choisir les boîtes présentant de 30 à 300 plages. Calculer, à partir du nombre de plages comptées, et en prenant en considération les résultats des essais pré-alables de confirmation, la concentration en nombre