
**Qualité de l'eau — Détection et
dénombrement des bactériophages —
Partie 2:
Dénombrement des coliphages somatiques**

*Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages
Part 2: Enumeration of somatic coliphages*
(standards.iteh.ai)

[ISO 10705-2:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ce-83bc-b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ce-83bc-
b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ce-83bc-b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10705-2:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ce-83bc-b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ce-83bc-b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000>

© ISO 2000

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 734 10 79
E-mail copyright@iso.ch
Web www.iso.ch

Imprimé en Suisse

Sommaire

Page

1	Domaine d'application.....	1
2	Références normatives	1
3	Termes et définitions.....	2
4	Précautions relatives à la sécurité.....	2
5	Principe.....	2
6	Diluant, milieux de culture et réactifs	2
6.1	Matériaux de base.....	2
6.2	Diluant.....	3
7	Appareillage et verrerie.....	3
8	Cultures microbiologiques de référence.....	4
9	Échantillonnage	4
10	Préparation des matériaux d'essai	5
10.1	Mise en culture et entretien des souches-hôtes	5
10.2	Étalonnage des mesurages d'absorbance pour le dénombrement des micro-organismes cultivables	6
11	Mode opératoire.....	7
11.1	Préparation des précultures	7
11.2	Mode opératoire normalisé.....	7
11.3	Mode opératoire pour les échantillons présentant une abondante flore bactérienne	8
11.4	Mode opératoire pour les échantillons contenant un faible nombre de phages	8
11.5	Essai de présence/absence	8
11.6	Assurance qualité.....	9
12	Expression des résultats	10
12.1	Modes opératoires de comptage des plages (11.2 à 11.4)	10
12.2	Essai de présence/absence (11.5).....	10
13	Rapport d'essai	10
	Annexe A (normative) Milieux de culture, réactifs et diluant	11
	Annexe B (informative) Description générale des bactériophages somatiques	14
	Annexe C (informative) Mise en culture du bactériophage ϕ X174	15
	Bibliographie.....	16

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente partie de l'ISO 10705 peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

La Norme internationale ISO 10705-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

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*
- *Partie 3: Méthodes par concentration*
- *Partie 4: Dénombrement des bactériophages infectants des Bacteroides fragilis*

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

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

Partie 2: Dénombrement des coliphages somatiques

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 10705 spécifie une méthode de détection et de dénombrement des coliphages somatiques par incubation de l'échantillon avec une souche-hôte appropriée. La méthode est applicable à tous les types d'eaux, aux extraits de sédiments et de boues, si nécessaire après dilution. La méthode est également applicable aux extraits de coquillages.

Dans le cas d'une faible population de phages, une étape de préconcentration peut s'avérer nécessaire pour laquelle une Norme internationale distincte sera élaborée ultérieurement.

NOTE Il est souhaitable que les Normes Internationales soient adoptées le plus largement possible. La présente partie de l'ISO 10705 comporte des références à des procédures alternatives qui parent à la nécessité d'utiliser du matériel ou des équipements coûteux qui peuvent ne pas être aisément disponibles dans les pays en développement. L'utilisation de ces procédures alternatives n'affecte pas les performances de la présente méthode.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ee-83bc-b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000>

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 10705. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente partie de l'ISO 10705 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 31-0:1992, *Grandeurs et unités — Partie 0: Principes généraux.*

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 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 10705, les termes et définitions donnés dans le Guide ISO/CEI 2 ainsi que la définition suivante s'appliquent.

3.1

coliphage somatique

virus des bactéries capable d'infecter certaines souches-hôtes d'*Escherichia coli* (et des souches apparentées) en se fixant sur la paroi bactérienne au début du processus d'infection

NOTE Les coliphages somatiques provoquent l'apparition de plages visibles (zones de lyse) sur un tapis confluent de bactéries-hôtes cultivées dans des conditions appropriées.

4 Précautions relatives à la sécurité

La souche-hôte utilisée pour les besoins de la présente partie de l'ISO 10705 est une souche non pathogène pour l'homme et l'animal. Il convient de la manipuler conformément aux procédures normales (nationales et internationales) de sécurité des laboratoires d'analyses bactériologiques. Les coliphages somatiques ne sont pathogènes ni pour l'homme ni pour l'animal, mais certains d'entre eux sont très résistants à la dessiccation. Il convient donc de prendre les précautions appropriées pour éviter les contaminations croisées des échantillons, plus particulièrement lors de la manipulation ou de l'examen de cultures de concentration élevée ou lors de l'ensemencement de cultures de souches-hôtes. Ces opérations doivent être réalisées dans une enceinte pour risque biologique ou dans une zone séparée du laboratoire.

Le chloroforme est une substance cancérigène. Prendre les précautions de sécurité qui s'imposent ou utiliser une autre méthode d'égale efficacité.

[ISO 10705-2:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ee-83bc-b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/eaf722ae-b96f-43ee-83bc-b424e0f2dfb7/iso-10705-2-2000>

5 Principe

L'échantillon est mélangé à un faible volume de milieu de culture nutritif semi-solide. Une culture de la souche-hôte y est ajoutée et le mélange est coulé dans une boîte contenant du milieu de culture nutritif solide. Après cela, les boîtes sont incubées et examinées pour y repérer l'apparition de plages. Les résultats sont exprimés en nombre de particules formant des plages, pfp (également identifiées par unités formant des plages, ufp), par unité de volume d'échantillon.

6 Diluant, milieux de culture et réactifs

6.1 Matériaux de base

Pour la préparation des milieux de culture et des réactifs, utiliser des produits de qualité constante ainsi que des réactifs de qualité analytique, et suivre les instructions indiquées dans l'annexe A. Pour toute information relative à la conservation, se reporter à l'ISO 8199, sauf si une indication est précisée dans la présente partie de l'ISO 10705. Des milieux de culture complets déshydratés peuvent également être utilisés. Dans ce cas, suivre scrupuleusement les instructions du fabricant.

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

NOTE L'utilisation de produits chimiques d'autres qualités est permise, sous réserve de démontrer qu'ils ont une performance égale pour l'essai.

6.2 Diluant

Pour diluer l'échantillon, utiliser une solution peptonée saline (A.7) ou tout autre diluant conforme à l'ISO 6887.

7 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire d'analyses microbiologiques, et

7.1 Étuve à air chaud pour stérilisation en chaleur sèche et autoclave. À l'exception des appareillages fournis sous forme stérile, la verrerie et les autres matériels doivent être stérilisés conformément aux instructions indiquées dans l'ISO 8199.

7.2 Incubateur ou bain d'eau, contrôlé thermostatiquement à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

7.3 Incubateur ou bain d'eau, contrôlé thermostatiquement à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ et équipé d'un dispositif d'agitation, par exemple un plateau tournant à (100 ± 10) tr/min.

7.4 Bain d'eau ou bloc chauffant, contrôlé thermostatiquement à $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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 $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$.

7.9 Congélateur, contrôlé thermostatiquement à $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$ ou réservoir de stockage à azote liquide.

7.10 Spectrophotomètre, capable de contenir des cuves de 1 cm de trajet optique ou le tube latéral d'une fiole néphélométrique (7.17), et muni d'un filtre de longueur d'onde allant de 500 nm à 650 nm avec une largeur de bande maximale de ± 10 nm.

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

7.11 Boîtes de Petri, ventilées, de 9 cm ou 14 cm à 15 cm de diamètre.

7.12 Pipettes graduées, de 0,1 ml, 1 ml, 5 ml et 10 ml de capacité et **pipettes Pasteur.**

7.13 Flacons en verre, de volume approprié.

7.14 Tubes de culture, avec bouchons ou dispositifs équivalents.

7.15 Éprouvettes graduées, de capacité appropriée.

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 10 mm de trajet optique ou **fioles coniques néphélométriques,** de 250 ml à 300 ml de capacité, munies de tubes latéraux pouvant être adaptés sur un spectrophotomètre (7.10) (voir la Figure 1) et de bouchons en ouate ou de tout autre matériau approprié.

7.18 Unités de filtration sur membrane, pour la décontamination, de $0,2 \mu\text{m}$ de porosité.

7.19 Tubes en plastique, bouchés, de 1,5 ml à 3 ml de capacité.

7.20 Réfrigérateur, réglé à une température de (5 ± 3) °C.

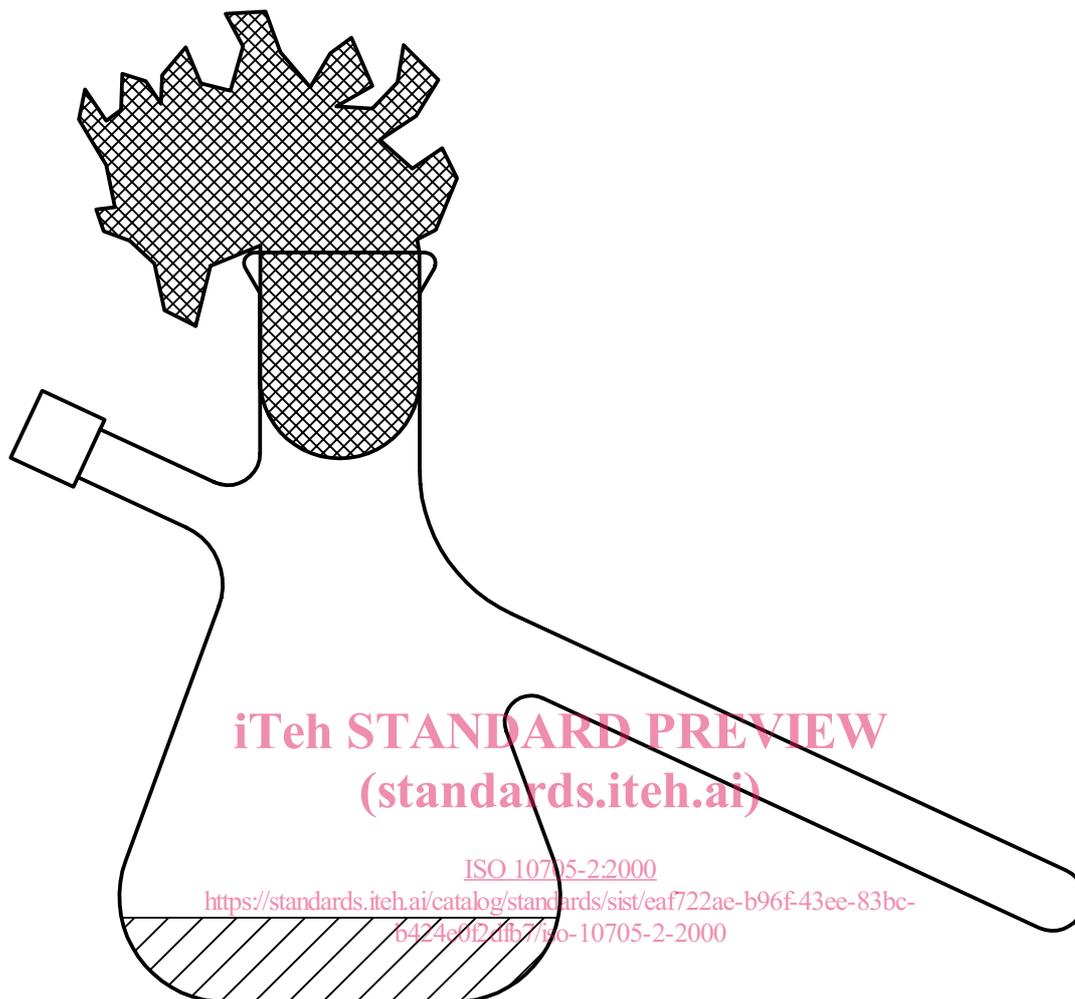


Figure 1 — Fiole conique néphélométrique pour la mise en culture des souches-hôtes

8 Cultures microbiologiques de référence

Pour les échantillons contenant une faible flore bactérienne (eau potable, eaux naturelles non polluées), utiliser la souche *Escherichia coli* C, ATCC 13706. Pour les échantillons contenant une abondante flore bactérienne (eaux naturelles polluées, eaux usées), il convient d'utiliser le mutant résistant à l'acide nalidixique, souche *Escherichia coli* CN (ATCC 700078 [1]), également connue sous le nom de souche WG5 [2].

Utiliser le bactériophage ϕ X174 (ATCC 13706-B1) pour la préparation du témoin de référence (11.6.1).

NOTE Les souches ATCC sont disponibles à l'American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110.

9 Échantillonnage

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

10 Préparation des matériaux d'essai

10.1 Mise en culture et entretien des souches-hôtes

10.1.1 Généralités

La mise en culture et l'entretien des souches-hôtes impliquent différentes étapes résumées à la Figure 2.

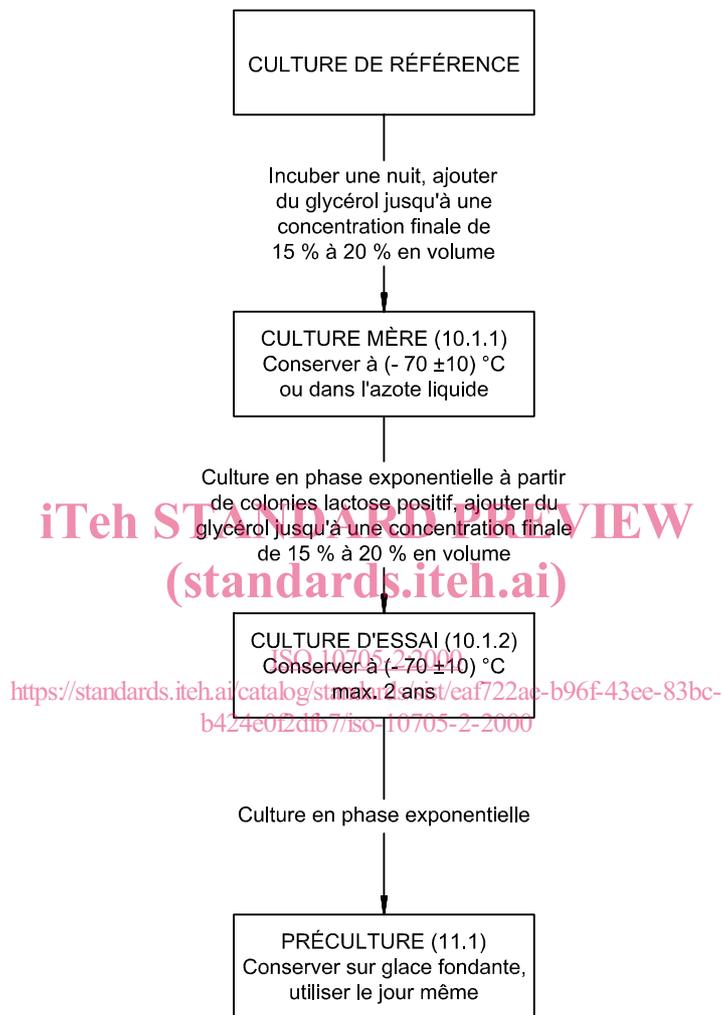


Figure 2 — Schéma de la mise en culture et de l'entretien des souches-hôtes

Pour la mise en culture des souches-hôtes lors des différentes étapes, il est recommandé d'agiter légèrement les cultures. Outre l'augmentation du taux de croissance des bactéries, l'agitation permet de s'assurer que toutes les cellules se développent activement et qu'aucune cellule en phase stationnaire ne se développe, ce qui pourrait diminuer l'efficacité de l'ensemencement. En conséquence, il convient d'agiter manuellement à plusieurs reprises les précultures en l'absence d'agitateur.

10.1.2 Préparation des cultures mères

Réhydrater le contenu d'une ampoule lyophilisée de la culture de référence des souches-hôtes dans un faible volume (environ 3 ml) de bouillon de Scholten modifié (MSB) (A.1) à l'aide d'une pipette Pasteur (7.12). Transvaser la suspension dans une fiole conique de 300 ml (7.16) contenant (50 ± 5) ml de milieu MSB. Incuber pendant (20 ± 4) h à (36 ± 2) °C en maintenant une légère agitation en utilisant un incubateur ou un bain d'eau (7.3). Ajouter 10 ml (c'est-à-dire une quantité permettant d'obtenir une concentration finale de 15 % à 20 % en volume) de

glycérol stérile (A.5) et mélanger soigneusement. Répartir ensuite dans des tubes en plastique (7.19) par portions aliquotes de 0,5 ml environ et conserver à (-70 ± 10) °C ou dans de l'azote liquide.

NOTE Il convient de conserver cette première culture de souches-hôtes comme référence dans le laboratoire.

10.1.3 Préparation des cultures d'essai

Retirer un tube de culture mère (10.1.2) du congélateur, laisser s'équilibrer à température ambiante (15 °C à 30 °C) et ensemercer dans une boîte contenant une gélose de Mc Conkey (A.6) ou un autre milieu contenant du lactose de façon à obtenir des colonies isolées. Incuber à (36 ± 2) °C pendant (20 ± 4) h. Le contenu restant dans le tube de culture mère peut être utilisé pour ensemercer plusieurs boîtes le même jour (si nécessaire), sinon il convient de le traiter comme résidu contaminé.

Ajouter (50 ± 5) ml de milieu MSB dans une fiole conique de 300 ml (7.16) et le réchauffer au moins jusqu'à température ambiante (la croissance sera plus rapide si le bouillon de culture est préalablement chauffé à une température de 37 °C). Choisir de trois à cinq colonies lactose positives à partir de la gélose de Mc Conkey et ensemercer conjointement le matériel bactérien issu de ces colonies dans la fiole contenant le milieu MSB. Incuber pendant (5 ± 1) h à (36 ± 2) °C tout en maintenant une légère agitation en utilisant un incubateur ou un bain d'eau (7.3). Ajouter 10 ml de glycérol stérile (A.5) et mélanger soigneusement. Répartir ensuite dans des tubes en plastique (7.19) par portions aliquotes de 1,2 ml environ et conserver à (-70 ± 10) °C au congélateur (7.9) pendant deux ans au plus.

NOTE S'il est prévu de réaliser un grand nombre d'essais, plusieurs fioles coniques peuvent être ensemençées en parallèle.

10.2 Étalonage des mesurages d'absorbance pour le dénombrement des micro-organismes cultivables

Retirer un tube de culture d'essai du congélateur (7.9) et laisser s'équilibrer à température ambiante (15 °C à 30 °C). Ajouter (50 ± 5) ml de milieu MSB dans une fiole conique néphélométrique (7.17) et réchauffer au moins à température ambiante (la croissance sera plus rapide si le bouillon de culture est préalablement chauffé à une température de 37 °C). Régler le spectrophotomètre sur zéro avec le tube latéral rempli. Il est également possible d'ajouter (50 ± 5) ml de milieu MSB (A.1) dans une fiole conique simple (7.16) et de transvaser une partie aliquote dans la cuve optique (7.17), dans des conditions d'asepsie. Régler le spectrophotomètre sur zéro en utilisant cette cuve. Jeter le bouillon transvasé dans les cuves pour la mesure de l'absorbance.

Ensemencer le milieu MSB avec 0,5 ml de la culture d'essai. Incuber à (36 ± 2) °C en maintenant une légère agitation en utilisant un incubateur ou un bain d'eau (7.3) pendant 3,5 h au plus. Mesurer l'absorbance toutes les 30 min comme indiqué ci-dessus et prélever un échantillon de 1 ml pour le dénombrement des bactéries cultivables, en ayant soin de réduire au minimum la durée de sortie de la fiole de l'incubateur.

Diluer les échantillons à 10^{-7} et compter les unités formant colonie (ufc) dans 1 ml des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} par la procédure normale d'ensemencement en double dans des boîtes contenant de la gélose nutritive ou de gélose de Scholten modifiée (MSA) (A.2.1). Il est également possible d'effectuer une filtration sur membrane avec des volumes de 1 ml de ces mêmes dilutions et de compter les ufc par la procédure normale de filtration sur membrane en double sur gélose nutritive ou milieu MSA (A.2.1). Incuber à (36 ± 2) °C pendant (20 ± 4) h (en utilisant 7.2). Compter le nombre total de colonies dans/sur chaque boîte contenant entre 30 et 300 colonies et calculer la concentration de ufc/ml (se reporter à l'ISO 8199 si nécessaire).

NOTE 1 Il convient de répéter cette procédure plusieurs fois (environ deux à trois fois) afin d'établir une relation entre les mesures d'absorbance et le nombre de colonies. Si suffisamment de données ont été obtenues, les essais ultérieurs pourront être basés uniquement sur les mesures d'absorbance.

NOTE 2 Si une densité cellulaire d'environ 10^8 ufc/ml n'est pas obtenue dans les 3,5 h d'incubation, il est alors également possible d'ensemencer 1 ml de la culture d'essai au lieu de 0,5 ml.

11 Mode opératoire

11.1 Préparation des précultures

Retirer un tube de culture d'essai du congélateur (7.9), laisser s'équilibrer à température ambiante (15 °C à 30 °C). Ajouter (50 ± 5) ml de milieu MSB dans une fiole conique néphélométrique (7.17) ou une fiole conique simple (7.16) et réchauffer au moins à température ambiante (la croissance sera plus rapide si le bouillon de culture est préalablement chauffé à une température de 37 °C). Régler le spectrophotomètre sur zéro comme décrit en 10.2.

Ensemencer 0,5 ml de la culture d'essai dans le milieu MSB. Incuber à (36 ± 2)°C en maintenant une légère agitation (7.3). Mesurer l'absorbance toutes les 30 min comme indiqué en 10.2. Lorsque l'absorbance atteint une concentration de l'ordre de 10⁸ ufc/ml (sur la base des données obtenues en 10.2), sortir la préculture de l'incubateur et la refroidir rapidement sur de la glace fondante. Utiliser la préculture le jour même.

NOTE Les précultures peuvent également être préparées selon le protocole suivant (moins contrôlé):

Ensemencer 0,5 ml de culture d'essai, décongelée comme précédemment décrit, dans (50 ± 5) ml de milieu MSB préalablement chauffé à température ambiante. Incuber pendant (3 ± 1) h à (36 ± 2) °C en maintenant une agitation douce. Ou bien, ensemenecer soit des colonies typiques provenant d'une boîte de milieu gélosé, soit une culture bactérienne obtenue sur gélose inclinée [après incubation à (36 ± 2) °C pendant (20 ± 4) h au maximum et conservée à (5 ± 3) °C pendant un jour au maximum] dans (50 ± 5) ml de milieu MSB préalablement chauffé à température ambiante. Incuber pendant (3 ± 1) h à (36 ± 2) °C en maintenant une agitation douce. Utiliser immédiatement ou retirer la préculture de l'incubateur et la refroidir rapidement jusqu'à 5 °C à 10 °C, en la plaçant de préférence sur de la glace fondante. Utiliser cette préculture le jour même. Quel que soit le mode opératoire de préparation, il convient que la concentration de cette préculture soit d'environ 10⁸ ufc/ml.

11.2 Mode opératoire normalisé

Préparer une préculture comme décrit en 11.1.

Faire fondre des flacons contenant 50 ml de gélose de Scholten modifiée semi-solide (ssMSA) (A.3) dans un bain d'eau bouillante (7.5) et les placer ensuite dans un bain d'eau à (45 ± 1) °C. Ajouter, dans des conditions d'asepsie, 300 µl d'une solution de chlorure de calcium (A.2.2) préalablement chauffée à température ambiante et répartir par portions aliquotes de 2,5 ml dans des tubes de culture (7.14) bouchés, placés dans un bain d'eau à (45 ± 1) °C.

Ajouter 1 ml d'échantillon initial (dilué ou concentré) préalablement chauffé à température ambiante dans chaque tube de culture. Examiner chaque aliquote au moins en double.

Ajouter 1 ml de préculture dans chaque tube de culture contenant les aliquotes d'échantillon et le milieu ssMSA, mélanger soigneusement en évitant la formation de bulles d'air et couler le contenu sur une couche de milieu MSA (A.2.3) dans une boîte de Petri de 9 cm, préalablement chauffée à température ambiante. Répartir de façon homogène, laisser se solidifier sur une surface froide, horizontale. Sécher les boîtes par incubation en laissant le couvercle à moitié ouvert si nécessaire. Couvrir ensuite les boîtes et incuber les boîtes retournées à (36 ± 2) °C pendant (18 ± 2) h. Ne pas empiler plus de 6 boîtes.

Compter, sous éclairage oblique indirect, le nombre de plages apparues sur chaque boîte dans les 4 h suivant l'incubation.

NOTE 1 S'il est prévu de réaliser un grand nombre d'essais, plusieurs fioles coniques peuvent être ensemencées en parallèle. Dans ce cas, il convient de mélanger les contenus des différentes fioles et d'homogénéiser avant analyse ou de réaliser un témoin de référence ϕ X174 pour chaque fiole ou préculture.

NOTE 2 Si nécessaire, les boîtes peuvent être lues après 6 h d'incubation. Cela peut être utile si un comptage préliminaire est requis et également si l'on suppose une importante flore interférente. Si une lecture est effectuée après 6 h, il convient de le noter lors de l'expression des résultats (article 12).

NOTE 3 Une solution de chlorure de triphényltétrazolium (voir A.3) préparée extemporanément peut être ajoutée au milieu ssMSA afin d'augmenter le contraste pour le comptage des plages.