

---

---

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

Partie 4:  
**Dénombrement des bactériophages  
infectant *Bacteroides fragilis***

iTeh STANDARD PREVIEW

*Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages —*

*(standards.iteh.ai)*

*Part 4: Enumeration of bacteriophages infecting Bacteroides fragilis*

[ISO 10705-4:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1d8cae45-d526-425b-926e-6db821f42917/iso-10705-4-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1d8cae45-d526-425b-926e-6db821f42917/iso-10705-4-2001>



**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 10705-4:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1d8cae45-d526-425b-926e-6db821f42917/iso-10705-4-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1d8cae45-d526-425b-926e-6db821f42917/iso-10705-4-2001>

© ISO 2001

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 au 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 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.ch](mailto:copyright@iso.ch)  
Web [www.iso.ch](http://www.iso.ch)

Imprimé en Suisse

**Sommaire**

	Page
1 Domaine d'application .....	1
2 Références normatives .....	1
3 Terme et définition .....	2
4 Précautions relatives à la sécurité .....	2
5 Principe .....	2
6 Réactifs .....	2
7 Appareillage .....	3
8 Cultures microbiologiques de référence .....	5
9 Échantillonnage .....	5
10 Préparation des matériaux d'essai .....	5
11 Mode opératoire .....	7
12 Expression des résultats .....	10
13 Rapport d'essai .....	11

**Annexes**

A Description générale des bactériophages infectant <i>Bacteroides fragilis</i> .....	12
B Milieux de culture et diluants.....	13
C Méthode alternative pour la préparation des précultures.....	18
D Mise en culture du bactériophage B56-3.....	19
Bibliographie.....	20

## 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 10705-4 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: Validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau*
- *Partie 4: Dénombrement des bactériophages infectant Bacteroides fragilis*

Les annexes A, B, C et D de la présente partie de l'ISO 10705 sont données uniquement à titre d'information.

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

## Partie 4:

# Dénombrement des bactériophages infectant *Bacteroides fragilis*

## 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 10705 spécifie une méthode de détection et de dénombrement des bactériophages infectant la bactérie *Bacteroides fragilis* 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. Dans le cas de faibles populations de phages, une étape de préconcentration peut s'avérer nécessaire pour laquelle une Norme internationale distincte a été élaborée. La méthode est également applicable aux extraits de coquillages.

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 évitent d'avoir à utiliser du matériel ou des équipements coûteux qui peuvent ne pas être aisément disponibles dans les pays en voie de développement. L'utilisation de ces procédures alternatives n'affectera pas les performances de la présente méthode.

iTeh STANDARD PREVIEW

## 2 Références normatives (standards.iteh.ai)

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

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

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

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

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

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

### 3 Terme et définition

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 10705, le terme et la définition suivants s'appliquent.

#### 3.1

##### **bactériophage infectant *Bacteroides fragilis***

virus des bactéries capable d'infecter certaines souches-hôtes sélectionnées de *Bacteroides fragilis* en se fixant sur la paroi cellulaire au début du processus d'infection

NOTE 1 De tels bactériophages provoquent l'apparition de plages visibles (zones de lyse) sur un tapis confluent de bactéries-hôtes cultivées dans des conditions appropriées.

NOTE 2 Une description générale des bactériophages infectant *B. fragilis* est donnée dans l'annexe A.

### 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, et qu'il convient de manipuler conformément aux procédures normales (nationales ou internationales) des laboratoires d'analyses bactériologiques. Les bactériophages infectant *Bacteroides fragilis* ne sont pathogènes ni pour l'homme ni pour l'animal, mais certains types sont très résistants à la dessiccation. Des précautions appropriées doivent être prises pour éviter tout risque de contamination croisée des échantillons, en particulier lors de l'examen ou de la manipulation 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 applicables ou utiliser une autre méthode d'efficacité égale.

Il est recommandé que le personnel en charge d'appliquer la présente méthode ait acquis ou acquière un certain niveau d'expérience dans la manipulation des bactéries anaérobies.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1d8cae45-d526-425b-926e-6db821f42917/iso-10705-4-2001>

### 5 Principe

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1d8cae45-d526-425b-926e-6db821f42917/iso-10705-4-2001>

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 plages (également identifiées par unités formant plages, ufp) par unité de volume (ufp/ml, ufp/l, etc.).

### 6 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 données dans l'annexe B. Pour toute information relative à la conservation, se reporter à l'ISO 8199, sauf indication spécifique donnée 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.

Des produits chimiques d'autres qualités peuvent être utilisés, pourvu qu'il puisse être démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

**6.2 Eau**, pour la préparation des milieux de culture, distillée dans des récipients en verre ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des bactéries dans les conditions de l'essai, et conforme à l'ISO 3696.

**6.3 Diluant**, pour faire des dilutions d'échantillon, tel qu'une solution peptonée saline ou tout autre diluant conforme à l'ISO 6887-1.

## 7 Appareillage

En dehors des appareils fournis sous forme stérile, stériliser la verrerie et les autres matériels conformément à l'ISO 8199.

Matériel et verrerie de laboratoire stériles d'usage courant en microbiologie, ou matériel à usage unique en plastique conformes à l'ISO 8199, et comprenant notamment les éléments suivants:

- 7.1 Étuve à air chaud**, pour stérilisation en chaleur sèche, et **autoclave**.
- 7.2 Incubateur** ou **bain d'eau**, maintenu thermostatiquement à  $(36 \pm 2)$  °C.
- 7.3 Incubateur** ou **bain d'eau**, maintenu thermostatiquement à  $(36 \pm 2)$  °C et équipé d'un agitateur.
- 7.4 Bain d'eau** ou **bloc chauffant**, maintenu thermostatiquement à  $(45 \pm 1)$  °C.
- 7.5 Bain d'eau** ou **dispositif équivalent**, pour faire fondre la gélose.
- 7.6 pH-mètre** et **papier indicateur de pH**.
- 7.7 Appareil de comptage**, équipé d'une source de lumière indirecte, oblique.
- 7.8 Congélateur**, maintenu thermostatiquement à  $(-20 \pm 5)$  °C.
- 7.9 Congélateur**, maintenu thermostatiquement à  $(-70 \pm 10)$  °C ou **réservoir de stockage à azote liquide**.
- 7.10 Spectrophotomètre**, équipé d'un filtre pour la gamme de longueurs d'onde allant de 500 nm à 650 nm avec une largeur de bande maximale de  $\pm 10$  nm, capable de contenir des cuves de 1 cm de trajet optique (7.21) ou des tubes en verre de Hungate (7.20) avec un bouchon en caoutchouc butyle et une capsule à vis, ou encore des tubes de culture en verre à capsule à vis.
- 7.11 Enceinte anaérobie**, ou **jarres** ou **sachets anaérobies**, ainsi que **générateurs d'anaérobiose** et **indicateurs d'anaérobiose**.
- 7.12 Réfrigérateur**, réglé à une température de  $(5 \pm 3)$  °C.
- 7.13 Boîtes de Petri**, ventilées, de 9 cm de diamètre.
- 7.14 Pipettes graduées**, de 0,1 ml, 1 ml, 5 ml et 10 ml de capacité et **pipettes Pasteur**.
- 7.15 Flacons en verre**, de volume approprié.
- 7.16 Flacons en verre à capsule à vis**, de volume approprié.
- 7.17 Tubes de culture**, avec capsules ou dispositifs équivalents.
- 7.18 Tubes de culture en verre à capsule à vis**.
- 7.19 Éprouvettes graduées**, de capacité appropriée.
- 7.20 Tubes en verre de Hungate**, avec bouchon en caoutchouc butyle et capsule à vis, ou tubes en verre à capsule à vis pouvant s'adapter sur le spectrophotomètre (voir la Figure 1).



Figure 1 — Tube en verre de Hungate avec bouchon en caoutchouc et capsule à vis

7.21 **Cuves optiques**, de 10 mm de trajet optique.

7.22 **Unités de filtration sur membrane**, pour la décontamination, de 0,2 µm de porosité, de préférence des membranes à faible pouvoir de fixation des protéines, par exemple celles composées de difluorure de polyvinylidène.

7.23 **Tubes en plastique**, bouchés, de 3 ml de capacité.

7.24 **Tubes en verre**, à capsule à vis, de 3 ml de capacité.

7.25 **Seringues et aiguilles**.

7.26 **Tampons d'ouate**.

## 8 Cultures microbiologiques de référence

La souche recommandée est *Bacteroides fragilis* RYC2056 (ATCC 700786)<sup>[1]</sup>.

Utiliser le bactériophage B56-3 (ATCC 700786-B1) infectant la bactérie *Bacteroides fragilis* RYC2056 pour la préparation des matériaux de référence (11.4).

NOTE Les souches ATCC sont disponibles auprès de American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 10705 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

## 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 qui sont résumées sur la Figure 2.

La bactérie *Bacteroides fragilis* est une anaérobie stricte. Elle ne nécessite toutefois pas une manipulation dans des conditions d'anaérobiose stricte. Il convient de procéder à l'incubation des cultures en milieux solides dans une enceinte anaérobie, ou dans des jarres ou des sachets anaérobies. En cas d'utilisation de milieux liquides, il suffit de s'assurer que les récipients sont entièrement remplis et bouchés avec une capsule à vis.

#### 10.1.2 Préparation des cultures mères

Réhydrater le contenu d'une ampoule lyophilisée de la culture de référence de la souche-hôte dans 1 ml de bouillon de culture pour l'obtention des phages infectant *Bacteroides* (BPRMB) (B.1) à l'aide d'une pipette Pasteur (7.14). Inoculer la suspension dans un tube en verre à capsule à vis de 10 ml (voir 10.1.1) contenant 10 ml de milieu BPRMB (B.1), puis incuber à  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  pendant  $(21 \pm 3)$  h. En conditions d'asepsie, tremper un tampon d'ouate stérile dans la culture et ensemercer dans une boîte contenant de la gélose de culture pour l'obtention des phages infectant *Bacteroides* (BPRMA) (B.2). Incuber dans une enceinte, une jarre ou un sachet anaérobie à  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  pendant  $(44 \pm 4)$  h.

Alternativement, si une culture inclinée est disponible, ensemercer avec un tampon d'ouate stérile directement dans une boîte contenant du milieu BPRMA (B.2). Incuber dans une enceinte, une jarre ou un sachet anaérobie à  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  pendant  $(44 \pm 4)$  h.

Inoculer les cellules (ensemencement de masse avec un tampon d'ouate stérile) de la boîte dans un tube en verre à capsule à vis de 10 ml (7.18) contenant 10 ml de milieu BPRMB (B.1). S'assurer que le tube est entièrement rempli (voir 10.1.1). En cas de croissance dense, inoculer 1/8 de la culture dans la boîte de BPRMA; en cas de croissance peu dense, utiliser la moitié de la culture dans la boîte. Incuber à  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  pendant  $(21 \pm 3)$  h.

Mélanger la culture et le cryoprotecteur (B.6) dans une proportion de 1:1 (en volume). Bien mélanger en évitant la formation de bulles. Répartir dans des tubes à capsule à vis, de préférence en verre (7.24), par portions aliquotes de 1,0 ml environ, et conserver à  $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$  ou dans de l'azote liquide pendant cinq ans au maximum.

Il convient de conserver cette première culture de souche-hôte comme référence dans le laboratoire. Il convient de vérifier la pureté de la culture avant stockage par la méthode de coloration de Gram, en contrôlant l'absence de croissance en conditions aérobies et en testant la sensibilité à un bactériophage de référence (soit B56-3).

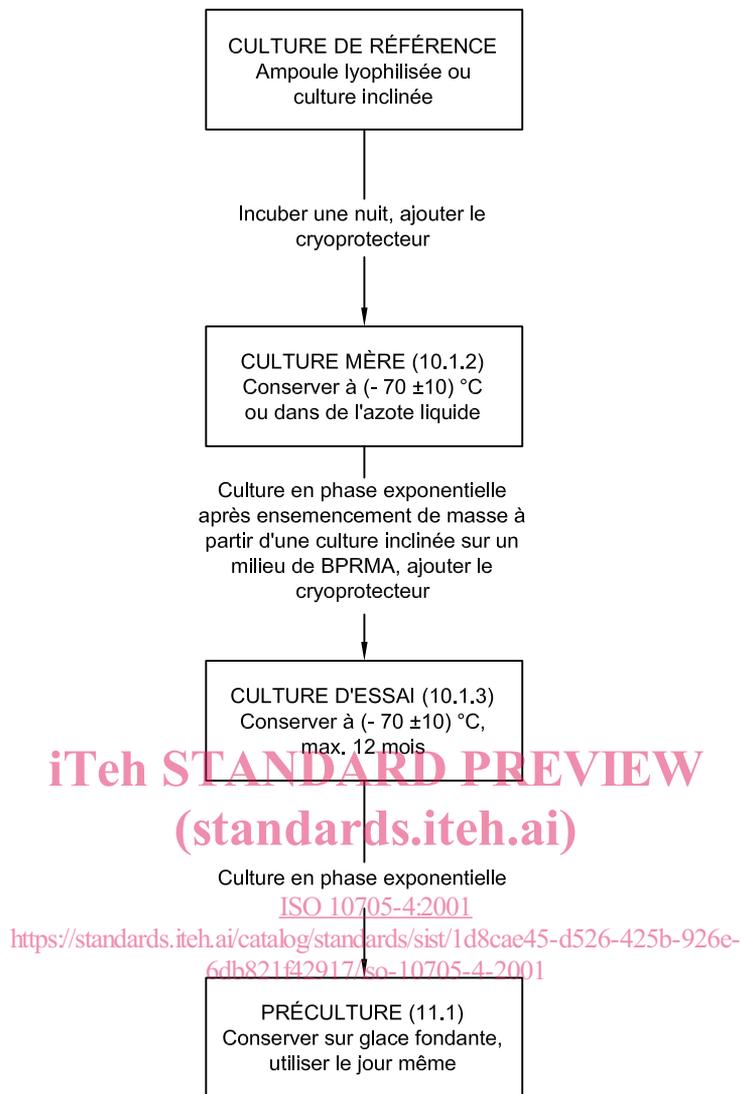


Figure 2 — Schéma pour la mise en culture et l'entretien de la souche-hôte

### 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 avec un tampon d'ouate stérile dans une boîte contenant du milieu BPRMA (B.2). Incuber dans une enceinte, une jarre ou un sachet anaérobie à (36 ± 2) °C pendant (44 ± 4) h. Inoculer le matériau cellulaire (ensemencement de masse avec un tampon d'ouate stérile) de la boîte dans un tube en verre à capsule à vis de 10 ml (voir 10.1.1) contenant 10 ml de milieu BPRMB (B.1) préchauffé. En cas de croissance dense, inoculer 1/8 de la culture dans la boîte de BPRMA; en cas de croissance peu dense, utiliser la moitié de la culture dans la boîte. Incuber à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 3) h.

Ajouter du milieu BPRMB (B.1) dans un tube pour cultures anaérobies (7.18) et réchauffer au moins à température ambiante [la croissance sera plus rapide si le bouillon de culture est préchauffé à (36 ± 2) °C]. Transférer une portion aliquote de la culture susmentionnée, sans agiter le tube et en prélevant l'aliquote dans la partie centrale du tube, dans le tube contenant le milieu BPRMB préchauffé dans une proportion culture: BPRMB de 1,5:10 (en volume). S'assurer que le tube ensemercé est entièrement rempli (voir 10.1.1). Incuber à (36 ± 2) °C pour atteindre environ  $2 \times 10^9$  ufc/ml.

Mélanger la culture d'essai et le cryoprotecteur (B.6) dans un proportion de 1:1 (en volume). Bien mélanger en évitant la formation de bulles. Répartir dans des tubes à capsule à vis, de préférence en verre (7.24), par portions aliquotes de 1,5 ml environ, et conserver à  $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$  pendant douze mois au maximum.

S'assurer que la culture n'atteint pas la phase stationnaire avant de la mélanger avec le cryoprotecteur. La stabilisation de la densité optique indiquera la fin de la phase exponentielle qui peut durer de 5 h à 8 h.

## 10.2 Étalonage des mesurages d'absorbance pour le dénombrement des bactéries-hôtes cultivables

Retirer un tube de culture d'essai (10.1.3) du congélateur (7.9) et laisser s'équilibrer à température ambiante ( $15 ^\circ\text{C}$  à  $30 ^\circ\text{C}$ ). Ajouter du milieu BPRMB (B.1) dans un tube pour cultures anaérobies (7.18) et réchauffer à température ambiante [la croissance sera plus rapide si le bouillon de culture est préchauffé à une température de  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ]. Avant de procéder à l'ensemencement, régler le spectrophotomètre sur zéro. Transférer la culture d'essai dans le milieu BPRMB (B.1) dans une proportion de 1:10 (en volume) en remplissant entièrement le tube. Les tubes pour cultures anaérobies peuvent être ensemencés/échantillonnés par ponction avec des seringues et des aiguilles stériles (7.25). Incuber à  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Mesurer l'absorbance toutes les 30 min (à l'aide du spectrophotomètre 7.10) et prélever par ponction un échantillon de 0,3 ml pour le dénombrement des bactéries cultivables, en ayant soin de réduire au minimum la durée de sortie du tube de l'incubateur.

Faire fondre 50 ml de gélose semi-solide de culture pour l'obtention des phages infectant *Bactéroides* (ssBPRMA) (B.3) (gélose de base) en plaçant les flacons dans un bain d'eau bouillante, puis dans un bain d'eau à  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ . En conditions d'asepsie, ajouter la solution d'hémine, le  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et les antibiotiques, puis ajuster la valeur du pH à  $6,8 \pm 0,5$  (B.1), conformément aux indications du Tableau B.1. Répartir des portions aliquotes de 2,5 ml dans des tubes de culture à capsule, placés dans un bain d'eau à  $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ .

Diluer les aliquotes prélevées de la culture à  $10^{-8}$  et ajouter 1 ml des dilutions à  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-8}$  dans chaque tube de 2,5 ml de ssBPRMA fondue, ceci en double. Verser sur une couche de BPRMA dans une boîte de Petri de 90 mm (B.2) préchauffée à température ambiante. Répartir uniformément, laisser se solidifier sur une surface froide horizontale et incuber les boîtes retournées dans une enceinte, une jarre ou un sachet anaérobie à  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  pendant  $(44 \pm 4)$  h. S'assurer que la procédure est exécutée dans le laps de temps le plus court possible, et que les diluants ont bien été passés à l'autoclave juste avant utilisation (pour en éliminer l'oxygène). S'assurer également que les diluants ont été refroidis à température ambiante avant utilisation. Compter le nombre total de colonies dans chaque boîte contenant entre 30 et 300 colonies et calculer le nombre d'unités formant colonie par millilitres (ufc/ml) (se reporter à l'ISO 8199 si nécessaire).

Il convient de répéter cette opération plusieurs fois (environ 4 à 5 fois) afin d'établir la 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.

## 11 Mode opératoire

### 11.1 Préparation des précultures

Retirer un tube de culture d'essai (10.1.3) du congélateur (7.9) et laisser s'équilibrer à température ambiante ( $15 ^\circ\text{C}$  à  $30 ^\circ\text{C}$ ). Ajouter du BPRMB (B.1) dans un tube à capsule à vis et réchauffer au moins à température ambiante [la croissance sera plus rapide si le bouillon de culture est préchauffé à une température de  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ]. Avant de procéder à l'ensemencement, régler le spectrophotomètre sur zéro avec le tube (voir 10.2). Transférer la culture d'essai dans le tube rempli de BPRMB (B.1) dans une proportion de 1:10 (en volume) en s'assurant que le tube est entièrement rempli (voir 10.1.1). Incuber à  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . Après 2 h, mesurer l'absorbance toutes les 30 min. Lorsque l'absorbance correspond à une densité cellulaire d'environ  $2 \times 10^8$  ufc/ml (sur la base des données obtenues en 10.2), sortir la préculture de l'incubateur; l'utiliser immédiatement ou la refroidir rapidement en la plaçant sur de la glace fondante. Utiliser la préculture dans un délai de 6 h. Les densités cellulaires comprises entre  $1 \times 10^8$  ufc/ml et  $4 \times 10^8$  ufc/ml donnent des nombres de plages similaires. Cependant, des densités cellulaires de  $1 \times 10^8$  ufc/ml ou  $2 \times 10^8$  ufc/ml donnent des plages plus importantes.

Une méthode alternative pour la préparation des précultures est donnée à l'annexe C.