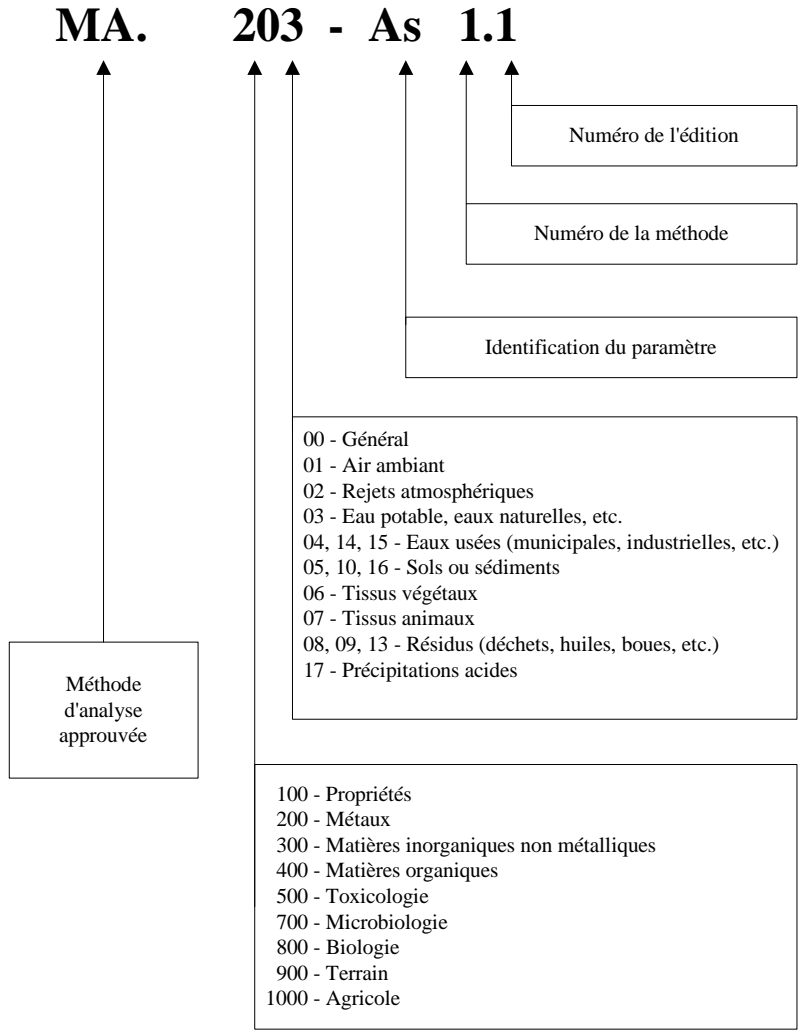


MA. 700 – Colph 1.0  
Édition : 2003-10-24

**Méthode d'analyse**

Recherche des coliphages F-spécifiques et des  
coliphages somatiques : méthode présence/absence

# Exemple de numérotation :



### Historique de la méthode

Les coliphages constituent un élément de contrôle bactériologique des eaux souterraines non désinfectées et vulnérables selon l'article 13 du *Règlement sur la qualité de l'eau potable* adopté en 2001 (Gouvernement du Québec, 2001).

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 et des coliphages somatiques dans des échantillons d'eau. Cette méthode est largement inspirée de la méthode USEPA 821-R01-030, *Method 1601: Male-specific (F<sup>+</sup>) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure* (USEPA, 2001).

Ce document constitue la première version de cette méthode.

**Reproduction et traduction, même partielles, interdites sans l'autorisation du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère de l'Environnement du Québec.**

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,  
Recherche des coliphages F-spécifiques et des coliphages somatiques : méthode présence/absence. MA. 700 – Colph 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, 2003, 29 p.



## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
1. DOMAINE D'APPLICATION	8
2. PRINCIPE ET THÉORIE	8
3. FIABILITÉ	9
3.1. Coliphages F-spécifiques	9
3.2. Coliphages somatiques	10
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	10
5. APPAREILLAGE	10
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	12
6.1. Réactifs généraux	12
6.2. Solutions d'antibiotiques	13
6.3. Milieux de culture	13
6.4. Stock de coliphage	16
6.5. Bactéries hôtes	16
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	17
7.1. Préculture bactérienne d'une nuit	17
7.2. Préparation d'une culture en phase exponentielle de croissance de la bactérie hôte	18
7.3. Procédure d'analyse en deux étapes	18
7.4. Observation des résultats	20
8. EXPRESSION DES RÉSULTATS	20
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	21
10. BIBLIOGRAPHIE	21
Annexe A – Préparation des lysats de phage MS2 et $\phi$ X174	23
Annexe B – Énumération des lysats de phage MS2 et $\phi$ X174	25
Annexe C – Étapes de la méthode	29



## 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). Ces coliphages se distinguent par le récepteur bactérien auquel ils s'attachent sur la bactérie *E. coli*. Les coliphages somatiques s'attachent à un récepteur situé sur la paroi bactérienne alors que 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 indicateur 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. En effet, l'USEPA a proposé en 2000 une nouvelle réglementation visant à réduire le risque d'infection lié à la consommation d'eau d'origine souterraine (Ground Water Rule, USEPA, 2000). Dans cette proposition, l'USEPA a fait ressortir le fait 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. Pour ces raisons, l'USEPA a recommandé l'utilisation des coliphages, en complément à *E. coli* et aux entérocoques, comme indicateurs viraux de la qualité de l'eau souterraine (USEPA, 2000) puisque ces derniers sont d'origine fécale, qu'ils peuvent se déplacer dans le sol de manière similaire aux virus entériques humains et qu'ils sont relativement simples et peu coûteux à analyser.

## 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 ou de coliphages somatiques 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 coliphage est suspectée. Cette méthode ne permet pas le dénombrement.

Les coliphages 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 déposée 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 appelle couramment à cette procédure « spot-test ». Ce résultat final peut être obtenu environ 48 h après le début de l'analyse.

Le choix de la bactérie hôte employée pour faire l'analyse est l'élément sélectif qui fait en sorte que le résultat obtenu sera soit « coliphages F-spécifiques » ou « coliphages somatiques ». La bactérie hôte *E. coli* F<sub>Amp</sub> (ATCC 700891) est utilisée pour analyser les coliphages F-spécifiques et la bactérie hôte *E. coli* CN-13 (ATCC 700609) sert à la recherche des coliphages somatiques. En conséquence, la recherche des deux groupes de coliphages à partir d'un même échantillon demande deux analyses distinctes.

La bactérie hôte *E. coli* F<sub>Amp</sub> est dérivée d'une souche non pathogène de *E. coli*, est résistante à plusieurs coliphages somatiques et est très sélective pour les coliphages F-spécifiques. 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<sub>Amp</sub> appartenaient effectivement à ce

groupe. De plus, cette souche porte deux gènes de résistance à des antibiotiques sur son chromosome. 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<sub>Amp</sub> 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, un échantillon négatif (eau stérile) de même qu'un échantillon de contrôle positif (eau stérile dans laquelle on a ajouté le coliphage F-spécifique MS2) ou un contrôle de matrice (échantillon dans lequel on a ajouté le coliphage F-spécifique 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.

Pour les coliphages somatiques, la bactérie hôte utilisée est la souche *E. coli* CN-13 (ATCC 700609). Cette dernière est un mutant de la souche *E. coli* C et elle est résistante à l'acide nalidixique. Cette souche a été sélectionnée dans le laboratoire du Dr Pierre Payment, de l'INRS-Institut Armand Frappier (Ville-de-Laval). Ici encore, la bactérie est cultivée en présence d'acide nalidixique afin d'éviter la contamination du tapis bactérien par d'autres bactéries provenant de l'échantillon. Avec chaque série d'analyses, un échantillon négatif (eau stérile) de même qu'un échantillon de contrôle positif (eau fortifiée avec le coliphage somatique ΦX174) ou un contrôle de matrice (échantillon dans lequel on a ajouté le coliphage somatique ΦX174) seront 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. FIABILITÉ

Cette méthode a été validée selon les instructions relatives à la « Démonstration initiale de la performance du laboratoire » (Initial demonstration of capability) apparaissant à la section 9.3 de la méthode USEPA 1601.

#### 3.1. COLIPHAGES F-SPÉCIFIQUES

Plusieurs essais de démonstration initiale de la performance du laboratoire ont été réalisés, en visant la détection de concentrations de plus en plus faibles en coliphages. Avec des échantillons de 100 ml à une concentration visée de 1,4 UFP/échantillon, des coliphages F-spécifiques ont été détectés dans 8 échantillons sur 10 alors que pour un volume d'échantillon de 1 000 ml et à une concentration visée de 1,3 UFP/échantillon, des coliphages F-spécifiques ont été détectés dans 7 échantillons sur 10.

### 3.2. COLIPHAGES SOMATIQUES

Deux essais de démonstration initiale de la performance du laboratoire ont été réalisés. Avec des échantillons de 100 ml à une concentration visée de 1,2 UFP/échantillon, des coliphages somatiques ont été détectés dans 10 échantillons sur 10 alors que pour un volume d'échantillon de 1 000 ml et à une concentration visée de 1,2 UFP/échantillon, des coliphages somatiques ont été détectés dans 9 échantillons sur 10. Ces échantillons avaient été préparés avec de l'eau de laboratoire.

## 4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Le prélèvement et la conservation des échantillons doivent être réalisés selon les instructions du document *Mode de prélèvement et de conservation des échantillons relatifs à l'application du Règlement sur la qualité de l'eau potable (DR-09-03)*. 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  $36\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$  et  $45\text{-}48\text{ °C}$
- 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 160 ml ou 250 ml avec bouchons vissés (« milk dilution bottle »), stérilisables
- 5.15. Unités jetable de stérilisation par filtration (porosité :  $0,22\text{ }\mu\text{m}$  et  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ )
- 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  $36\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$
- 5.24. Cylindres gradués de 100 ml, 250 ml, 1 litre et 2 litres
- 5.25. Contenant à congélation  $1\text{ °C/minute}$  « 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  $6\text{ °C}$
- 5.33. Centrifugeuse ayant la capacité d'atteindre au moins  $8000 \times g$  (exemple : Biofuge B, tête angulaire C1715-21)

5.34. Transilluminateur

5.35. Autoclave

## 6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., 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 ultra-pure. 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.* 6.1.1) 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. Ethanol 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.

### 6.2.2. Solution mère acide nalidixique 100X

**Note : L'acide nalidixique est toxique. Il est recommandé de le manipuler sous une hotte chimique ventilée et de porter des gants et des lunettes de sécurité.**

Dissoudre 1,0 g d'acide nalidixique (Sigma N4382) 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 papaique 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 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.

#### 6.3.1.1.2 Bouillon trypticase soja (TSB) avec acide nalidixique

En conditions aseptiques, ajouter 10 ml de la solution mère d'acide nalidixique (cf. 6.2.2) 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 1 000 ml d'eau. 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). Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. 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, ajouter 15 g d'agar à 1 000 ml de milieu TSB et 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 160 ml stérilisées au préalable. Ce milieu se conserve à 4 °C pendant 4 à 6 semaines.

Ajout des antibiotiques au milieu TSA 1,5 %. 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. Les antibiotiques sont ajoutés au milieu tempéré seulement. Ne pas utiliser les restes de milieu de culture qui ont déjà été fondus une fois.

##### 6.3.2.1.1 Pour la croissance des coliphages F-spécifiques utilisant *E. coli* F<sub>amp</sub> comme bactérie hôte, ajouter aseptiquement 1 ml de la solution mère ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) par 100 ml de milieu TSA 1,5 % stérile. Bien mélanger les antibiotiques avec le milieu et répartir en volumes d'environ 20 ml dans des boîtes de Pétri 100 mm × 15 mm. Ce milieu se conserve à 4 °C pendant 2 semaines.

6.3.2.1.2 Pour la croissance des coliphages somatiques utilisant *E. coli* CN-13 comme bactérie hôte, ajouter aseptiquement 1 ml de la solution mère d'acide nalidixique 100X (cf. 6.2.2) par 100 ml de milieu TSA 1,5 % stérile. Bien mélanger les antibiotiques avec le milieu et répartir en volumes d'environ 20 ml dans des boîtes de Pétri 100 mm × 15 mm. Ce milieu se conserve à 4 °C pendant 2 semaines.

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

Ajouter 7 g d'agar à 1 000 ml de milieu TSB. 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 160 ml stérilisées au préalable. Le milieu se conserve à 4 °C à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.

Ajout des antibiotiques au milieu TSA 0,7 %. 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. Les antibiotiques sont ajoutés au milieu tempéré seulement. Ne pas utiliser les restes de milieu de culture qui ont déjà été fondus une fois.

6.3.2.2.1 TSA 0,7 %. « Top agar » avec ampicilline/streptomycine, pour l'énumération du coliphage MS2 avec la bactérie *E. coli* F<sub>amp</sub>.

Pour préparer 100 ml de milieu TSA 0,7 % (cf. 6.3.2.2), ajouter 1 ml de la solution mère ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) en conditions aseptiques. 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.

6.3.2.2.2 TSA 0,7 %. « Top agar » avec acide nalidixique, pour l'énumération du coliphage  $\phi$ X174 *E. coli* CN-13.

Pour préparer 100 ml de milieu TSA 0,7 % (cf. 6.3.2.2), ajouter 1 ml de la solution mère d'acide nalidixique 100X (cf. 6.2.2) en conditions aseptiques. 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.

6.3.2.3. Gélouses pour les « spot tests ». Ces gélouses sont utilisées dans la procédure d'analyse en deux étapes (cf. 7.3.2). Les gélouses 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 160 ml stérilisées au préalable. Le milieu se conserve à 4 °C à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.
- 6.3.2.3.2 Une culture bactérienne (*E. coli* F<sub>amp</sub> pour les coliphages F-spécifiques; *E. coli* CN-13 pour les coliphages somatiques) en phase exponentielle de croissance doit être préparée à l'avance (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. 7.2) et 1 ml d'antibiotiques (solution mère ampicilline/streptomycine 100X pour les coliphages F-spécifiques; solution mère d'acide nalidixique 100X pour les coliphages somatiques). 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 « spot tests ».

#### 6.4. STOCK DE COLIPHAGE

- 6.4.1. Phage MS2 (ATCC 15597-B1). Coliphage F-spécifique. La procédure d'amplification et de conservation des coliphages est décrite à l'annexe A.

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

- 6.4.2. Phage ΦX174 (ATCC 13706-B1). Coliphages somatiques. La procédure d'amplification et de conservation des coliphages est décrite à l'annexe A.

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

#### 6.5. BACTÉRIES HÔTES

La souche bactérienne qui doit obligatoirement être utilisée dans la méthode des coliphages F-spécifiques est la bactérie hôte *E. coli* F<sub>amp</sub> (ATCC 700891), tandis que la

souche bactérienne qui doit obligatoirement être utilisée pour les coliphages somatiques est la bactérie hôte *E. coli* CN-13 (ATCC 700609).

- 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 % contenant les antibiotiques appropriés (cf. 6.3.2.1.1 et 6.3.2.1.1). Incuber les géloses pendant une nuit (18-24 heures) à 36 °C, repiquer une colonie isolée dans un bouillon TSB contenant les antibiotiques appropriés (cf. 6.3.1.1.1 et 6.3.1.1.2) 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 l'application des contrôles de la qualité 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.

### 7.1. PRÉCULTURE BACTÉRIENNE D'UNE NUIT

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.

***Pour l'analyse des coliphages F-spécifiques :***

- 7.1.1. Dans une fiole Erlenmeyer stérile 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<sub>amp</sub> (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.

***Pour l'analyse des coliphages somatiques :***

- 7.1.2. L'analyse se fait avec la bactérie hôte *E. coli* CN-13 (cf. 6.5) et une solution d'antibiotique d'acide nalidixique 100X (cf. 6.2.2).

## 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 de 125 ml, mélanger 25 ml de milieu TSB 1X, 250 µl de la solution mère d'antibiotiques (ampicilline/streptomycine 100X pour les coliphages F-spécifiques; acide nalidixique 100X pour les coliphages somatiques) et 250 µl de la préculture bactérienne d'une nuit (cf. 7.1) (*E. coli* F<sub>amp</sub> pour les coliphages F-spécifiques; *E. coli* CN-13 pour les coliphages somatiques). 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 (DO<sub>520</sub>) indique que la bactérie hôte est en phase exponentielle de croissance. Si la DO<sub>520</sub> n'est pas dans les limites recherchées, incuber de nouveau et lire la DO<sub>520</sub> toutes les 30 minutes jusqu'à l'atteinte d'une valeur se situant entre 0,1 et 0,5.

Refroidir à 4 °C pour ralentir la multiplication cellulaire. La suspension se conserve 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 des coliphages F-spécifiques :***

7.3.1.2. Dans une bouteille stérile en verre de 160 ml, ajouter 100 ml de l'échantillon, 1,25 ml de MgCl<sub>2</sub> 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<sub>amp</sub> (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. Blanc de méthode

Dans une bouteille stérile en verre de 160 ml, ajouter 100 ml d'eau déminéralisée stérile, 1,25 ml de MgCl<sub>2</sub> 80X (4 M) (cf. 6.1.4), 0,5 ml de la culture en phase exponentielle de la bactérie hôte *E. coli* F<sub>amp</sub> (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 °C ± 1 °C, sans agitation, pendant 16 à 24 heures.

7.3.1.4. Contrôle positif ou contrôle de la matrice : Dans une bouteille stérile en verre de 160 ml, ajouter 100 ml de l'échantillon (contrôle de matrice) ou 100 ml d'eau déminéralisée stérile, 1,25 ml de MgCl<sub>2</sub> 80X (4 M) (cf. 6.1.4), 0,5 ml de la culture en phase exponentielle de la bactérie hôte *E. coli* F<sub>amp</sub> (cf. 7.2), 5 ml 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<sup>-X</sup> du phage 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 °C ± 1 °C, sans agitation, pendant 16 à 24 heures.

#### ***Analyse des coliphages somatiques :***

7.3.1.5. Répéter les étapes 7.3.1.2 à 7.3.1.4 en utilisant la bactérie hôte *E.coli* CN-13 (cf. 7.2) et une solution mère d'antibiotiques 100X d'acide nalidixique (cf. 6.2.2). Le contrôle positif et le contrôle de la matrice sont faits avec le coliphage φX174 (cf. 6.4.2).

#### ***Analyse d'échantillons de 1 000 ml :***

7.3.1.6. Pour l'analyse d'échantillons de 1 000 ml de coliphages F-spécifiques et de coliphages somatiques par la technique de présence/absence, répéter les étapes 7.3.1.1 à 7.3.1.5 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 »

#### ***Analyse 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.

Immédiatement, pipeter un volume de 10 µl du surnageant et le déposer sur une gélose enrichie par la bactérie hôte *E. coli* F<sub>amp</sub> (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.

#### ***Analyse des coliphages somatiques :***

7.3.2.3. Répéter les étapes 7.3.2.1 et 7.3.2.2 en utilisant les échantillons enrichis par la bactérie hôte *E. coli* CN-13 (cf. 6.3.2.3).

#### **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.

L'utilisation d'un transilluminateur est recommandée pour l'observation des résultats.

## **8. EXPRESSION DES RÉSULTATS**

Huit possibilités de résultats peuvent survenir lors de l'analyse d'échantillons avec cette méthode selon le type de coliphage et 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

Coliphages somatiques : présence dans 100 ml

Coliphages somatiques : présence dans 1 litre

Coliphages somatiques : absence dans 100 ml

Coliphages somatiques : absence dans 1 litre

## 9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Le blanc de méthode effectué au moment de l'analyse doit 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 l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », doivent être respectées.

## 10. BIBLIOGRAPHIE

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie, DR-12-SCA-02, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Modes de prélèvement et de conservation des échantillons relatifs à l'application du Règlement sur la qualité de l'eau potable, DR-09-03, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

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.

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

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC, Règlement sur la qualité l'eau potable, Gazette officielle du Québec. Partie 2, Lois et règlements, 133<sup>e</sup> année, n° 24, p. 3561-3573, 13 juin 2001.

USEPA, National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule; Proposed Rule. Federal Register 40 CFR, Parts 141 and 142, 2000.

USEPA, Method 1601: Male-specific (F<sup>+</sup>) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichement Procedure, USEPA 821-R01-030, 2001.



## Annexe A – Préparation des lysats de phage MS2 et $\phi$ X174

### A.1 Amplification du phage

#### ***Pour l'amplification du coliphage MS2 :***

A.1.1 Dans un flacon Erlenmeyer de 125 ml, ajouter 250  $\mu$ l d'une préculture bactérienne *E. coli* F<sub>amp</sub> (cf. 7.1) dans 25 ml de milieu TSB 1X (cf. 6.3.1.1). Ajouter 315  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 80X (4 M) (cf. 6.1.4), 250  $\mu$ l d'une solution d'antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) et 100  $\mu$ l d'un lysat du coliphage MS2 (cf. 6.4.1). Incuber à 36 °C  $\pm$  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 du coliphage MS2. Des cellules hôtes qui sont sans *pilus* et qui ne sont donc pas infectées par le coliphage MS2 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  $\mu$ m (cf. 5.15). Conserver le filtrat; il constitue le lysat de phage.

#### ***Pour l'amplification du coliphage $\phi$ X174:***

A.1.3 Pour l'amplification du coliphage  $\phi$ X174, répéter les étapes A.1.1 et A.1.2 en utilisant la bactérie hôte *E. coli* CN-13 (cf. 6.5) et une solution mère d'antibiotique d'acide nalidixique 100X (cf. 6.2.2).

La réussite de l'amplification du coliphage  $\phi$ X174 s'observe par un éclaircissement complet du bouillon de culture après qu'une augmentation de la turbidité ait été observée.

### A.2 Congélation du lysat du phage MS2 et du lysat du phage $\phi$ X174

A.2.1 Dans un flacon Erlenmeyer stérile, ajouter 100  $\mu$ l de glycérol stérile (cf. 6.1.5) à 900  $\mu$ l du lysat de phage (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 °C, (cf. 5.25) pour congélation rapide à -80 °C).



## Annexe B – Énumération des lysats de phage MS2 et $\phi$ X174

### *Énumération du lysat du phage MS2 :*

- B.1 La procédure en bicouche est utilisée pour l'énumération du lysat du phage MS2, qui sert pour effectuer le contrôle positif et pour valider la méthode.
- B.2 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.2). 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 du phage MS2 (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.3 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<sub>amp</sub> et avec une dilution du lysat du phage MS2. 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 du phage MS2 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.3.1 Préparation des tubes de « top agar »

Déposer les tubes de « top agar » (TSA 0,7 %) auxquels les antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.3.2.2) ont été ajoutés dans une 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. Les tubes de « top agar » doivent contenir la solution ampicilline/streptomycine 100X (cf. 6.2.1) pour la croissance de *E. coli* F<sub>amp</sub>.

- B.3.2 Préparation des milieux pour l'énumération du phage MS2
  - B.3.2.1 En conditions aseptiques, inoculer un tube de « top agar », maintenu au bain-marie et contenant les antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X (cf. B.3.1) avec 100 µl de la bactérie hôte *E. coli* F<sub>amp</sub> en phase exponentielle de croissance (cf. 7.2).
  - B.3.2.2 Ajouter immédiatement 500 µl du lysat du phage non dilué (10<sup>0</sup>) (cf. annexe A). Mélanger doucement par rotation du tube dans la paume de la main.
  - B.3.2.3 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 10<sup>0</sup> (non dilué). Répéter les étapes B.3.2 à B.3.2.3 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.3.3 Préparation du blanc de méthode
  - B.3.3.1 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<sub>amp</sub> en phase exponentielle de croissance (cf. 7.2).
  - B.3.3.2 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.3.3.3 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.3.4 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.3.5 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.3.6.
- B.3.6 Observation des résultats : énumération du lysat de phage (UFP/ml)
  - B.3.6.1 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.3.6.2 Additionner le nombre d'UFP pour chaque dilution (additionner les deux duplicata : 500 µl + 500 µl = 1 ml) en excluant les dilutions ayant donné TNC ou zéro comme résultat (voir équation dans la section B.3.6.5).

- B.3.6.3 Additionner les volumes d'échantillons non dilués utilisés pour l'ensemble des replica et l'ensemble des dilutions ayant des résultats compris entre 30 et 300 UFP (voir équation dans la section B.3.6.5).
- B.3.6.4 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.3.6.5).
- B.3.6.5 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.

#### ***Énumération du lysat du phage $\phi$ X174 :***

- B.4 Pour l'énumération du phage  $\phi$ X174, répéter les étapes B.1 à B.3.5 en remplaçant le phage MS2 par le phage  $\phi$ X174 (cf. 6.4.2), en remplaçant la bactérie hôte *E. coli* F<sub>amp</sub> par la bactérie hôte *E. coli* CN-13 (cf. 7.2) et en remplaçant les antibiotiques ampicilline/streptomycine 100X par la solution d'antibiotique d'acide nalidixique 100X (cf. 6.2.2).

Les limites de quantification (inférieure et supérieure) pour l'énumération du phage sont respectivement 30 et 100 UFP par boîte de Pétri. Lorsque le dénombrement excède la limite de quantification, inscrire TNC comme résultat.



## Annexe C – Étapes de la méthode

