

NORME
INTERNATIONALE

ISO
10712

Première édition
1995-12-15

**Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la
croissance de *Pseudomonas putida* (essai
d'inhibition de la multiplication des cellules
de *Pseudomonas*)**

(standards.iteh.ai)

*Water quality — Pseudomonas putida growth inhibition test
(Pseudomonas cell multiplication inhibition test)*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7b6e04e2-34fd-443a-8752-882caa7841a0/iso-10712-1995>



Numéro de référence
ISO 10712:1995(F)

Avant-propos

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

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

La Norme internationale ISO 10712 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Les annexes A et B de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

ITIH STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 10712:1995

présenté sur <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/34fd-443a-8752-882caa7841a0/iso-10712-1995>

© ISO 1995

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

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

Imprimé en Suisse

Introduction

La bactérie *Pseudomonas putida* est utilisée comme organisme représentatif des micro-organismes hétérotrophes présents dans l'eau douce.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 10712:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7b6e04e2-34fd-443a-8752-882caa7841a0/iso-10712-1995>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10712:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7b6e04e2-34fd-443a-8752-882caa7841a0/iso-10712-1995>

Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas putida* (essai d'inhibition de la multiplication des cellules de *Pseudomonas*)

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode d'essai pour la détermination de l'effet inhibiteur de l'eau de surface, de l'eau souterraine et des eaux usées vis-à-vis de *Pseudomonas putida*.

La méthode n'est pas applicable aux échantillons de forte coloration, ou contenant des matières non dissoutes ou volatiles ou des substances réagissant avec le milieu nutritif ou qui subissent des changements pendant l'essai (par exemple par précipitation, ou de gradation biochimique ou photochimique), et peuvent donner des résultats faux, et/ou affecter la reproductibilité.

La méthode permet également d'expérimenter les substances solubles dans l'eau (voir annexe A).

2 Référence normative

La norme suivante contient des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 7027:1990, *Qualité de l'eau — Détermination de la turbidité*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 multiplication; croissance: Augmentation du nombre de cellules pendant la durée de l'essai.

3.2 relation concentration/effet: Relation entre l'inhibition de la multiplication des cellules et la concentration de l'échantillon d'essai.

NOTE 1 Cette relation est représentée graphiquement en plaçant les valeurs d'inhibition sur l'axe des ordonnées, et celles de la concentration de l'échantillon sur l'axe des abscisses.

3.3 concentration réelle (CE): Concentration de l'échantillon soumis à l'essai donnant une valeur calculée ou interpolée d'inhibition de la multiplication de cellules de *Pseudomonas putida* dans les $16 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$, comparée avec le lot témoin.

Les concentrations de l'échantillon soumis à l'essai (CE10 et CE50) sont déterminées à partir de la relation concentration/effet (3.2) à partir de laquelle la multiplication des cellules est inhibée de 10 %, respectivement 50 %, par rapport au lot témoin.

3.4 culture mère: Culture bactérienne obtenue à partir de la souche de collection du laboratoire et destinée à fournir un inoculum pour la préculture du mode opératoire.

3.5 préculture: Culture bactérienne destinée à acclimater la bactérie d'essai aux conditions de l'essai et à fournir un nombre approprié de bactéries ayant une croissance exponentielle comme inoculum pour la culture d'essai.

3.6 culture d'essai: Milieu d'essai (3.9) ensemencé.

3.7 inoculum: Suspension de bactéries destinée à ensemencer une solution nutritive.

3.8 solution nutritive: Solution aqueuse de substances nutritives nécessaires à la croissance bactérienne.

3.9 milieu d'essai: Mélange d'échantillon soumis à l'essai, d'eau de dilution et de solution nutritive (sans inoculum).

3.10 échantillon: Eau de surface, eau souterraine ou eau usée à expérimenter.

3.11 échantillon d'essai: Échantillon, après toutes les étapes préparatoires telles que homogénéisation, ajustement du pH, filtration, centrifugation.

3.12 témoin: Mélange d'eau de dilution, de solution nutritive et d'inoculum (sans échantillon d'essai).

3.13 unités néphélométriques formazine, FNU: Unités de turbidité formazine. Densité optique d'une suspension de cellules bactériennes à une longueur d'onde de 436 nm, mesurée en unités néphélométriques formazine conformément à l'ISO 7027.

4 Principe

Détermination de l'effet inhibiteur d'un échantillon sur *Pseudomonas putida* par mesurage de la croissance cellulaire de diverses dilutions de l'échantillon d'essai, par rapport à la croissance cellulaire obtenue pour une culture réalisée dans les mêmes conditions mais qui ne contient pas l'échantillon d'essai.

Détermination de la concentration cellulaire par densité optique après une période d'essai de $16 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$.

L'évaluation se fait sur la base des concentrations de l'échantillon d'essai pour lesquelles la multiplication des cellules est inhibée de 10 % et de 50 % dans les $16 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$.

5 Réactifs

Utiliser des réactifs de qualité analytique et de l'eau déionisée ou de l'eau de pureté équivalente.

5.1 Organisme d'essai

Pseudomonas putida, bactérie aérobie Gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae*; possédant des flagelles (de $0,7 \mu\text{m}$ à $1,1 \mu\text{m}$ de diamètre, et de

$2,0 \mu\text{m}$ à $4,0 \mu\text{m}$ de longueur) à flagellation polaire. Elle est présente partout dans le sol et l'eau de surface. Sa température de croissance optimale se situe entre $25 \text{ }^\circ\text{C}$ et $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

NOTE 2 Les deux souches suivantes conviennent pour l'essai:

a) souche MIGULA, Berlin 33/2 (DSM 50026)

Cette souche est disponible à partir de la collection suivante:

Collection allemande de micro-organismes
Mascheroder Weg 1b
D-38124 Braunschweig
Allemagne

b) souche NCIB 9494

Cette souche est disponible à partir de la collection suivante:

Torry Research Station
P.O. Box 31
Aberdeen, Royaume-Uni

Toute autre souche de sensibilité équivalente peut être utilisée.

5.2 Acide chlorhydrique, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

5.3 Solution d'hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

Des solutions plus diluées ou plus concentrées d'acide ou de base peuvent être utilisées pour ajuster le pH si nécessaire.

5.4 Solutions nutritives

Préparer les solutions mères I à IV (voir 5.4.1 à 5.4.4), puis les stériliser, par exemple à $121 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 10 min.

Les solutions peuvent être conservées pendant plusieurs semaines dans un réfrigérateur à une température comprise entre $2 \text{ }^\circ\text{C}$ et $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.4.1 Solution I

Dissoudre les composants suivants dans de l'eau et compléter à 500 ml avec de l'eau.

- 10,0 g de nitrate de sodium (NaNO_3);
- 2,40 g d'hydrogénophosphate de dipotassium (K_2HPO_4);
- 1,20 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4);

- 1,0 g d'extrait de levure.

5.4.2 Solution II

Dissoudre les composants suivants dans de l'eau et compléter à 500 ml avec de l'eau.

- 10,0 g de nitrate de sodium (NaNO_3);
- 2,40 g d'hydrogénophosphate de dipotassium (K_2HPO_4);
- 1,20 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).

5.4.3 Solution III, solution de glucose

Dissoudre le composant suivant dans de l'eau et compléter à 500 ml avec de l'eau.

- 40,0 g de D(+)-glucose monohydraté ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pour utilisation biochimique et microbiologique.

5.4.4 Solution IV, solution de sulfate de magnésium-citrate de fer(III)

Dissoudre les composants suivants dans de l'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

- 4,0 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- 0,01 g de citrate de fer(III) en granulés.

NOTE 3 Afin de réduire le nombre d'étapes nécessaires, la solution I peut être mélangée à la solution III, après stérilisation, pour le mode opératoire décrit en 5.5 et 8.1, et la

solution II à la solution III, pour le mode opératoire décrit en 8.2.

5.5 Culture mère (voir tableau 1)

5.5.1 Milieu nutritif de la culture mère (gélose inclinée)

Dissoudre 18 g d'agar (qualité de haute pureté pour microbiologie) dans de l'eau, en chauffant.

Ajouter 50 ml de la solution I (5.4.1), 125 ml de la solution III (5.4.3), 100 ml de la solution IV (5.4.4) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

Lorsqu'il est encore liquide, répartir le milieu nutritif en volumes de 6 ml à 10 ml dans les tubes de culture, boucher les tubes et les stériliser pendant 10 min à 121 °C.

Laisser le milieu nutritif se solidifier en position inclinée et conserver à une température comprise entre 2 °C et 4 °C.

5.5.2 Maintien de la culture mère

Conserver les cultures mères de la souche d'essai *Pseudomonas putida* dans des tubes de culture contenant une gélose inclinée sur le milieu nutritif solide des cultures mères (5.5.1).

Faire de nouvelles cultures mères à intervalles d'une semaine, pour préserver la souche d'essai.

Incuber les cultures mèresensemencées pendant 24 h à 25 °C ± 4 °C (et conserver à 25 °C ± 4 °C) dans ce but. À long terme, la remise en culture d'une souche peut provoquer des modifications de la sensibilité des organismes d'essai. Dans ce cas, utiliser une nouvelle culture de la souche d'essai.

Tableau 1 — Concentrations finales dans les différents milieux

Substances nutritives	Culture mère (5.5)	Préculture (8.1)	Culture d'essai (8.2)
	mg/l	mg/l	mg/l
NaNO_3	1 000	500	500
K_2HPO_4	240	120	120
KH_2PO_4	120	60	60
Extrait de levure	100	50	—
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 000	2 000	2 000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400	200	200
Citrate de fer(III)	1,0	0,5	0,5
Agar	18 000	—	—

NOTE 4 Un pigment vert peut être produit après incubation pendant 24 h. Cela est normal et n'indique pas une contamination.

6 Appareillage et matériel

L'appareillage qui doit entrer en contact avec l'échantillon d'essai pendant la préparation du milieu nutritif ou pendant la période d'essai doit être en verre ou tout autre matériau chimiquement inerte.

Tout le matériel et les bouchons en verre entrant en contact avec les cultures d'essai doivent être stérilisés avant emploi, s'ils n'ont pas été stérilisés en même temps que les solutions nutritives.

6.1 Spectromètre ou turbidimètre

L'état de croissance des cultures peut également être déterminé par une méthode différente si celle-ci a une sensibilité suffisante et s'il est établi une corrélation acceptable avec la turbidimétrie.

6.2 Microscope, de grossissement $\times 100$ au minimum.

6.3 pH-mètre.

6.4 Enceinte à température contrôlée.

6.5 Fioles de culture.

6.6 Autoclave.

7 Traitement des échantillons

Soumettre à l'essai les échantillons dès que possible après le prélèvement et la préparation.

Si cela n'est pas possible, conserver les échantillons en les refroidissant (jusqu'à deux jours à une température de 2 °C à 4 °C) ou en les congelant (jusqu'à deux semaines à -18 °C). Ne conserver les échantillons que dans des cas exceptionnels, la toxicité de l'échantillon pouvant être modifiée au cours du temps.

Bien agiter l'échantillon et, si nécessaire, homogénéiser avant de préparer le milieu d'essai.

Mesurer le pH de l'échantillon.

En général, l'essai est effectué sans ajustement du pH. Si des indications montrent qu'un effet inhibiteur est causé uniquement par un pH extrême, effectuer un essai supplémentaire dans lequel le pH sera ajusté à 7,4. Dans ce cas, ajuster le pH de l'échantillon à

$7,4 \pm 0,3$ avec de l'acide chlorhydrique (5.2) ou avec une solution d'hydroxyde de sodium (5.3); veiller à modifier aussi peu que possible la concentration de l'échantillon d'eau. Si nécessaire, par exemple pour les échantillons contaminés à un niveau élevé par des microbes, ils peuvent être stérilisés par filtration, mais cela peut entraîner des modifications de l'effet toxicologique de l'échantillon.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de la préculture (3.5)

8.1.1 Préparation du milieu de préculture

Verser 900 ml d'eau stérilisée dans un récipient stérilisé ou stériliser 900 ml d'eau dans un récipient approprié.

Ajouter 25 ml des solutions I et III (5.4.1 et 5.4.3) et 50 ml de la solution IV (5.4.4).

NOTE 5 Le pH du milieu de préculture est de $7,2 \pm 0,2$.

Répartir le milieu de préculture dans les fioles de culture dans des conditions stériles (par exemple par portions de 90 ml dans des fioles coniques de 250 ml de capacité nominale).

8.1.2 Préparation de l'inoculum pour la préculture

Préparer l'inoculum pour la préculture à partir de la culture mère âgée de 7 jours (5.5.2).

Rincer les cellules de la gélose inclinée (5.5.1) avec le milieu stérile de préculture (8.1.1).

Diluer cette suspension de cellules avec le milieu stérile de préculture pour obtenir, dans la préculture, une turbidité calculée de 10 FNU.

EXEMPLE

Si le volume final de la préculture doit être de 100 ml, la turbidité de la suspension de cellules doit être ramenée par dilution à 100 FNU, parce que 10 ml de cette suspension de cellules seront ajoutés aux 90 ml du milieu de préculture (8.1.1).

NOTES

6 La densité optique de la suspension cellulaire bactérienne est déterminée conformément à la section 3 de l'ISO 7027:1990, par mesurage photoélectrique de l'atténuation de la lumière transmise (3.4 de l'ISO 7027) ou par mesurage de la lumière diffusée (3.3 de l'ISO 7027). Seules les densités optiques $< 0,4$ peuvent être utilisées pour l'étalonnage en FNU. Pour les densités optiques $> 0,4$, il

convient que la suspension soit diluée à des valeurs de densité optique comprises entre 0,1 et 0,4.

7 Au lieu des mesurages de FNU, d'autres unités de turbidité peuvent être utilisées. Par exemple:

$$A_{610} = 0,02 \text{ (10 FNU)}$$

$$A_{610} = 0,2 \text{ (100 FNU)}$$

$$A_{610} = 0,1 \text{ (50 FNU)}$$

où A_{610} est l'absorbance à 610 nm.

8.1.3 Incubation et emploi des précultures

Ajouter l'inoculum (8.1.2) au milieu de préculture (8.1.1).

Boucher les fioles de culture (6.5) à l'aide de bouchons poreux stériles.

Incuber la préculture à la même température que pour l'essai (8.3) pendant $5 \text{ h} \pm 0,5 \text{ h}$ et garder les bactéries en suspension (par exemple en agitant). Éviter les dépôts sur les parois des fioles (par exemple en agitant).

Lorsque l'incubation est achevée, diluer la suspension bactérienne avec le milieu de la culture d'essai (voir tableau 1) afin de donner une turbidité spécifique calculée (par exemple 50 FNU).

NOTE 8 Il convient de prélever l'inoculum de la préculture durant la phase de croissance exponentielle. Il y a lieu de veiller à ce que les bactéries ne se présentent pas sous forme de chaîne. Ce phénomène peut être contrôlé par examens microscopiques. Si des filaments sont observés, il convient de préparer une nouvelle culture.

8.2 Préparation des cultures d'essai

Choisir les étapes de dilution (par exemple voir tableau 2) et préparer une série de dilutions de l'échantillon d'essai (3.11) avec de l'eau déionisée (article 5).

Ajuster le volume final requis en fonction des récipients utilisés pour la culture d'essai, par exemple 100 ml de volume final dans des fioles de culture de 250 ml. Dans l'exemple suivant, il s'agit d'un volume final de 100 ml, les cultures d'essai contiennent donc les volumes spécifiés en millilitres.

Répartir les solutions II, III et IV (5.4), l'eau de dilution et l'échantillon d'essai dans les fioles de culture.

Puis ajouter l'inoculum, ajusté à une turbidité spécifique conformément à 8.1.2, afin de donner une concentration initiale calculée de l'inoculum égale à 5 FNU dans la culture d'essai.

Boucher les fioles avec des bouchons stériles perméables à l'air ou avec des bouchons en aluminium.

La plus forte concentration qui puisse être utilisée est une culture d'essai contenant 80 % de l'échantillon d'essai.

Chaque étape de dilution devrait, si possible, comprendre trois lots en parallèle.

Le nombre des lots en parallèle est fonction de la signification choisie, du niveau de confiance requis et de l'écart attendu entre les mesurages individuels.

NOTE 9 Une réduction du nombre des lots en parallèle peut se justifier si des mesurages supplémentaires pour des gradients de concentrations plus fins sont effectués.

Si l'échantillon d'essai est trouble ou coloré, préparer une série de dilutions ne contenant pas d'inoculum. Dans ce cas, l'inoculum est remplacé par un volume correspondant du milieu de préculture (8.1.1).

8.3 Incubation

Incuber la culture d'essai et le témoin à une température constante de $23 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ dans l'obscurité.

Durant l'essai, les écarts de température ne doivent pas dépasser $\pm 1 \text{ °C}$.

Maintenir les bactéries en suspension (par exemple en agitant) et éviter tout dépôt sur les parois des fioles.

8.4 Mesurages

Déterminer immédiatement après une période d'incubation de $16 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$, les valeurs de turbidité après homogénéisation par agitation.

NOTE 10 Si un changement de couleur survient pendant la multiplication des cellules dû à une réaction avec l'échantillon d'essai, il convient d'éliminer cet effet. Si cet effet ne peut être éliminé en choisissant une autre longueur d'onde pour le mesurage, le mesurage effectué sur une culture d'essai de même dilution, clarifiée par filtration, peut être choisi comme mesurage de blanc. En cas d'utilisation d'un photomètre à faisceau unique, il convient de déduire cette valeur de la mesure obtenue pour l'échantillon.