
**Qualité de l'eau — Détermination de l'effet
inhibiteur d'échantillons d'eau sur la
luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de
bactéries luminescentes) —**

**Partie 3:
Méthode utilisant des bactéries lyophilisées
(standards.iteh.ai)**

*Water quality — Determination of the inhibitory effect of water samples on
the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) —*

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/55ba2004-d2e0-46a8-8ccf-
ca5439c651c7/iso-11348-3-1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/55ba2004-d2e0-46a8-8ccf-ca5439c651c7/iso-11348-3-1998)
Part 3: Method using freeze-dried bacteria



Sommaire

	Page
1 Domaine d'application.....	1
2 Références normatives.....	1
3 Principe.....	1
4 Interférences.....	2
5 Réactifs et matériaux.....	2
6 Appareillage.....	3
7 Échantillonnage et prétraitement des échantillons.....	3
8 Mode opératoire.....	4
9 Évaluation.....	5
10 Expression des résultats.....	7
11 Critères de validité.....	9
12 Fidélité.....	9
13 Rapport d'essai.....	9
Annexe A Méthode de correction de la couleur.....	10
Annexe B Niveau de dilution D — Préparation des séries de dilution.....	13
Annexe C Données de fidélité.....	14

© ISO 1998

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
Internet iso@iso.ch

Imprimé en Suisse

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 11348-3 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

L'ISO 11348 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de Vibrio fischeri (Essai de bactéries luminescentes)*:

- *Partie 1: Méthode utilisant des bactéries fraîchement préparées*
- *Partie 2: Méthode utilisant des bactéries déshydratées*
- *Partie 3: Méthode utilisant des bactéries lyophilisées*

Les annexes A, B et C de la présente partie de l'ISO 11348 sont données uniquement à titre d'information.

Introduction

Les mesurages effectués conformément à la présente partie de l'ISO 11348 peuvent être réalisés au moyen de bactéries fraîchement préparées, de même qu'avec des préparations bactériennes lyophilisées ou déshydratées.

Les travaux de normalisation menés par le DIN NAW WI et l'ISO/TC 147/SC 5 WG 1 ont montré que, dans certains cas particuliers, ces différentes techniques pouvaient donner des résultats différents, notamment lorsque les échantillons contiennent des métaux lourds.

Une telle variété dans la sensibilité résulte des différences de composition des milieux utilisés pour la préparation de bactéries lyophilisées ou déshydratées. Ces milieux protecteurs influent sur la biodisponibilité des produits toxiques et/ou sur l'émission de lumière des bactéries luminescentes. Cela signifie que l'origine et le type de préparation doivent être pris en considération lors de l'interprétation des résultats. Cette prise en compte s'avère parfois difficile, du fait que les bactéries lyophilisées et déshydratées peuvent être obtenues auprès de fournisseurs différents. Il peut donc en résulter une méconnaissance des détails de la composition ou l'impossibilité que celle-ci puisse être modifiée par l'utilisateur.

Pour cette raison, la présente Norme internationale comprend, en complément des mesurages de toxicité à l'aide de bactéries déshydratées (ISO 11348-2) et de bactéries lyophilisées (ISO 11348-3), la description d'un mode opératoire utilisant des bactéries fraîchement préparées (ISO 11348-1), dont les performances peuvent être modifiées par l'utilisateur dans les moindres détails.

Les laboratoires responsables des résultats ont l'opportunité de sélectionner la technique la mieux adaptée, en se fondant sur des jugements d'experts et des informations relatives aux échantillons d'eau soumis à l'essai.

Qualité de l'eau — Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) —

Partie 3: Méthode utilisant des bactéries lyophilisées

1 Domaine d'application

L'ISO 11348 décrit trois méthodes de détermination de l'inhibition de la luminescence émise par la bactérie marine *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177). La présente partie de l'ISO 11348 spécifie une méthode utilisant des bactéries lyophilisées.

Cette méthode est applicable:

- aux eaux usées;
- aux extraits et lixiviats aqueux;
- aux eaux douces (eaux de surface ou souterraines) ou aux eaux salées et saumâtres, notamment pour la surveillance des modifications de l'inhibition vis-à-vis des bactéries;
- aux eaux interstitielles.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 11348. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 11348 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 5667-16:1998, *Qualité de l'eau — Guide général pour les essais biologiques des échantillons*.

ISO 7027:—¹⁾, *Qualité de l'eau — Détermination de la turbidité*.

3 Principe

L'inhibition de la luminescence produite par des cultures de *Vibrio fischeri* est déterminée au moyen d'un essai par lots. Celui-ci est mis en œuvre par mélange de volumes spécifiés de l'échantillon à analyser, ou de l'échantillon dilué, et de bactéries luminescentes mises en suspension dans une cuve de mesure.

1) À publier. (Révision de l'ISO 7027:1990)

Le critère d'essai est la diminution de la luminescence, mesurée après 15 min et 30 min d'incubation, ou en option, de 5 min, par rapport à un facteur de correction (f_{kr}), qui représente la même mesure réalisée parallèlement sur un témoin. L'effet inhibiteur de l'échantillon d'eau peut être déterminé sous forme des valeurs de DMSE (voir annexe B) ou des valeurs de CE_{20} et/ou CE_{50} , au moyen d'une suite de dilutions.

Le niveau de dilution se traduisant par moins de 20 % d'inhibition de la luminescence est déterminé au moyen d'un essai aux limites. Pour les niveaux d'inhibition plus élevés, la relation entre la dilution et l'effet inhibiteur peut être déterminée de façon graphique ou par analyse statistique. L'inhibition provoquée par un échantillon est exprimée par les valeurs de dilution qui provoquent une diminution de la luminescence de 20 % et 50 % par rapport au témoin (CE_{20} et CE_{50}). Ces valeurs sont interpolées à partir de la suite de dilutions.

4 Interférences

Des substances insolubles, faiblement solubles ou volatiles, ou des substances qui réagissent avec l'eau de dilution ou avec la suspension d'essai, ou qui altèrent ces dernières au cours de la période d'essai, sont susceptibles d'influer sur les résultats ou de nuire à la reproductibilité des résultats d'essai.

Les pertes de luminescence, provoquées par l'absorption ou la diffusion de lumière, peuvent se produire en présence d'eaux fortement colorées ou turbides. Cette interférence peut parfois être compensée, par exemple, en utilisant une cuve de mesure de correction de l'absorption à double compartiment (voir annexe A).

La bioluminescence nécessitant plus de 0,5 mg/l d'oxygène, les échantillons ayant une consommation d'oxygène élevée (et/ou une faible concentration en oxygène) peuvent provoquer un déficit en oxygène et être inhibiteurs.

Une contamination organique de l'échantillon par des substances nutritives à biodégradabilité rapide (telles que l'urée, la peptone, l'extrait de levure, environ ≥ 100 mg/l) est susceptible de provoquer une réduction de la bioluminescence indépendante de la pollution.

Les concentrations en sel de l'échantillon initial supérieures à 30 mg/l de NaCl, ou les teneurs en composés autres produisant une osmolarité équivalente peuvent conduire, en association avec l'adjonction de sel requis pour l'essai, à des effets hyperosmotiques. Si l'échantillon contient entre 20 g/l et 50 g/l d'équivalents NaCl, il convient de ne pas ajouter de sel. La concentration résultante dans les échantillons pour essai ne doit pas excéder l'osmolarité d'une solution de chlorure de sodium à 35 g/l.

5 Réactifs et matériaux

Utiliser des substances chimiques de qualité analytique reconnue. L'eau doit être distillée ou présenter une pureté équivalente.

5.1 Bactéries d'essai

Souche de bactéries luminescentes appartenant à l'espèce *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Les suspensions de bactéries utilisées pour les mesurages de la toxicité sont fraîchement préparées à partir de réactifs déshydratés disponibles dans le commerce, pouvant être conservées au congélateur entre -18 °C et -20 °C. Les bactéries commencent à émettre de la lumière immédiatement après leur réhydratation et sont prêtes à être utilisées pour l'essai.

5.2 Solution de chlorure de sodium, utilisé comme diluant

Dissoudre 20 g de chlorure de sodium, (NaCl), dans de l'eau, et compléter à 1 litre avec de l'eau.

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

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

NOTE Il peut être nécessaire, pour l'ajustement du pH, d'utiliser des acides ou des bases de concentrations supérieures ou inférieures.

5.5 Solution destinée aux bactéries lyophilisées

- 20,0 g de chlorure de sodium (NaCl)
- 2,035 g de chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 0,30 g de chlorure de potassium (KCl)

Dissoudre dans de l'eau, et compléter à 1 litre avec de l'eau. Cette solution peut être conservée au congélateur à $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

5.6 Substances de référence

- Sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 3,5-Dichlorophénol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$)
- Dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

6 Appareillage

6.1 Congélateur, destiné à la conservation des bactéries préservées.

6.2 Réfrigérateur, destiné à maintenir la suspension mère à une température de $3\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$.

6.3 Thermostat, destiné à maintenir les échantillons pour essai à une température de $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Au sein d'un essai, l'écart de température doit être au plus de $\pm 0,2\text{ }^\circ\text{C}$.

6.4 Luminomètre, dont la cellule de mesure est maintenue à $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, équipé de cuves de mesure appropriées.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/55ba2004-d2e0-46a8-8ccf-3a3130ac4107/iso-11348-3-1998>

6.5 Tubes à essais (flacons), fabriqués à partir d'un matériau chimiquement inerte, adaptés au luminomètre choisi et ayant une capacité suffisante pour favoriser la lecture sur la plus grande surface possible.

6.6 pH-mètre.

6.7 Chronomètre.

6.8 Pipettes à piston, pour seringues en plastique, de 10 μl , 500 μl et 1 000 μl de capacité nominale.

6.9 Pipettes à piston, de volume variable, 10 ml à 200 ml, 200 μl à 5 000 μl .

6.10 Centrifugeuse réfrigérée.

6.11 Conductimètre.

7 Échantillonnage et prétraitement des échantillons

7.1 Échantillonnage

L'échantillonnage doit être réalisé dans des récipients chimiquement inertes et propres, conformément à l'ISO 5667-16. Remplir complètement les récipients et les fermer hermétiquement. Soumettre les échantillons à l'essai dès que possible après avoir effectué le prélèvement. Si nécessaire, conserver les échantillons à une température comprise entre $2\text{ }^\circ\text{C}$ et $5\text{ }^\circ\text{C}$ à l'obscurité, dans du verre, pendant une durée inférieure à 48 h. En cas de période s'étendant jusqu'à deux semaines, les conserver à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Ne pas employer de substances chimiques pour la conservation des échantillons. Réaliser l'ajustement nécessaire du pH, ainsi que l'ajout de sel, immédiatement avant l'essai.

7.2 Préparation de l'échantillon

Mesurer le pH de tous les échantillons. Si le pH se situe entre 6 et 8,5, aucun ajustement n'est généralement nécessaire. L'ajustement du pH est toutefois susceptible d'altérer la nature de l'échantillon. En revanche, le pH de l'échantillon et le pH du lot soumis à l'essai peuvent être différents en raison du pouvoir tampon du milieu d'essai. Parfois, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer les essais tant sur des échantillons dont le pH est ajusté que sur ceux dont le pH n'est pas ajusté.

Si nécessaire, ajuster le pH des échantillons à $7,0 \pm 0,2$ en ajoutant soit de l'acide chlorhydrique (5.4), soit de l'hydroxyde de sodium (5.3); choisir la concentration d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium qui permet de réduire le volume ajouté afin que celui-ci n'excède pas 5 % du volume total.

Ajouter 20 g de chlorure de sodium par litre dans l'échantillon d'eau ou dans l'échantillon d'eau neutralisé. Dans le cas des eaux saumâtres et salines, mesurer la salinité et calculer la quantité de NaCl requise (le cas échéant) afin d'ajuster l'osmolarité (voir article 4).

Il convient de laisser décanter pendant 1 h les échantillons présentant une forte turbidité, ou bien de les centrifuger, par exemple pendant 10 min à 5 000 g, ou encore de les filtrer.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation des suspensions mères

8.1.1 Préparations initiales

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Préparer les échantillons conformément à 7.2.

Préparer les séries de dilution nécessaires (voir annexe B).

Dans le cas des échantillons témoins, maintenir la solution de NaCl (5.2) à $15 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

Maintenir les tubes à essais contenant les échantillons témoins, les échantillons des séries de dilution ainsi que le diluant (5.2) à $15 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

Retirer le flacon contenant la culture lyophilisée du congélateur à -20 °C immédiatement avant reconstitution dans l'eau. Pour la reconstitution, faire refroidir 1 ml d'eau distillée dans un tube en verre à $3 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

Verser en une fois ce volume d'eau refroidie dans le flacon contenant les bactéries lyophilisées, en réduisant ainsi au minimum la détérioration des cellules durant le processus de réhydratation.

Il est primordial d'ajouter l'eau très rapidement afin de permettre aux bactéries d'entrer instantanément au contact de l'eau, ne pas utiliser de pipette pour cette opération. Le volume exact d'eau n'est pas déterminant.

La suspension de bactéries luminescentes reconstituée sert de suspension mère; elle doit être conservée à $3 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$. La suspension mère peut être utilisée pour les besoins de l'essai aussi longtemps que les critères de validité définis à l'article 11 sont satisfaits. Les bactéries lyophilisées recongelées ne peuvent être utilisées que pour des essais préliminaires.

Après un temps de repos d'au moins 5 min, préparer les suspensions d'essai à partir de la suspension mère.

8.1.2 Variante A

Préparer les suspensions d'essai directement dans les tubes à essai.

Ajouter des portions aliquotes de 10 μl de suspension mère à 500 μl de la solution (5.5) contenus dans des cuvettes maintenues à $15 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$, selon des intervalles de temps équivalents à ceux qui seront employés ultérieurement pour les mesurages de l'intensité. Agiter le mélange manuellement.

8.1.3 Variante B

Préparer les suspensions d'essai à l'extérieur des tubes à essai, dans une fiole conique (de 250 ml, par exemple).

Ajouter un volume de suspension mère à 50 volumes de la solution (5.5) maintenue à $3\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ et mélanger soigneusement la suspension obtenue.

Introduire, à l'aide d'une pipette, 500 μl de suspension d'essai dans les tubes à essais maintenus à $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ à l'intérieur de l'incubateur, selon des intervalles de temps équivalents à ceux qui seront employés ultérieurement pour les mesurages de l'intensité.

8.2 Mode opératoire d'essai

Réaliser, si possible, les déterminations en double par niveau de dilution, à une température d'essai de $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

NOTE Il convient que tous les échantillons soient mesurés, car des luminescences différentes peuvent être obtenues en raison d'un éventuel manque d'homogénéité de la suspension d'essai.

Ajuster le luminomètre à un niveau approprié, proche du maximum.

Après un temps de conditionnement d'au moins 15 min, déterminer et noter l'intensité de la luminescence I_0 des suspensions d'essai, au moyen d'un luminomètre, à intervalles de 20 s.

La durée de contact devant être égale pour tous les échantillons, utiliser un chronomètre lors du mesurage des intensités de luminescence à des intervalles de temps égaux (en série). Un intervalle de 20 s a été jugé convenable.

Immédiatement après le mesurage d'une suspension d'essai, compléter cette solution à un volume total de 1 ml avec des échantillons (7.2), des échantillons dilués (voir annexe B) ou une solution de chlorure de sodium (5.2) selon les besoins. Mélanger manuellement, démarrer le chronomètre et replacer la cuve de mesure dans le bloc thermique à $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Répéter cette opération pour toutes les autres cuves de mesure, en laissant s'écouler le même intervalle de temps entre chaque ajout successif.

Déterminer et noter l'intensité de la luminescence relevée dans l'ensemble des cuves de mesure, en effectuant de nouveaux contrôles après 15 min et 30 min (I_{15} , I_{30}), ainsi qu'en option, après 5 min (I_5) à intervalles de 20 s.

Consigner les réglages de l'instrument.

9 Évaluation

9.1 Effet inhibiteur sur les bactéries luminescentes

Calculer à l'aide de l'équation (1) le facteur de correction (valeur de f_{kt}) à partir de l'intensité de luminescence mesurée. Ce facteur a pour but de corriger les valeurs initiales I_0 de tous les échantillons soumis à l'essai avant que celles-ci ne soient utilisées comme valeurs de référence pour déterminer la diminution de la luminescence provoquée par l'eau.

$$f_{kt} = I_{kt}/I_0 \quad (t = 5\text{ min}, 15\text{ min}, 30\text{ min}) \quad \dots (1)$$

où

f_{kt} est le facteur de correction pour un temps de contact de 5 min, 15 min ou 30 min;

I_{kt} est l'intensité de luminescence de l'échantillon témoin après un temps de contact de 15 min ou 30 min, en unités de luminescence relative;

I_0 est l'intensité de luminescence de la suspension d'essai témoin, immédiatement avant l'ajout du diluant (5.2), en unités de luminescence relative.

Calculer la moyenne des valeurs de f_{kt} des échantillons témoins.

Calculer I_{ct} à l'aide de l'équation (2):

$$I_{ct} = I_0 \cdot \overline{f_{kt}} \quad \dots (2)$$

où

$\overline{f_{kt}}$ est la moyenne des valeurs de f_{kt} ;

I_0 [voir équation (1)];

I_{ct} est la valeur corrigée de I_0 pour les cuves de mesure d'échantillons pour essai, immédiatement avant l'ajout de l'échantillon pour essai.

Calculer l'effet inhibiteur d'un échantillon pour essai à l'aide de l'équation (3):

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \times 100 \quad \dots (3)$$

où

H_t est l'effet inhibiteur d'un échantillon pour essai après un temps de contact de 15 min ou 30 min, en pourcentage;

I_{ct} [voir équation (2)];

I_{Tt} est l'intensité de luminescence de l'échantillon pour essai après un temps de contact de 15 min ou 30 min, en unités de luminescence relative.

Calculer la moyenne de l'effet inhibiteur H_t pour chaque niveau de dilution, en pourcentage.

Calculer l'écart de la détermination parallèle de H_t à partir de leur moyenne respective, pour les essais en double, et sous forme de pourcentage de la moyenne, dans le cas des témoins.

Pour évaluer la relation concentration/effet, évaluer, pour chaque dilution, la valeur gamma à l'aide de l'équation (4):

$$\Gamma_t = \frac{H_t}{100 - H_t} \quad \dots (4)$$

où

Γ_t est la valeur gamma de l'échantillon pour essai après un temps de contact de 15 min ou 30 min;

$\overline{H_t}$ est la moyenne de H_t [voir équation (3)].

NOTE Lorsqu'une certaine concentration d'essai provoque une inhibition de 0 % ou de 100 % de la bioluminescence, la valeur gamma ne peut être calculée. Par conséquent, seules les valeurs de H_t comprises entre 10 % et 90 % sont utilisées pour le calcul de la relation concentration/effet inhibiteur.

9.2 Détermination des valeurs de CE

Calculer la relation concentration/effet pour chaque temps d'exposition, en utilisant une analyse par régression appropriée. La relation concentration/effet à un temps d'exposition donné peut se décrire à l'aide de l'équation linéaire suivante (5):

$$\lg c_t = b \lg \Gamma_t + \lg a \quad \dots (5)$$

où

c_t est la portion d'échantillon d'eau présente dans l'échantillon pour essai, en pourcentage;

Γ_t [voir équation (4)];

b est la valeur de la pente de la droite décrite;

$\lg a$ est l'ordonnée à l'origine de la droite décrite.

Au moyen d'une méthode standard des moindres carrés, les valeurs de CE_{20} et de CE_{50} et les limites de confiance correspondantes sont calculées, pour lesquelles:

$$c_t = CE_{20,t} \text{ pour } \Gamma_t = 0,25;$$

$$c_t = CE_{50,t} \text{ pour } \Gamma_t = 1,00.$$

Si la gamme de valeurs dupliquées ne peut être ajustée à la droite, il est possible de produire une estimation graphique des valeurs de CE à l'aide d'un système à doubles coordonnées logarithmiques.

10 Expression des résultats

Noter les résultats conformément à l'exemple du tableau 1.

Noter la valeur de DMSE, si celle-ci a été déterminée (voir annexe B).

Noter les valeurs de CE_{20} et de CE_{50} , si ces dernières ont été déterminées.

Noter le type de préparation bactérienne utilisé. [ISO 11348-3:1998](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/55ba2004-d2e0-46a8-8ccf-ca3439c631c7/iso-11348-3-1998>