
**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
fraichement préparées**

iTeh STANDARD PREVIEW
(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/075bbfe08a46/iso-11348-1-2007>
Part 1: Method using freshly prepared bacteria



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 11348-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbf08a46/iso-11348-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbf08a46/iso-11348-1-2007>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2007

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Principe	2
4 Interférences	2
5 Réactifs et matériaux	2
6 Appareillage	4
7 Échantillonnage et prétraitement des échantillons	5
8 Culture des bactéries luminescentes	6
9 Mode opératoire	8
10 Évaluation	9
11 Expression des résultats	11
12 Critères de validité	13
13 Fidélité	13
14 Rapport d'essai	13
Annexe A (informative) Méthode de correction de la couleur	14
Annexe B (informative) Niveau de dilution D — Préparation des séries de dilutions	17
Annexe C (informative) Données de fidélité	20
Annexe D (informative) Essai de bactéries luminescentes sur des échantillons d'eau salée utilisant des bactéries fraîchement cultivées	21
Bibliographie	25

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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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 du présent document 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.

L'ISO 11348-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 11348-1:1998), qui a fait l'objet d'une révision technique.

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*

Introduction

Les mesurages spécifiés dans 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 Normenausschuss Wasserwesen 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 en présence de 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 peut se révéler 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, qui, par conséquent, ne peut pas être interprétée par l'utilisateur.

Pour cette raison, la présente partie de l'ISO 11348 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 dont les performances peuvent être interprétées 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 essai.

[ISO 11348-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbf08a46/iso-11348-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbf08a46/iso-11348-1-2007>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11348-1:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbfe08a46/iso-11348-1-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbfe08a46/iso-11348-1-2007>

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

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente partie de l'ISO 11348 connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente norme n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de mettre en place des pratiques d'hygiène et de sécurité adéquates et de s'assurer de la conformité avec toutes les dispositions réglementaires nationales.

IMPORTANT — Il est indispensable que les essais menés selon la présente partie de l'ISO 11348 le soient par du personnel qualifié.

iTeh STANDARD PREVIEW

1 Domaine d'application (standards.iteh.ai)

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 fraîchement préparées.

Cette méthode est applicable:

- aux eaux usées;
- aux extraits aqueux et aux lixiviats;
- aux eaux douces (eaux de surface ou souterraines);
- à l'eau de mer ou aux eaux saumâtres;
- aux éluats de sédiments (eau douce, eau saumâtre et eau de mer);
- aux eaux interstitielles;
- aux substances individuelles diluées dans l'eau.

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 5667-16, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*

ISO 5814, *Qualité de l'eau — Dosage de l'oxygène dissous — Méthode électrochimique à la sonde*

ISO 7027, *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 soumis à essai, ou de l'échantillon dilué, et de bactéries luminescentes mises en suspension dans une cuvette.

Le critère suivi est la luminescence, mesurée après un temps de contact de 15 min ou de 30 min, et éventuellement de 5 min, prenant en compte un facteur de correction (f_{kt}) qui représente une mesure des changements d'intensité des témoins pendant le temps d'exposition. L'effet inhibiteur de l'échantillon d'eau peut être déterminé sous la forme des valeurs de dilution minimale sans effet (DMSE) (voir Annexe B) ou des valeurs de CE_{20} et/ou de CE_{50} , au moyen d'une série de dilutions (CE est la concentration effective).

4 Interférences

Des substances insolubles, faiblement solubles ou volatiles, ou des substances qui réagissent avec l'eau de dilution ou avec la suspension, ou qui s'altèrent 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 être compensée en soumettant l'échantillon à un traitement contre la turbidité (7.2) ou, par exemple, en utilisant une cuvette de correction de l'absorption à double compartiment (voir Annexe A).

La bioluminescence^[6] nécessitant de l'oxygène, les échantillons à forte demande en oxygène (et/ou possédant une faible concentration en oxygène) peuvent provoquer un déficit en oxygène et être inhibiteurs.

La présence de substances nutritives à biodégradabilité rapide dans l'échantillon peut provoquer une réduction de la bioluminescence^[1] indépendante de la pollution.

Les échantillons dont le pH se trouve en dehors de la plage de pH = 6,0 à pH = 8,5 affectent la luminescence des bactéries^{[6], [7]}. Un ajustement de l'échantillon est nécessaire si l'effet toxique du pH est indésirable.

Étant donné que l'organisme d'essai *Vibrio fischeri* est une bactérie marine, les essais sur des échantillons d'eau salée suivant le mode opératoire normalisé ont souvent pour résultat une stimulation de la bioluminescence, susceptible de masquer des effets inhibiteurs (voir Annexe D).

Les concentrations en sel de l'échantillon initial supérieures à 30 g/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. Pour éviter ces effets, il convient que la concentration en sel résultante dans les échantillons soumis à essai n'excède pas 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. Utiliser de l'eau distillée ou présentant une pureté équivalente.

5.1 Bactéries pour essai.

Utiliser une souche de bactéries luminescentes appartenant à l'espèce *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Les souches de bactéries peuvent provenir de réactifs lyophilisés ou déshydratés disponibles dans le commerce ou de collections de souches comme la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 10, D-38124 Braunschweig, Allemagne, ou la NRRL, ARS Culture collection NCAUR, 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604, États-Unis. Les suspensions bactériennes utilisées pour les mesurages de la toxicité doivent être fraîchement préparées à partir de cultures.

5.2 Solution de chlorure de sodium, utilisée comme diluant.

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

5.3 Solution d'hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$, par exemple.**5.4 Acide chlorhydrique**, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$, par exemple.

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 fraîchement préparées.

8,0 g	D(+)-Glucose monohydraté ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
20,0 g	Chlorure de sodium (NaCl)
2,035 g	Chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
0,30 g	Chlorure de potassium (KCl)
11,9 g	<i>N</i> -(2-Hydroxyéthyl)pipérazine- <i>N</i> -(2-acide éthanesulfonique) (HEPES)

Dissoudre dans de l'eau, agiter pendant environ 30 min et ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$ avec la solution d'hydroxyde de sodium (5.3) ou d'acide chlorhydrique (5.4). Compléter à 1 l avec de l'eau.

Cette solution peut être conservée sous forme d'aliquotes de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.6 Substances de référence.

Préparer les solutions mères des substances de référence suivantes en utilisant la solution de chlorure de sodium (5.2) séparément comme diluant, sans ajustement du pH:

219,8 mg/l	Sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
9 mg/l	3,5-Dichlorophénol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$) (pureté $\geq 99,9 \%$)
22,6 mg/l	Dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

Ces concentrations représentent environ le double des valeurs de CE_{50} attendues pour les substances de référence respectives dans la présente partie de l'ISO 11348. Les volumes nécessaires dépendent de la configuration des essais.

NOTE Il est possible d'utiliser des préparations chimiques du commerce ayant des concentrations définies en ZnSO_4 et en $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Titrisol) pour préparer les solutions mères des substances de référence.

5.7 Milieu de culture liquide destiné aux précultures et aux cultures principales.

30 g	Chlorure de sodium (NaCl)
6,10 g	Dihydrogénophosphate de sodium monohydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
2,75 g	Hydrogénophosphate de dipotassium trihydraté ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
0,204 g	Sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
0,500 g	Hydrogénophosphate de diammonium $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$
3 ml	Glycérol
5,00 g	Peptone de caséine
0,50 g	Extrait de levure

Dissoudre dans de l'eau et ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$ avec la solution d'hydroxyde de sodium (5.3) ou l'acide chlorhydrique (5.4). Compléter à 1 l avec de l'eau. Transférer par fractions de 50 ml dans des erlenmeyers (de capacité 250 ml, par exemple) et stériliser à l'autoclave à $121 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 min.

La peptone de caséine et l'extrait de levure proposés par les différents fournisseurs peuvent être de qualité variable. En cas de problèmes (tels qu'une inhibition de la croissance), il est recommandé de se procurer le produit auprès d'un autre fabricant.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.8 Milieu gélosé pour les cultures mères.

Ajuster le pH du milieu de culture liquide (5.7) à $7,0 \pm 0,2$.

Ajouter 12 g de gélose par litre et dissoudre en chauffant modérément, stériliser et transférer dans des boîtes de Petri stériles.

5.9 Milieu protecteur.

66 g	D(+)-Glucose monohydraté ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
4 g	Chlorure de sodium (NaCl)
2 g	L-Histidine
0,5 g	Albumine de sérum bovin, BSA

Dissoudre complètement dans de l'eau à environ $37 \text{ }^\circ\text{C}$ et ajuster si nécessaire le pH à $7,0 \pm 0,2$, avec la solution d'hydroxyde de sodium (5.3) ou l'acide chlorhydrique (5.4), à température ambiante. Compléter à 100 ml avec de l'eau.

Le milieu protecteur évite l'endommagement des cellules bactériennes durant la procédure de congélation. L'albumine de sérum bovin proposée par les différents fournisseurs peut être de qualité variable. En cas de problèmes, il est recommandé de se procurer le produit auprès d'un autre fabricant.

Préparer fraîchement le milieu protecteur avant emploi.

6 Appareillage

6.1 Bloc thermique thermostaté, destiné à maintenir les échantillons soumis à essai à une température de $15 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Au sein d'un essai, il convient que l'écart de température soit au plus de $\pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$.

- 6.2 Bain-marie ou bloc thermique thermostaté**, destiné à maintenir un volume d'eau moins 12 ml (récipient pour réactifs, par exemple) de la solution préparée en 5.5 à $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- 6.3 Luminomètre**, dont la cellule de mesure est maintenue à $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, équipé de cuvettes appropriées.
- 6.4 Cuvettes**, fabriquées à partir d'un matériau chimiquement inerte, adaptées au luminomètre choisi, ayant une capacité suffisante pour favoriser la lecture sur la plus grande surface possible, et de taille adaptée pour pouvoir être placées dans le bloc thermique (6.1).
- 6.5 pH-mètre.**
- 6.6 Chronomètre.**
- 6.7 Pipettes à piston ou seringues en plastique**, de 100 µl, de 500 µl et de 1 000 µl.
- 6.8 Pipettes à piston**, de volume variable, de 10 ml à 200 ml et de 200 µl à 5 000 µl.
- 6.9 Centrifugeuse réfrigérée.**
- 6.10 Agitateur magnétique et barreau aimanté.**
- 6.11 Agitateur incubateur**, destiné à l'incubation des erlenmeyers.
- 6.12 Autoclave.**
- 6.13 Incubateur.**
- 6.14 Spectrophotomètre ou photomètre à filtre et cuvettes**, de trajet optique de 1 cm.
- 6.15 Boucle (ou aiguille) d'ensemencement**
- 6.16 Conductimètre.**
- 6.17 Congélateur**, destiné à la conservation des solutions et suspensions.
- 6.18 Électrode à oxygène**, selon l'ISO 5814.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11348-1:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbf08a46/iso-11348-1-2007>

7 Échantillonnage et prétraitement des échantillons

7.1 Échantillonnage

Recueillir les échantillons dans des récipients chimiquement inertes et propres, comme cela est spécifié dans l'ISO 5667-16. Remplir complètement les récipients et les fermer hermétiquement. Soumettre les échantillons à essai dès que possible après avoir effectué le prélèvement. Si nécessaire, conserver les échantillons à une température comprise entre 2 °C et 5 °C , dans l'obscurité et dans les récipients, pendant une durée inférieure à 48 h. En cas de période s'étendant jusqu'à deux mois, les conserver à une température $\leq -18\text{ °C}$. 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 des échantillons

Mesurer la concentration en oxygène de tous les échantillons. L'essai exige une concentration en oxygène $> 3\text{ mg/l}$. Si la concentration en oxygène de l'échantillon non dilué est inférieure à 3 mg/l , oxygéner l'échantillon de manière adaptée, par exemple par aération ou agitation.

Mesurer le pH de tous les échantillons. Si le pH se situe entre 6,0 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 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 de l'échantillon en ajoutant soit de l'acide chlorhydrique (5.4), soit la solution d'hydroxyde de sodium (5.3). Selon l'objectif de l'essai, il est possible d'ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$, ou aux limites supérieure ($8,5 \pm 0,2$) ou inférieure ($6,0 \pm 0,2$). Choisir la concentration d'acide chlorhydrique ou de solution 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.

Pour les échantillons ayant des concentrations en sel élevées, mesurer la salinité et ajouter la quantité de sel nécessaire pour ajuster l'osmolarité à 20 g/l NaCl.

Si l'échantillon contient entre 20 g/l et 50 g/l d'équivalents NaCl, ne pas ajouter de sel. La concentration en sel résultante dans les échantillons soumis à essai ne doit pas excéder l'osmolarité d'une solution de chlorure de sodium à 35 g/l.

L'Annexe D donne de plus amples informations concernant les échantillons d'eau salée.

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 000g, ou encore de les filtrer. Pour l'essai, utiliser le surnageant ou le filtrat.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8 Culture des bactéries luminescentes

[ISO 11348-1:2007](#)

8.1 Cultures mères

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8a103cec-2f03-4942-a8e4-075bbf08a46/iso-11348-1-2007>

Transférer, dans des conditions stériles, les bactéries luminescentes appartenant aux souches de *Vibrio fischeri* NRRL B-11177 (5.1) dans des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé nécessaire aux cultures mères (5.8).

Incuber pendant 2 à 3 jours à $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans un incubateur.

Marquer les colonies luminescentes isolées en effectuant des observations visuelles dans l'obscurité et conserver ensuite les boîtes au réfrigérateur.

Transférer, dans des conditions stériles, les colonies marquées dans des boîtes neuves après une période de conservation de 1 à 2 semaines au maximum.

Les flacons de bactéries conservées, disponibles dans le commerce, ne sont généralement pas fournis dans des conditions stériles. Pour préparer des cultures pures, il est recommandé d'effectuer plusieurs passages avec des colonies isolées. Afin d'éviter les altérations génétiques, il est possible d'ouvrir et d'utiliser un nouveau flacon de bactéries conservées environ tous les 6 mois.

NOTE La luminescence des colonies bactériennes luminescentes peut décroître au cours de la conservation.

8.2 Préparation des précultures

Ensemencer 50 ml de milieu de préculture (5.7) dans des erlenmeyers (de capacité 250 ml, par exemple) dans des conditions stériles, avec une colonie luminescente isolée provenant d'une culture mère et âgée de 2 à 3 jours.

Agiter pendant $21\text{ h} \pm 1\text{ h}$ à $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (agitation d'au moins $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$).