
**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**

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/en/standards/ISO/ISO-11348-3-2007>
~~Part 3: Method using freeze-dried bacteria -~~
042e7bdf0f9c/iso-11348-3-2007



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 11348-3:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ae397d2-e6ee-4ed0-bfa2-042e7bdf0f9c/iso-11348-3-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ae397d2-e6ee-4ed0-bfa2-042e7bdf0f9c/iso-11348-3-2007>



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	3
7 Échantillonnage et prétraitement des échantillons	4
8 Mode opératoire	5
9 Évaluation	7
10 Expression des résultats	9
11 Critères de validité	11
12 Fidélité	11
13 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Méthode de correction de la couleur	12
Annexe B (informative) Niveau de dilution D — Préparation des séries de dilutions	15
Annexe C (informative) Données de fidélité	18
Annexe D (informative) Essai de bactéries lumineuses sur des échantillons d'eau salée utilisant des bactéries lyophilisées	19
Bibliographie	23

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 11348-3 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 11348-3:1998), 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 s'avérer 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 fraîchement préparées (ISO 11348-1), la description d'un mode opératoire utilisant des bactéries lyophilisées 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 11348-3:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ae397d2-e6ee-4ed0-bfa2-042e7bdf0f9c/iso-11348-3-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ae397d2-e6ee-4ed0-bfa2-042e7bdf0f9c/iso-11348-3-2007>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11348-3:2007](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ae397d2-e6ee-4ed0-bfa2-042e7bdf0f9c/iso-11348-3-2007>

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

Partie 3: Méthode utilisant des bactéries lyophilisées

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 lyophilisées. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ae397d2-e6ee-4ed0-bfa2-042e7bdf0f9c/iso-11348-3-2007>

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*

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 forme des valeurs de DMSE (voir Annexe B) ou des valeurs de CE₂₀ et/ou de CE₅₀, 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 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 suspensions de bactéries utilisées pour les mesurages de la toxicité sont préparées à partir de réactifs lyophilisés disponibles dans le commerce, pouvant être conservés 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, 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 aqueuse 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 lyophilisées.

20 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)

Dissoudre dans de l'eau et compléter à 1 l avec de l'eau. Cette solution peut être conservée sous forme d'aliquotes de $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ dans un congélateur.

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:

19,34 mg/l	Sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
6,8 mg/l	3,5-Dichlorophénol ($\text{C}_6\text{H}_4\text{OCl}_2$) (pureté $> 99 \%$)
105,8 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 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (titrisol) pour préparer les solutions mères des substances de référence.

6 Appareillage**6.1 Congélateur**, destiné à la conservation des bactéries préservées.

6.2 Incubateur ou réfrigérateur, destiné à maintenir la suspension mère (8.2) et, éventuellement, la «solution destinée aux bactéries lyophilisées» (5.5) (variante B) à une température de $(4 \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$.

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

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

6.5 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 (6.3).

6.6 pH-mètre.**6.7 Chronomètre.**

6.8 **Pipettes à piston ou seringues en plastique**, de 10 µl, de 500 µl et de 1 000 µl.

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

6.10 **Conductimètre**.

6.11 **Électrode à oxygène**, selon l'ISO 5814.

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 ≤ -18 °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 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.

8 Mode opératoire

8.1 Préparations initiales

Préparer les échantillons de référence conformément à 5.6. Après livraison, tester chaque lot de bactéries avec chacune des trois substances de référence. Tester au moins l'une des trois substances de référence en parallèle à chaque cuvette de suspension mère reconstituée.

Préparer les échantillons conformément à 7.2.

Dans une première série de cuvettes (6.5), préparer la série de dilutions de l'échantillon, l'échantillon de référence (5.6) et les témoins (5.2) requis.

Un mode opératoire courant pour la préparation de la série de dilution est décrit à l'Annexe B. Selon l'objectif de l'essai et les exigences statistiques applicables aux résultats d'essai, d'autres modes de dilution avec des concentrations réparties selon une série géométrique ou logarithmique peuvent également convenir. En raison du mélange de volumes égaux d'échantillon ou d'échantillon dilué et de suspension d'essai, la concentration en échantillon la plus élevée au cours de l'essai est, en règle générale, de 50 % d'échantillon. L'analyse d'échantillons d'eau faiblement dilués (80 % d'échantillon) nécessite un lot témoin supplémentaire (voir B.2 et le Tableau 1).

Maintenir les cuvettes contenant la solution de chlorure de sodium (5.2) utilisées pour les témoins, les échantillons de référence (5.6), les échantillons (7.2) ainsi que les échantillons de la série de dilution (Tableau B.1) à (15 ± 1) °C.

Choisir des conditions d'essai dans lesquelles l'écart maximal de température dans le bloc thermique thermostaté au cours d'un même essai soit au plus de $\pm 0,3$ °C.

8.2 Préparation de la suspension mère

Retirer, immédiatement avant reconstitution dans l'eau, le flacon contenant la culture lyophilisée (quantité suffisante pour permettre jusqu'à 100 mesurages) du congélateur. Pour la reconstitution, faire refroidir 1 ml d'eau distillée dans une cuvette en verre à (4 ± 3) °C.

Verser en une fois ce volume d'eau refroidie dans le flacon contenant les bactéries lyophilisées, en réduisant ainsi au maximum 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, et ainsi éviter qu'elles ne s'agglomèrent ou ne perdent de leur activité. Par conséquent, ne pas utiliser de pipette. Le volume exact d'eau n'est pas déterminant.

La suspension de bactéries luminescentes reconstituée (ayant une concentration en cellules de 10^8 cellules par millilitre environ) sert de suspension mère; la conserver à (4 ± 3) °C. La suspension mère peut être utilisée pour les besoins de l'essai aussi longtemps que les critères de validité définis dans l'Article 11 sont respectés. Les bactéries réhydratées recongelées ne peuvent être utilisées que pour des essais préliminaires.

8.3 Préparation des suspensions d'essai

8.3.1 Étape initiale

Après un temps d'attente d'au moins 10 min, préparer, à partir de la suspension mère et en suivant l'une des deux variantes, les suspensions d'essai, dans une seconde série correspondante de cuvettes (6.5) maintenues à (15 ± 1) °C.

8.3.2 Variante A

Préparer les suspensions d'essai directement dans les cuvettes.

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 ± 1) °C, selon des intervalles de temps (de 5 s à 20 s) équivalents à ceux employés ultérieurement pour les mesurages de l'intensité. Agiter manuellement les mélanges.

8.3.3 Variante B

Préparer les suspensions d'essai à l'extérieur des cuvettes, 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 (4 ± 3) °C et mélanger soigneusement la suspension obtenue.

Introduire, à l'aide d'une pipette, 500 µl de suspension d'essai dans les cuvettes maintenues à (15 ± 1) °C à l'intérieur de l'incubateur, selon des intervalles de temps (de 5 s à 20 s) équivalents à ceux employés ultérieurement pour les mesurages de l'intensité.

NOTE Des flacons contenant de plus petits volumes de bactéries lyophilisées (quantités permettant, par exemple, d'effectuer 20 ou 10 mesurages par flacon) sont également disponibles dans le commerce. Les bactéries lyophilisées contenues dans ces flacons sont reconstituées directement en ajoutant un volume approprié de «solution destinée aux bactéries lyophilisées» (5.5). La suspension d'essai obtenue est alors traitée comme dans la variante B (8.3.3) en transférant à la pipette 500 µl de cette solution dans les cuvettes, maintenues à (15 ± 1) °C dans l'incubateur.

8.4 Mode opératoire d'essai

Réaliser les déterminations en double par niveau de dilution, à une température d'essai de (15 ± 1) °C.

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

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

La durée de contact devant être égale pour tous les échantillons, utiliser un chronomètre (6.7) lors du mesurage en série des intensités de luminescence à des intervalles de temps égaux. Un intervalle de 5 s à 20 s a été jugé convenable.

Mesurer tous les échantillons, car des luminescences différentes peuvent être dues au manque d'homogénéité de la suspension d'essai.

Immédiatement après le mesurage de la luminescence d'une suspension d'essai, compléter cette suspension à un volume total de 1 ml avec des échantillons (7.2), des échantillons dilués (voir Annexe B), un échantillon de référence (5.6) ou une solution de chlorure de sodium (5.2), suivant le cas, en introduisant à la pipette 500 µl de chacun des échantillons, échantillons dilués, échantillon de référence ou solution de chlorure de sodium, préparés dans la première série de cuvettes, aux suspensions d'essai contenues dans chaque cuvette correspondant de la seconde série de cuvettes. Mélanger manuellement, déclencher le chronomètre et replacer les cuvettes dans le bloc thermique, à (15 ± 1) °C.

Répéter le mode opératoire ci-dessus pour toutes les autres cuvettes, en laissant s'écouler le même intervalle de temps entre ajouts successifs.

Déterminer et reporter l'intensité de la luminescence relevée dans l'ensemble des cuvettes de la seconde série, y compris les témoins, après (facultatif) 5 min (I_5), puis de nouveau après 15 min et 30 min (I_{15} , I_{30}), selon ce qui est nécessaire, à des intervalles de 5 s à 20 s.

Consigner les réglages de l'instrument.