
**Qualité de l'eau — Évaluation de la
génétoxicité des eaux résiduaires —
Essai de Salmonella/microsome (essai
d'Ames-fluctuation)**

*Water quality — Determination of the genotoxicity of water and waste
water — Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11350:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-9462-6eb1050e02e6/iso-11350-2012>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 11350:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-9462-6eb1050e02e6/iso-11350-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-9462-6eb1050e02e6/iso-11350-2012>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Interférences	3
5 Principe	4
6 Appareillage et matériaux	4
7 Réactifs, milieux et dilutions	5
8 Échantillonnage et échantillons	10
9 Mode opératoire	10
9.1 Culture d'une nuit	10
9.2 Préparation du mélange S9	10
9.3 Essais des échantillons d'eau	11
9.4 Mesure de la croissance des révertants	13
9.5 Calcul de la cytotoxicité	14
10 Critères de validité	14
11 Critères d'évaluation	14
12 Rapport d'essai	14
Annexe A (normative) Bouillon nutritif et gélose	16
Annexe B (normative) Préparation des plaques de gélose à l'ampicilline et des cultures mères	17
Annexe C (normative) Vérification du génotype	18
Annexe D (normative) Fraction S9	19
Annexe E (informative) Exemple d'application d'échantillons sur une plaque à 24 puits	20
Annexe F (informative) Exemple de rapport	22
Annexe G (informative) Essai des substances chimiques	23
Annexe H (informative) Données de fidélité	26
Annexe I (informative) Évaluation statistique	28
Annexe J (informative) Mesure de la plus faible dilution sans effet (LID) d'une eau résiduaire — Évaluation simplifiée des essais portant sur les eaux résiduaires	34
Annexe K (informative) Utilisation de souches de contrôle supplémentaires	36
Bibliographie	37

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 11350 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 11350:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-9462-6eb1050e02e6/iso-11350-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-9462-6eb1050e02e6/iso-11350-2012>

Qualité de l'eau — Évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires — Essai de Salmonella/microsome (essai d'Ames-fluctuation)

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément à la présente Norme internationale soient exécutés par un personnel ayant reçu une formation adéquate.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode d'évaluation de la génotoxicité des eaux résiduaires en utilisant les souches bactériennes *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotype Typhimurium TA 98 et TA 100 au cours d'un essai en fluctuation. Cette combinaison de souches permet d'évaluer la génotoxicité des substances chimiques qui produisent des mutations ponctuelles (substitutions de paires de base et mutations de changement de phase) dans les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'acide aminé histidine.

NOTE 1 L'ISO 13829^[8] est applicable pour la détermination de la génotoxicité des échantillons contenant des agents de réticulation de l'ADN.

Cette méthode est applicable aux substances suivantes:

- eau douce;
- eaux résiduaires;
- extraits aqueux et lixiviats;
- éluats de sédiments (eau douce);
- eau interstitielle;
- solutions aqueuses contenant des substances uniques ou des mélanges chimiques;
- eau potable.

NOTE 2 Lors de l'analyse de l'eau potable, il peut être nécessaire d'extraire et de préconcentrer les échantillons d'eau.

2 Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. 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 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1
solution de cofacteurs
solution aqueuse de produits chimiques (par exemple NADP, glucose-6-phosphate et sels inorganiques) nécessaires à l'activité des enzymes de la fraction S9

[Source: ISO 21427-2:2006^[10], définition 3.2]

3.2
milieu de culture
substances nutritives se présentant sous une forme et une phase (liquide ou solidifiée) favorisant la croissance microbiologique

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 24]

3.3
niveau de dilution
D
dénominateur du coefficient de dilution (le numérateur étant 1) d'un mélange d'eau ou d'eaux résiduaire et d'eau de dilution en tant que nombre entier

NOTE 1 à l'article: Pour de l'eau ou pour des eaux résiduaire non diluées, ce coefficient est, par définition, égal à 1→1. [Dans la présente Norme internationale, la flèche indique la transition de volume total initial à volume total final.] La valeur *D* correspondante la plus petite possible est 1.

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 28] (standards.iteh.ai)

3.4
plus faible dilution sans effet
LID
plus faible dilution dans un lot d'essai qui ne présente aucun effet, c'est-à-dire aucune augmentation statistiquement significative du nombre de puits de révertants par rapport au témoin négatif

NOTE 1 à l'article: La LID est déterminée pour chaque condition d'incubation (souche, ± mélange S9). La valeur LID maximale est décisive pour l'évaluation globale.

3.5
taux d'induction
différence entre la valeur moyenne des puits avec croissance de révertants dénombrés sur les plaques et traités avec une dose de l'échantillon pour essai ou avec un témoin positif, ainsi que des puits correspondants traités avec le témoin négatif en utilisant la même souche, dans les mêmes conditions

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 43, modifiée: "puits avec croissance de révertants dénombrés" remplace "colonies mutantes dénombrées"; "puits correspondants" remplace "plaques correspondantes"]

3.6
inoculum
fraction d'une culture de micro-organismes utilisée pour démarrer une nouvelle culture ou une préculture à croissance exponentielle dans un nouveau milieu de culture

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 44]

3.7
témoin négatif
eau de dilution sans l'échantillon pour essai

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 51]

3.8**croissance de révertants**

colonies mutantes visibles sur la microplaque à la fin de l'essai respectif

3.9**culture d'une nuit**

culture commencée en fin d'après-midi et dont l'incubation dure toute une nuit (généralement environ 16 h), afin qu'elle puisse être utilisée le matin suivant à des fins, par exemple, d'inoculation d'une préculture

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 54]

NOTE 1 à l'article: Pour les spécifications, voir 9.1.

3.10**témoin positif**

matériau et/ou substance bien caractérisés qui, lors d'essais réalisés selon un mode opératoire spécifique, démontrent l'aptitude du système à fournir une réponse positive ou négative reproductible lors de l'expérimentation

[Source: ISO 10993-12:—^[7], définition 3.12]

NOTE 1 à l'article: Les témoins positifs mentionnés dans la présente Norme internationale sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avant utilisation. Pour les besoins de la présente Norme internationale, les témoins positifs sont des mutagènes connus pour vérifier la sensibilité de la méthode et/ou l'activité du mélange S9.

3.11**fraction S9**

surnageant à 9 000g d'un homogénat de tissus dans du KCl à 0,15 mol/l, obtenu à partir de foies de rats mâles (200 g à 300 g), prétraités avec une substance ou une combinaison de substances appropriée pour l'induction d'enzymes

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 74]

3.12**mélange S9**

mélange de la fraction S9 et de la solution de cofacteurs

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 75]

3.13**culture mère**

culture d'une souche d'organismes maintenue dans certaines conditions afin de conserver ses caractéristiques d'origine, telles que les séquences des nucléotides

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 87]

3.14**échantillon pour essai**

portion non diluée, diluée ou préparée autrement d'un échantillon soumis à essai, après exécution de toutes les étapes de préparation, telles que la centrifugation, la filtration, l'homogénéisation, l'ajustement du pH et la détermination de la force ionique

[Source: ISO 6107-6:2004^[6], définition 92]

4 Interférences

Les effets bactériotoxiques de l'échantillon pour essai peuvent entraîner une réduction du nombre de bactéries viables et des puits contenant des révertants, en raison d'une répression de la croissance des révertants.

Cette méthode inclut la filtration stérile de l'eau et des eaux résiduelles avant essai. Cette filtration permet de séparer les particules solides de l'échantillon pour essai. Ainsi, il est possible que les substances génotoxiques adsorbées sur les particules ne soient pas détectées.

5 Principe

Les bactéries sont exposées, dans des conditions définies, à différentes concentrations de l'échantillon pour essai et incubées pendant 100 min à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ sur des plaques à 24 puits. En raison de cette exposition, les agents génotoxiques contenus dans l'échantillon pour essai peuvent induire des mutations dans un ou deux gènes marqueurs des souches bactériennes utilisées (hisG46 pour TA 100 et hisD3052 pour TA 98) en corrélation avec les concentrations appliquées. L'induction de mutations provoque une augmentation liée à la concentration du nombre de colonies mutantes.

Après exposition des bactéries, le milieu indicateur de réversion (7.40) contenant le colorant indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol (7.7), est ajouté dans les puits. Ensuite, les lots sont répartis sur des plaques à 384 puits (48 puits pour chaque parallèle) et incubés pendant 48 h à 72 h (9.3.2, 9.3.3).

L'activité mutagène de l'échantillon pour essai est déterminée en comptant le nombre de puits passant de la couleur pourpre à jaune (pour 48 puits de chaque parallèle), traités avec l'échantillon pour essai dilué ou non, et comparée au témoin négatif.

La plus faible dilution ($1 \rightarrow N$) de l'échantillon pour essai qui n'induit aucun effet mutagène sous toutes les conditions expérimentales (si un effet mutagène est induit par l'échantillon pour essai) est le critère d'évaluation du potentiel mutagène. Des dilutions d'échantillons supérieures à celle-ci ($1 \rightarrow A$, $A < N$) doivent induire un effet mutagène conforme aux critères de la présente Norme internationale dans au moins une souche, sous au moins une condition d'activation (avec ou sans ajout de mélange S9). La valeur LID respective est N . Si aucun effet mutagène n'est observé sous toutes les conditions expérimentales, cette dilution est $1 \rightarrow 1$ et la valeur LID respective est égale à 1.

6 Appareillage et matériaux

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

- 6.1 Incubateur à température et à durée contrôlées, $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
[ISO 11350:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-9462-6eb1050e02e6/iso-11350-2012)
- 6.2 pH-mètre. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-9462-6eb1050e02e6/iso-11350-2012>
- 6.3 Balance analytique.
- 6.4 Stérilisateur à vapeur.
- 6.5 Stérilisateur à sec.
- 6.6 Agitateur magnétique.
- 6.7 Mélangeur rotatif.
- 6.8 Congélateur, pouvant être maintenu à $\leq -18\text{ °C}$ et à $\leq -70\text{ °C}$.
- 6.9 Pipettes, 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml et 25 ml, en verre ou en plastique.
- 6.10 Flacons de stockage, 250 ml et 1 000 ml.
- 6.11 Éprouvettes graduées, 100 ml et 200 ml.
- 6.12 Fioles jaugées, 20 ml, 200 ml et 500 ml.
- 6.13 Filtres stériles, 0,2 μm et 0,45 μm .
- 6.14 Fioles Erlenmeyer, 50 ml, 100 ml et 250 ml.

6.15 Boucles d'ensemencement.

6.16 Pipette multistepper à huit canaux (pipette à répétition).

6.17 Pipettes à huit canaux, 5 µl à 50 µl et 50 µl à 300 µl.

6.18 Spectrophotomètre.

6.19 Plaques à 24 puits et 384 puits en polystyrène stérile transparent à fond et à couvercle plats.

6.20 Photomètre pour microplaques pour plaques à 24 puits et facultativement pour plaques à 384 puits, filtres: 420 nm ± 15 nm et 595 nm ± 10 nm.

6.21 Banc stérile.

6.22 Boîtes de Petri avec nervures d'évacuation, diamètre d'environ 94 mm, hauteur d'environ 16 mm.

6.23 Tubes cryogéniques, stériles, 1 ml, 10 ml.

7 Réactifs, milieux et dilutions

7.1 Généralités. Dans la mesure du possible, utiliser des produits chimiques de «qualité réactif». Si des hydrates de composés anhydriques ou des hydrates différents de ceux spécifiés sont utilisés, s'assurer que la masse du composé principal est appropriée.

Si nécessaire, effectuer un autoclavage pendant 20 min à 121 °C ± 2 °C. Couvrir les récipients de façon non hermétique (par exemple avec une feuille d'aluminium). Ne jamais fermer hermétiquement.

7.2 Eau, de qualité 1, conformément à l'ISO 3696, ou eau ayant une conductivité ≤ 5 µS/cm.

S'il est nécessaire d'utiliser de l'eau stérile, stériliser par filtration stérile (0,2 µm) ou par autoclavage. L'eau spécifiée ici est également utilisée pour la dilution fractionnée de l'échantillon pour essai.

7.3 Souches de contrôle. Utiliser des souches mutantes de *Salmonella* Typhimurium LT2, qui permettent de détecter les mutations ponctuelles, pour déterminer le potentiel mutagène d'un échantillon pour essai. Étant donné que les mutations ponctuelles peuvent être subdivisées en deux classes (mutations de changement de phase et substitutions de paires de base), les deux souches de contrôle TA 98 et TA 100 sont utilisées. TA 98 contient, comme marqueur, la mutation de changement de phase (type +2) hisD3052, tandis que TA 100 contient la substitution de paires de base hisG46.

De plus, les deux souches doivent avoir les propriétés génétiques suivantes:

- elles contiennent le plasmide pKM101, codant pour la résistance à l'ampicilline;
- elles sont toutes «deep rough», c'est-à-dire partiellement déficientes en chaînes latérales lipopolysaccharidiques, ce qui permet également à de plus grosses molécules de pénétrer la paroi cellulaire bactérienne et de provoquer des mutations;
- en raison d'une mutation dans *uvrB*, la capacité des souches de contrôle à réparer les dommages de l'ADN est limitée et la probabilité pour que les dommages de l'ADN provoquent des mutations est augmentée.

NOTE L'utilisation d'autres souches de contrôle est décrite dans l'Annexe K.

- 7.4 **2-Aminoanthracène (2-AA)**, $C_{14}H_{11}N$, numéro CAS: 613-13-8.
- 7.5 **Sel sodique d'ampicilline**, $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$, numéro CAS: 69-52-3.
- 7.6 **D-Biotine**, $C_{10}H_{16}N_2O_3S$, numéro CAS: 58-85-5.
- 7.7 **Pourpre de bromocrésol**, sel sodique, numéro CAS: 62625-30-3.
- 7.8 **Acide citrique monohydraté**, $C_6H_8O_7$, H_2O , numéro CAS: 5949-29-1.
- 7.9 **Diméthylsulfoxyde**, DMSO, C_2H_6SO , numéro CAS: 67-68-5.
- 7.10 **D-Glucose**, anhydre, $C_6H_{12}O_6$, numéro CAS: 50-99-7.
- 7.11 **Sel disodique de D-Glucose-6-phosphate hydraté**, G-6-P- Na_2 , $C_6H_{11}Na_2O_9P$, $2H_2O$, numéro CAS: 3671-99-6.
- 7.12 **Solution d'acide chlorhydrique**, HCl, $c(HCl) = 1 \text{ mol/l}$.
- 7.13 **Chlorure de magnésium hexahydraté**, $MgCl_2$, $6H_2O$, numéro CAS: 7791-18-6.
- 7.14 **Sulfate de magnésium heptahydraté**, $MgSO_4$, $7H_2O$, numéro CAS: 10034-99-8.
- 7.15 **Chlorure de potassium**, KCl, numéro CAS: 7447-40-7.
- 7.16 **Hydrogénophosphate de dipotassium**, K_2HPO_4 , numéro CAS: 7758-11-4.
- 7.17 **Hydrogénophosphate de sodium et d'ammonium tétrahydraté**, $NaNH_4HPO_4$, $4H_2O$, numéro CAS: 7583-13-3.
- 7.18 **Chlorure de sodium**, NaCl, numéro CAS: 7647-14-5.
- 7.19 **Dihydrogénophosphate de sodium**, anhydre, NaH_2PO_4 , numéro CAS: 7558-80-7.
- 7.20 **Hydrogénophosphate de disodium**, anhydre, Na_2HPO_4 , numéro CAS: 7558-79-4.
- 7.21 **Solution d'hydroxyde de sodium**, $c(NaOH) = 1 \text{ mol/l}$.
- 7.22 **Sel sodique de β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate**, NADP, H_2O , $C_{21}H_{27}N_7NaO_{17}P_3$, H_2O , numéro CAS: 698999-85-8.
- 7.23 **Nitrofurantoïne (NF)**, numéro CAS: 67-20-9.
- 7.24 **4-Nitro-o-phénylènediamine (4-NOPD)**, numéro CAS: 99-56-9.
- 7.25 **Poudre pour bouillon nutritif¹⁾**.
- 7.26 **Fraction S9** (broyat de foie; induit par le phénobarbital/la β -naphthoflavone)¹⁾.

1) Ce réactif est disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

7.27 L-Histidine, $C_6H_9N_3O_2$, numéro CAS: 71-00-1.

7.28 Tampon phosphate.

7.28.1 Tampon dihydrogénophosphate de sodium, $c(NaH_2PO_4) = 0,2 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 14,39 g de NaH_2PO_4 (ou 16,55 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) dans 600 ml d'eau (7.2).

7.28.2 Tampon hydrogénophosphate de disodium, $c(Na_2HPO_4) = 0,2 \text{ mol/l}$. Dissoudre 28,39 g de Na_2HPO_4 dans 1 000 ml d'eau (7.2).

Ajouter le tampon dihydrogénophosphate de sodium (7.28.1) au tampon hydrogénophosphate de disodium (7.28.2) jusqu'à ce qu'une valeur pH de 7,4 soit atteinte et passer à l'autoclave. Conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution est stable pendant au moins un an.

7.29 Solution de D-biotine. Dissoudre 12,2 mg de D-biotine (7.6) dans 100 ml d'eau (7.2) par ébullition. Après refroidissement, stériliser par filtration (filtre de $0,2 \mu\text{m}$). Conserver des aliquotes de 10 ml à une température inférieure ou égale à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ dans des tubes cryogéniques stériles (6.23). Les solutions aqueuses conservées sous forme d'aliquotes congelées sont stables pendant au moins un an.

7.30 Solution de L-histidine. Dissoudre 50 mg de L-histidine (7.27) dans 50 ml d'eau (7.2) et stériliser par filtration (filtre de $0,2 \mu\text{m}$). Conserver des aliquotes de 1,5 ml à une température inférieure ou égale à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ dans des tubes cryogéniques stériles (6.23). Les solutions aqueuses conservées sous forme d'aliquotes congelées sont stables pendant au moins un an.

7.31 Solution de glucose-6-phosphate. Dissoudre 0,68 g de D-glucose-6-phosphate (7.11) dans 10 ml d'eau (7.2) et stériliser par filtration (filtre de $0,2 \mu\text{m}$). Conserver des aliquotes (par exemple $200 \mu\text{l}$) à une température inférieure ou égale à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ dans des tubes cryogéniques stériles (6.23). Les solutions aqueuses conservées sous forme d'aliquotes congelées sont stables pendant au moins un an.

7.32 Solution de NADP, $c(NADP) = 0,04 \text{ mol/l}$. Dissoudre la masse appropriée de NADP dans 10 ml d'eau (7.2) de façon à obtenir une concentration finale de $0,04 \text{ mol/l}$ et stériliser par filtration (filtre de $0,2 \mu\text{m}$). Conserver des aliquotes (par exemple $700 \mu\text{l}$) à une température inférieure ou égale à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ dans des tubes cryogéniques stériles (6.23). Les solutions aqueuses conservées sous forme d'aliquotes congelées sont stables pendant au moins un an.

Différents hydrates de NADP sont disponibles. La masse moléculaire réelle est spécifiée dans la fiche technique du produit. Calculer la quantité de NADP nécessaire en fonction de la masse moléculaire indiquée.

7.33 Solution de chlorure de potassium. Dissoudre 74,56 g de KCl (7.15) dans 1 000 ml d'eau (7.2) et passer à l'autoclave. Conserver à température ambiante. La solution est stable pendant au moins un an.

7.34 Solution de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. Dissoudre 50,83 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (7.13) dans 1 000 ml d'eau (7.2) et passer la solution à l'autoclave. Conserver à température ambiante. La solution est stable pendant au moins un an.

7.35 Solution de pourpre de bromocrésol. Dissoudre 51 mg de sel sodique de pourpre de bromocrésol (7.7) dans 30 ml d'eau (7.2). Préparer cette solution immédiatement avant d'ajouter le milieu indicateur de réversion (7.40).

7.36 Solution d'ampicilline. Dissoudre 500 mg d'ampicilline (7.5) dans 10 ml d'eau (7.2) et stériliser par filtration (filtre de $0,2 \mu\text{m}$). Conserver des aliquotes de $500 \mu\text{l}$ à une température inférieure à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ dans des tubes cryogéniques stériles (6.23). La solution est stable pendant au moins six mois.

7.37 Milieu de croissance. Dissoudre 4,7 g de poudre pour bouillon nutritif²⁾ et 0,31 g de chlorure de sodium (7.18) dans 200 ml d'eau (7.2). Ajuster le pH à $7,5 \pm 0,1$. Compléter à 250 ml avec de l'eau (7.2) et passer cette solution à l'autoclave.

On doit obtenir les concentrations finales suivantes dans le milieu de croissance:

- 7,5 g/l d'extrait de viande;
- 7,5 g/l de peptone;
- 5,0 g/l de chlorure de sodium.

Les solutions conservées dans des conditions stériles sous forme d'aliquotes congelées sont stables pendant au moins un an.

7.38 Milieu d'exposition. Préparer un milieu d'incubation des bactéries avec l'échantillon contenant une faible quantité de L-histidine pour supporter quelques divisions cellulaires.

Dissoudre *consécutivement* les ingrédients suivants dans 900 ml d'eau:

- 0,2 g de sulfate de magnésium heptahydraté (7.14);
- 2,0 g d'acide citrique (7.8);
- 10,0 g d'hydrogénophosphate de dipotassium (7.16);
- 3,5 g d'hydrogénophosphate de sodium et d'ammonium tétrahydraté (7.17);
- 4,0 g de D-glucose (7.10).

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau (7.2), ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$, si nécessaire, et stériliser par filtration (filtre de 0,2 μm). Conserver le milieu entre 2 °C et 8 °C. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/501ad384-8b50-4554-942f-000000000000/iso-11350-2012>

Pour 100 ml, ajouter 0,6 ml de solution de D-biotine (7.29) et 0,1 ml de solution de L-histidine (7.30) dans des conditions stériles. Ne préparer que la quantité de milieu nécessaire pour les deux prochaines semaines. Conserver le milieu entre 2 °C et 8 °C.

7.39 Milieu d'exposition concentré. Dissoudre *consécutivement* les ingrédients suivants dans 70 ml d'eau:

- 0,2 g de sulfate de magnésium heptahydraté (7.14);
- 2,0 g d'acide citrique (7.8);
- 10,0 g d'hydrogénophosphate de dipotassium (7.16);
- 3,5 g d'hydrogénophosphate de sodium et d'ammonium tétrahydraté (7.17);
- 4,0 g de D-glucose (7.10).

Compléter à 93 ml avec de l'eau (7.2), ajuster le pH, si nécessaire, et stériliser par filtration (filtre de 0,2 μm). Conserver le milieu concentré entre 2 °C et 8 °C.

Ajouter 6 ml de solution de D-biotine (7.29) et 1 ml de solution de L-histidine (7.30) dans des conditions stériles. Ne préparer que la quantité de milieu nécessaire pour les deux prochaines semaines. Conserver le milieu concentré entre 2 °C et 8 °C.

7.40 Milieu indicateur de réversion. Préparer un milieu d'indication du pH sans L-histidine.

2) Utiliser une poudre pour bouillon nutritif contenant 40 % d'extrait de viande, 40 % de peptone et 20 % de chlorure de sodium.

7.40.1 Solution I. Dissoudre les ingrédients suivants dans 950 ml d'eau, dans l'ordre ci-dessous:

- 0,4 g de sulfate de magnésium heptahydraté (7.14);
- 4,0 g d'acide citrique (7.8);
- 20,0 g d'hydrogénophosphate de dipotassium (7.16);
- 7,0 g d'hydrogénophosphate de sodium et d'ammonium tétrahydraté (7.17).

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau (7.2) et ajouter 30,0 ml de solution de pourpre de bromocrésol (7.35). Ajuster le pH à $7,3 \pm 0,1$. Transférer deux volumes identiques de solution dans deux flacons de 1 000 ml et passer à l'autoclave.

7.40.2 Solution II. Dissoudre 8,0 g de D-glucose (7.10) dans 800 ml d'eau (7.2). Ajuster le pH à $7,3 \pm 0,1$. Transférer les deux moitiés de la solution dans deux flacons de 1 000 ml et passer à l'autoclave.

7.40.3 Mélange et conservation. Après refroidissement à température ambiante, mélanger 515 ml de solution I (7.40.1) avec 400 ml de solution II (7.40.2) dans des conditions stériles. Ajouter 20 ml de solution de D-biotine (7.29) dans chaque flacon, dans des conditions stériles.

Conserver le milieu à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le milieu est stable pendant au moins un mois.

7.41 Solutions de contrôle.

7.41.1 Témoins négatifs. Pour préparer les témoins négatifs, utiliser toujours le même solvant que pour les échantillons à analyser. Il s'agit en général d'eau (7.2) pour l'analyse d'échantillons d'eau et de DMSO (7.9) pour l'analyse de substances chimiques.

7.41.2 Témoins positifs. En général, dissoudre 10 mg de chaque témoin positif dans 10 ml de DMSO (7.9). Dans des tubes cryogéniques, préparer des aliquotes de 50 μ l sous forme de solutions mères et les conserver à une température inférieure ou égale à -18 °C. Dans ces conditions, les solutions mères sont stables pendant au moins un an. Le jour de l'essai, décongeler une aliquote.

7.41.3 Souche TA 98 sans mélange S9. Utiliser de la 4-nitro-o-phénylènediamine (4-NOPD) (7.24) comme témoin positif pour la souche TA 98 sans mélange S9.

Diluer la solution mère à 1→2 avec du DMSO (7.9). Cette dilution est utilisée pendant l'essai.

7.41.4 Souche TA 100 sans mélange S9. Utiliser de la nitrofurantoïne (NF) (7.23) comme témoin positif pour la souche TA 100 sans mélange S9.

Diluer la solution mère à 1→80 avec du DMSO. Cette dilution est utilisée pendant l'essai.

7.41.5 Souche TA 98 avec mélange S9. Utiliser du 2-aminoanthracène (2-AA) (7.4) comme témoin positif pour la souche TA 98 avec mélange S9.

Diluer la solution mère à 1→200 avec du DMSO. Cette dilution est utilisée pendant l'essai.

7.41.6 Souche TA 100 avec mélange S9. Utiliser du 2-aminoanthracène (2-AA) (7.4) comme témoin positif pour la souche TA 100 avec mélange S9.

Diluer la solution mère à 1→50 avec du DMSO. Cette dilution est utilisée pendant l'essai.