

---

---

**Qualité de l'eau — Lignes directrices pour  
essais d'inhibition de la croissance algale  
avec des matières peu solubles, composés  
volatiles, métaux et eaux résiduaires**

*Water quality — Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly  
soluble materials, volatile compounds, metal and waste water*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 14442:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-2333b94f73a3/iso-14442-1999>



**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 14442:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-2333b94f73a3/iso-14442-1999)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-2333b94f73a3/iso-14442-1999>

© ISO 1999

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 22 734 10 79  
E-mail [copyright@iso.ch](mailto:copyright@iso.ch)  
Web [www.iso.ch](http://www.iso.ch)

Version française parue en 2000

Imprimé en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
1 <b>Domaine d'application.....</b>	<b>1</b>
2 <b>Caractérisation analytique des matériaux d'essai et confirmation des concentrations et de la stabilité .....</b>	<b>2</b>
3 <b>Substances organiques pures peu solubles .....</b>	<b>3</b>
3.1 <b>Généralités .....</b>	<b>3</b>
3.2 <b>Préparation de solutions saturées.....</b>	<b>3</b>
3.3 <b>Addition de solvants .....</b>	<b>4</b>
3.4 <b>Dispersion à l'aide d'un agent émulsifiant.....</b>	<b>5</b>
3.5 <b>Interférence avec la croissance algale et son mesurage .....</b>	<b>5</b>
4 <b>Mélanges peu solubles de substances organiques.....</b>	<b>6</b>
4.1 <b>Généralités .....</b>	<b>6</b>
4.2 <b>Préparation des milieux d'essai.....</b>	<b>7</b>
4.3 <b>Exécution de l'essai .....</b>	<b>7</b>
5 <b>Matériaux solides inorganiques peu solubles.....</b>	<b>7</b>
6 <b>Substances volatiles .....</b>	<b>8</b>
6.1 <b>Généralités .....</b>	<b>8</b>
6.2 <b>Système d'essai et milieu de culture.....</b>	<b>9</b>
6.3 <b>Mode opératoire de l'essai.....</b>	<b>9</b>
6.4 <b>Interférences avec la croissance algale .....</b>	<b>9</b>
7 <b>Eaux résiduelles et échantillons environnementaux contenant de l'eau et des sédiments .....</b>	<b>10</b>
8 <b>Échantillons colorés et/ou turbides.....</b>	<b>11</b>
9 <b>Métaux et composés métalliques.....</b>	<b>12</b>
9.1 <b>Généralités .....</b>	<b>12</b>
9.2 <b>Tamponnage du pH .....</b>	<b>13</b>
9.3 <b>Tamponnage des métaux.....</b>	<b>13</b>
10 <b>Interprétation des résultats .....</b>	<b>13</b>
<b>Annexe A (informative) Méthode d'échantillonnage pour les essais portant sur des substances volatiles, utilisant un système d'essai clos partiellement rempli.....</b>	<b>15</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>16</b>

## 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 3.

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 de la présente Norme internationale 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.

La Norme internationale ISO 14442 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

ISO 14442:1999  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-2333b94f73a3/iso-14442-1999>

# Qualité de l'eau — Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, composés volatiles, métaux et eaux résiduaires

## 1 Domaine d'application

Les présentes lignes directrices ont pour objectif de fournir des modes opératoires applicables aux essais d'inhibition de la croissance algale impliquant des substances difficiles, lorsque ces essais n'entrent pas dans le domaine d'application de l'ISO 8692 et de l'ISO 10253.

Les principaux sujets traités dans ces lignes directrices sont les méthodes de préparation de la substance d'essai ainsi que les modes opératoires nécessaires pour effectuer ces essais dans les règles de l'art. Ces lignes directrices sont applicables aux substances d'essai suivantes:

- a) composés organiques purs peu solubles;
- b) mélanges de substances organiques peu solubles;
- c) matériaux minéraux peu solubles;
- d) substances volatiles;
- e) eaux résiduaires et échantillons environnementaux contenant de l'eau et des sédiments;
- f) échantillons colorés et/ou turbides;
- g) composés de métaux lourds.

Les méthodes d'addition suivantes sont couvertes:

- directe;
- dispersion;
- fractions en suspension dans l'eau et fractions solubles dans l'eau.

Certaines lignes directrices traitant des modes opératoires d'analyse et de l'interprétation des résultats sont également incluses.

Les références faites à des documents décrivant le contexte présidant aux essais sur des substances difficiles sont récapitulées dans la bibliographie.

## 2 Caractérisation analytique des matériaux d'essai et confirmation des concentrations et de la stabilité

La caractérisation analytique des substances et matériaux pour essai ainsi que la confirmation de leur concentration et de leur stabilité dans l'environnement pour essai est un souci majeur pour les autorités réglementaires. Ces activités ne font normalement pas partie intégrante des méthodes d'essai d'inhibition de la croissance algale développées dans les Normes internationales.

Cependant, il peut exister des situations dans lesquelles l'analyse peut contribuer à mieux définir les conditions d'exposition des matériaux et des substances chimiques d'essai et/ou à faciliter l'interprétation des résultats.

Les caractéristiques importantes des substances et matériaux peuvent être évaluées à partir des caractéristiques de base telles que la solubilité dans l'eau, le coefficient de partage ( $\log P_{ow}$ ), la constante de Henry, la stabilité photochimique et hydrolytique ainsi que la biodégradabilité.

Il est fortement conseillé de procéder à une analyse des concentrations de la substance chimique d'essai, concentrations qui sont exigées dans le cadre du calcul des valeurs CE des substances volatiles (article 6). Si des pertes par adsorption sur les parois des récipients pour essai, ou pendant le transfert des solutions et du milieu de culture, sont à craindre, cette confirmation par analyse sera essentielle. Cet aspect est également traité dans l'ISO 5667-16.

En raison du caractère statique du système d'essai utilisé pour les essais d'inhibition de la croissance algale, il n'est pas toujours possible d'éviter les pertes de substances dues à la biodégradation (la plupart des cultures algales contenant des bactéries), la photodégradation, l'hydrolyse et/ou l'adsorption. En raison des difficultés inhérentes à la prévention d'une diminution des concentrations mesurées par des moyens techniques, ce phénomène est donc considéré comme acceptable dans le cadre d'essai d'inhibition de la croissance algale.

Dans le cadre d'essais d'inhibition de la croissance algale, il est suggéré de prendre les précautions suivantes pour maintenir à un niveau constant les concentrations de la substance d'essai:

- a) stériliser les milieux de culture et les matériels utilisés pour réduire au minimum les effets de la croissance bactérienne;
- b) changer la qualité de la lumière pour empêcher une photodégradation des substances d'essai;
- c) éviter tout contact avec l'eau avant l'essai pour réduire les risques liés à la décomposition hydrolytique;
- d) traiter la verrerie (par exemple par silanisation);

NOTE Ce type de traitement est plus ou moins efficace selon la substance chimique concernée.

- e) préconditionner la verrerie avec des solutions aux concentrations d'essai avant l'ajout du milieu d'essai.

Si nécessaire et si possible, contrôler par des analyses chimiques l'effet de ces mesures techniques.

L'eau, les eaux résiduaires, les liquides/solides organiques/inorganiques peuvent contenir des composés susceptibles de modifier la composition du milieu de culture algale (par précipitation d'un nutriment inhibiteur, combinaison d'éléments simples, addition de nutriments), et, partant, d'affecter la croissance algale sans implication de composés toxiques. En présence de ce type de problèmes, il est recommandé de déterminer la teneur des principaux composés du matériau d'essai. Parmi ces composés on compte: le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium, les sulfates, les chlorures, l'ammoniac, les nitrates, les phosphates, le cuivre, le cobalt, le nickel, le zinc, le cadmium, les matières organiques [mesurées en termes de demande chimique en oxygène (DCO) et/ou de carbone organique total (COT)].

Si le matériau contient une forte teneur en substances organiques facilement dégradables, la croissance bactérienne qui en résulte peut perturber les mesurages de la croissance algale. Les essais portant sur des eaux résiduaires non traitées (non filtrées, non centrifugées) peuvent entraîner une contamination par d'autres espèces algales.

### 3 Substances organiques pures peu solubles

#### 3.1 Généralités

Une substance pure est une substance constituée d'un composé principal, et de composés secondaires à l'état d'impuretés. On entend par substance peu soluble une substance dont la limite de solubilité dans l'eau est inférieure à 100 mg/l. Cependant, si le phénomène d'inhibition de la croissance se produit à des concentrations bien inférieures à la valeur de solubilité dans l'eau, les substances peu solubles peuvent alors être expérimentées comme des substances solubles dans l'eau (ajoutées via une solution mère dans le milieu d'essai). Cette approche ne s'applique généralement pas aux substances dont la solubilité dans l'eau se situe au-dessous de 1 mg/l à 10 mg/l (substances très peu solubles).

Les méthodes décrites dans le présent article font donc référence à des essais de substances affectant la croissance algale à des concentrations proches de la limite de solubilité dans l'eau, ainsi qu'à des substances ayant une solubilité très faible.

Il n'est pas conseillé de procéder à des essais faisant intervenir des concentrations nominales supérieures à la limite de solubilité. Cependant, il peut arriver que cela se produise si les limites de solubilité dans l'eau ou dans le milieu de culture algale (qui peuvent être différentes) ne sont pas connues avec exactitude, ou bien si une substance se disperse spontanément dans le milieu d'essai.

NOTE Terminologie selon la référence [3] (voir la bibliographie):

Solubilité dans l'eau inférieure à 100 mg/l: «peu soluble».

Solubilité dans l'eau inférieure à 1 mg/l: «très peu soluble».

L'ISO 5667-16 décrit un certain nombre de méthodes permettant de préparer les solutions pour essai des substances pures. Pour préparer les solutions mères, il est conseillé, en général, d'utiliser des moyens mécaniques.

[ISO 14442:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-2333b94f73a3/iso-14442-1999)

#### 3.2 Préparation de solutions saturées

Si la solubilité dans l'eau d'une substance est comprise entre 1 mg/l et 100 mg/l, il est possible de préparer des solutions saturées par addition directe de la substance d'essai. Une solution saturée est en général préparée en agitant (par exemple à l'aide d'un agitateur magnétique, ou en secouant le récipient; voir également 4.2) pendant un certain temps une quantité en excès de la substance d'essai dans le milieu d'essai. Une période de 20 h suffit dans la plupart des cas, mais on peut envisager de la prolonger à trois jours pour obtenir une saturation, à condition que la substance soit stable. Il convient que les agitations prolongées soient faites dans l'obscurité et dans la même gamme de températures que celle de l'essai d'inhibition de la croissance.

Il est conseillé de confirmer l'état d'équilibre en procédant à une analyse chimique. Après une période plus ou moins longue pendant laquelle s'opère la séparation des phases, recueillir la phase limpide et la soumettre à l'essai comme la concentration la plus élevée. Pour éliminer les particules en suspension, il peut s'avérer utile d'avoir recours à une filtration (sur une membrane de 0,45 µm) ou à une centrifugation.

NOTE 1 Certains types de membranes filtrantes peuvent créer des interférences avec la substance soumise à l'essai. Il convient de la choisir en tenant compte des propriétés physico-chimiques de la substance d'essai et des recommandations du fabricant.

D'autres concentrations d'essai peuvent être préparées en diluant la solution saturée avec le milieu d'essai. Pour commencer l'essai, ajouter aux milieux d'essai un petit volume de la suspension concentrée contenant l'algue mise en culture.

NOTE 2 L'inconvénient qu'il y a à préparer les solutions saturées de cette manière réside dans le fait que les impuretés se trouvant à l'état de trace dans la substance d'essai peuvent être accrues dans la solution si elles sont plus solubles que le composé principal. En conséquence, il convient que la quantité de substance soumise à l'essai corresponde au minimum requis pour obtenir une solution saturée de la substance d'essai.

Si possible, préparer des solutions mères supersaturées stables à partir de la substance (c'est-à-dire des solutions mères à des concentrations multipliant par un facteur de 2 à 10 la valeur de saturation) dans le milieu d'essai à l'aide d'un dispositif mécanique d'agitation à grande vitesse (par exemple un mélangeur grande vitesse «Ultra Turrax»<sup>1)</sup>) ou en leur appliquant un traitement aux ultrasons (la fréquence recommandée étant de 20 kHz pour une puissance d'au moins 60 W en sortie) pendant une période pouvant varier de quelques minutes à plusieurs heures. Quelle que soit la méthode, il convient de maintenir une température constante pendant le traitement par refroidissement. Si la séparation des phases se produit immédiatement après la fin du traitement, il est possible d'éliminer les particules (submergées ou flottantes) par filtration sur un papier-filtre (par exemple Schleicher & Schüll 604<sup>2)</sup>) ou par centrifugation. Si cette filtration contribue à éliminer certaines substances dissoutes, il est essentiel de confirmer les concentrations réelles de la solution finale en procédant à une analyse chimique. Les solutions d'essai peuvent être préparées en diluant la solution mère supersaturée.

### 3.3 Addition de solvants

L'utilisation d'un solvant comme vecteur de transfert de la substance dans un milieu d'essai est un moyen très pratique de manipulation des substances organiques d'essai à des concentrations inférieures à 10 mg/l. La concentration recommandée de solvant sera sans effet sur la solubilité des substances mais facilitera un mélange rapide et complet des substances et du milieu d'essai.

Lorsque la concentration de la substance d'essai est inférieure à 1 mg/l, il est possible d'avoir recours, en plus du solvant, aux méthodes décrites en 3.2 pour préparer des solutions saturées.

En principe, n'importe quel solvant organique peut être utilisé à condition qu'il satisfasse aux critères suivants:

- a) ne pas inhiber la croissance algale à la concentration la plus élevée;
- b) être soluble dans l'eau à la concentration recommandée;
- c) ne pas interagir avec les composés du milieu;
- d) ne pas réagir avec la substance d'essai;
- e) ne pas être soumis à une biodégradation rapide;
- f) ne pas interférer avec les conditions d'éclairage.

Il convient que la concentration d'un solvant ne soit pas supérieure à 100 µl/l de milieu d'essai conformément à l'ISO 10253 et l'ISO 8692. En pratique, pour les essais d'inhibition de la croissance algale, cette concentration en solvant est obtenue en ajoutant 10 µl de solvant pour 100 ml de milieu d'essai, l'addition de ce volume de solvant devant être faite avec précision. Utilisés dans les essais d'inhibition de la croissance algale, les solvants tels que l'acétone et le *t*-butanol ont démontré qu'ils remplissaient la plupart des critères indiqués. Le *t*-butanol est, cependant, le moins biodégradable des deux. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un solvant très efficace, mais qui peut, dans certains cas, interagir trop facilement avec les substances expérimentées et l'organisme pour essai. Des essais ont permis de démontrer qu'aucun des solvants, lorsqu'il est utilisé seul à une concentration inférieure ou égale à 1 ml/l (voir la référence [3]), n'a d'effet sur la croissance algale. Dans certains cas exceptionnels, il est possible d'utiliser des concentrations de solvants supérieures à 100 µl/l, pour pouvoir ajouter des concentrations plus élevées de la substance d'essai.

---

1) Le mélangeur grande vitesse «Ultra Turrax» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

2) Le papier-filtre «Schleicher & Schüll 604» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Il est recommandé de préparer une série de concentrations dans le solvant choisi et d'ajouter des parties aliquotes des solutions mères dans les fioles contenant déjà le milieu d'essai et les algues. Des témoins avec et sans solvant devront être ajoutés à cette série de concentrations d'essai. Il convient que la concentration en solvant soit la même pour toutes les solutions soumises à l'essai.

### 3.4 Dispersion à l'aide d'un agent émulsifiant

Il est déconseillé d'utiliser un agent émulsifiant pour préparer des solutions mères ou des dispersions d'essai. Les concentrations nominales d'essai peuvent être facilement bien supérieures à la limite de solubilité dans l'eau, et l'agent émulsifiant peut également influencer sur la disponibilité d'une substance vis-à-vis des cellules d'algue. Toutefois, si les conditions d'exposition avec un émulsifiant sont le reflet des conditions réelles d'exposition (par exemple formulations de pesticides), et que les autres méthodes d'addition s'avèrent impossibles à mettre en œuvre, il est possible d'avoir recours à cette méthode. Il y a lieu de ne pas ajouter de dispersant au produit.

Un émulsifiant, quel qu'il soit, peut être utilisé à condition qu'il réponde aux exigences suivantes:

- a) pas d'effet inhibiteur (direct ou indirect) sur la croissance algale à une concentration de 100 mg/l;
- b) pas ou peu de biodégradation observable sur une période d'exposition de trois jours;
- c) pas d'interférence avec l'équilibre nutritionnel du milieu d'essai.

Des essais ont permis de démontrer que les agents émulsifiants suivants remplissaient les critères énoncés, d'autres peuvent toutefois être utilisés si les propriétés de la substance le nécessitent:

- a) éthers de polyoxyéthylène<sup>3)</sup>;

- b) alkyl polyoxyéthylène sorbitan<sup>4)</sup>;

- c) alkyl sorbitan<sup>5)</sup>.

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-2333b94f73a3/iso-14442-1999>

Une dispersion peut être préparée en mélangeant, en quantités appropriées, la substance d'essai et l'émulsifiant choisi, selon une des méthodes décrites en 3.2. Il convient que la concentration de l'émulsifiant ne dépasse pas 100 mg/l. Le choix de l'émulsifiant le mieux adapté s'opère en évaluant visuellement l'homogénéité de la suspension mère.

D'autres témoins doivent être ajoutés contenant la même concentration d'émulsifiant que dans le milieu d'essai.

### 3.5 Interférence avec la croissance algale et son mesurage

Si les essais portent sur des concentrations nominales de la substance d'essai supérieures à la limite de solubilité ou bien sur des suspensions, la concentration en particules dans le milieu d'essai pourra s'avérer relativement élevée. Un nombre élevé de particules présentes perturbe les mesurages de la croissance effectués à l'aide d'un compte-particules ou d'un spectrophotomètre. Pour cette raison, il convient d'inclure une série de concentrations de la substance d'essai ne contenant pas d'algue pour pouvoir effectuer une correction des mesurages. En général, des concentrations en particules relativement élevées (c'est-à-dire du même niveau de concentration que

3) Le «Brij 56» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

4) Le «Tween 80» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

5) Le «Span 20» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

l'inoculum) sont acceptables au début de l'essai, car leur influence sur les mesurages suivants décroît progressivement à mesure que la croissance algale augmente.

Si les traitements pour réduire les densités des particules (par filtration ou centrifugation) conduisent à une perte non négligeable en substance soluble, il est préférable d'effectuer les essais sans éliminer les particules. Dans certains cas extrêmes, la croissance peut être déterminée par d'autres méthodes ou bien validée par un comptage au microscope des cellules d'algues.

Le mesurage fluorimétrique de pigments extraits à l'aide de solvants (voir la référence [5]) peut s'avérer comme méthode indirecte satisfaisante pour estimer la biomasse algale, ce qui élimine les interférences dues aux particules en suspension. Cette méthode est cependant considérée comme indirecte en ce sens que la quantité de pigments est variable selon les conditions de croissance.

La croissance bactérienne sur des substances pour essai biodégradables ou des substances auxiliaires (telles que solvants ou émulsifiants) est inévitable en ce sens que les cultures d'algues contiennent pratiquement toujours des bactéries. Cette croissance peut cependant être freinée en travaillant autant que possible dans des conditions d'asepsie et en utilisant du matériel et des milieux stériles. Une interférence significative n'est à craindre qu'avec les concentrations les plus élevées (de l'ordre de 10 mg/l à 100 mg/l) de substances facilement dégradables (c'est-à-dire ayant un rapport de DBO<sub>5</sub>/DCO supérieur ou égal à 0,5, DBO<sub>5</sub> étant la demande biochimique en oxygène après 5 jours).

Les solvants et les émulsifiants en particulier peuvent inhiber ou au contraire stimuler la croissance algale. L'effet stimulant est probablement dû aux émissions d'oxyde de carbone ou d'autres nutriments résultant du processus de dégradation (à des concentrations cellulaires élevées, la croissance d'une culture algale est souvent limitée par la disponibilité du carbone). Les effets stimulants peuvent compliquer le calcul des valeurs CE (voir l'article 10).

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 4 Mélanges peu solubles de substances organiques

### 4.1 Généralités

ISO 14442:1999

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe753cd-1b48-4a31-9aba-3333b94f73a3/iso-14442-1999)

On entend par mélanges de substances organiques des agrégats homogènes de plusieurs composés de caractéristiques physico-chimiques et/ou chimiques différentes, et pouvant être séparés par des moyens physiques (par exemple corps gras, mélanges d'isomères) ainsi que des formulations (telles que les pesticides ou les fluides de forages à base d'huile minérale) (voir la référence [3]).

La méthode la mieux adaptée pour expérimenter les mélanges contenant des substances peu solubles et/ou des substances volatiles est la préparation de fractions en suspension dans l'eau (WAF) par agitation et séparation des phases (voir la référence [2]). Une fraction en suspension dans l'eau (WAF) est un milieu aqueux contenant uniquement la fraction d'une substance qui reste dans la phase aqueuse une fois la préparation terminée. Les composés de la substance pour essai peuvent être présents soit sous la forme d'une solution proprement dite, soit d'une émulsion stable. Lorsqu'on les filtre sur des filtres appropriés, on obtient des fractions solubles dans l'eau (WSF).

Comme l'équilibre (supposé) entre la substance pour essai et la phase aqueuse dépend du rapport substance d'essai/liquide, préparer une WAF par concentration d'essai, sans dilution. Si, cependant, la préparation de WAF résulte en des dispersions stables, celles-ci peuvent être traitées ultérieurement conformément au paragraphe 3.4.

Une description complète de la méthode générale de préparation d'une WAF est donnée en 4.2.

Les résultats des essais sur des WAFs sont exprimés en termes de taux de charge et non de concentration, comme c'est généralement le cas. On entend par taux de charge la quantité de substance d'essai à partir de laquelle une WAF a été préparée. Il équivaut à la concentration nominale. Les résultats finaux doivent également être exprimés en termes de EL<sub>50</sub>, EL<sub>10</sub> et NOEL, EL désignant le taux de charge et NOEL désignant le taux de charge sans effet observé.

## 4.2 Préparation des milieux d'essai

Préparer les WAFs en mélangeant, dans des récipients propres, à l'aide d'un appareil approprié, la substance d'essai au milieu de culture algale sur toute une gamme de taux de charge. Il convient que les récipients utilisés pour le mélange soient de forme cylindrique et munis d'un orifice de drainage à proximité du fond par lequel le liquide peut être aspiré (les flacons à tubulure basse vendus dans le commerce sont acceptables). Il est recommandé que la capacité du récipient soit suffisante pour préparer le volume de WAF requis pour l'exposition (et pour l'échantillonnage pour analyse, le cas échéant). Cependant, il convient que la capacité du récipient ne soit pas trop importante pour limiter les espaces de tête tout en maintenant une surface de contact optimale entre le matériau d'essai et le milieu de culture. Il convient que le récipient soit hermétiquement clos à l'aide de bouchons en verre rodé. Les bouchons à vis recouverts de PTFE ou les bouchons en néoprène recouverts d'une feuille d'aluminium soigneusement ajustée conviennent également. Il est recommandé de fermer hermétiquement le récipient pour éviter les pertes de substances volatiles. Il convient de l'incuber dans l'obscurité pour éviter la dégradation photochimique des composés dissous.

Placer dans chacun des récipients un agitateur magnétique (ou tout autre dispositif d'agitation) et y verser le volume approprié de milieu de culture algale. Ajouter le matériau d'essai en dernier à la surface du milieu, en veillant bien à ne pas contaminer l'orifice d'échantillonnage. Le mélange est initié par un vortex s'élevant au tiers de la hauteur. Veiller à ne pas laisser s'étendre le tourbillon de matériau d'essai jusqu'au fond du récipient. S'il apparaît que le matériau d'essai forme une émulsion, il convient de réduire la vitesse d'agitation. Il est nécessaire d'observer la profondeur du tourbillon et l'aspect du mélange.

La durée de mélange peut être déterminée en procédant à une étude de l'équilibrage (avec surveillance analytique) dans les conditions utilisées pour la préparation des WAF. Par exemple, on a observé qu'une durée de mélange comprise entre 20 h et 24 h permet d'obtenir une WAF contenant des composants d'hydrocarbures à l'équilibre entre les phases aqueuse et non dissoute.

Une fois le mélange terminé, laisser reposer le contenu des récipients pendant 1 h à 4 h pour permettre la séparation des phases aqueuse et non dissoute. La phase aqueuse (WAF) doit ensuite être directement transvasée dans les fioles pour essai.

ISO 14442:1999

Veiller à n'entraîner aucun matériau non dissous dans les récipients pour essai lors du transvasement. Les WAF doivent être soumises à l'essai le plus tôt possible, à moins d'avoir pu démontrer que leur composition ne se modifie pas pendant la conservation.

## 4.3 Exécution de l'essai

L'essai débute en ajoutant un petit volume de suspension algale aux WAF. Les WAF contiennent en général un nombre trop élevé de particules pour pouvoir utiliser un compte-particules ou un spectrophotomètre pour déterminer la croissance algale à des taux de charge élevés (taux de charge  $\geq 10$  g/l requis par certains règlements).

Le comptage des cellules algales au microscope peut se faire pour déterminer la croissance algale dans ce type de cas. Cependant, il est possible de tester des WSF à la place des WAFs.

Si la substance d'essai contient une quantité non négligeable de composés biodégradables, la croissance bactérienne peut être considérable. Il convient de la surveiller au microscope (ou en surveillant les canaux concernés d'un compte-particules) et, le cas échéant, d'ajouter dans le rapport d'essai une mention relative à son influence sur les résultats (voir également 3.5).

## 5 Matériaux solides inorganiques peu solubles

Les matériaux dont il est question dans le présent article peuvent être des métaux solides, des composés métalliques, des minéraux, des déchets contenant des minéraux et des produits minéraux. Pour ce type de matériaux, il convient de préparer des WSF conformément à 4.2.

La préparation des WSFs implique la réduction de ces matériaux en poudre suffisamment fine pour permettre leur dispersion dans le milieu d'essai. Il convient que chaque concentration de substance d'essai soit préparée