
**Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la
croissance des algues marines avec
Skeletonema costatum et *Phaeodactylum
tricornutum***

*Water quality — Marine algal growth inhibition test with Skeletonema
costatum and Phaeodactylum tricornutum*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10253:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a424c60d-79f8-4aa0-a9ba-2c24e9a0ae68/iso-10253-2006>



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 10253:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a424c60d-79f8-4aa0-a9ba-2c24e9a0ae68/iso-10253-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a424c60d-79f8-4aa0-a9ba-2c24e9a0ae68/iso-10253-2006>

© ISO 2006

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	1
4 Principe	2
5 Matériels	2
5.1 Organismes d'essai	2
5.2 Eau	3
5.3 Eau de mer	3
5.4 Nutriments	4
6 Appareillage	5
7 Mode opératoire	5
7.1 Préparation du milieu de croissance	5
7.2 Préparation de la préculture et de l'inoculum	5
7.3 Sélection des concentrations de l'essai	6
7.4 Préparation des solutions mères de substance d'essai	6
7.5 Préparation des lots d'essai et des témoins	6
7.6 Incubation	7
7.7 Mesurages	7
8 Critères de validité	7
9 Interprétation des données	8
9.1 Tracé des courbes de croissance	8
9.2 Calcul du pourcentage d'inhibition	8
9.3 Détermination des valeurs de $EC(r)_x$	9
10 Expression des résultats	9
11 Interprétation des résultats	9
12 Reproductibilité	9
13 Rapport d'essai	10
Annexe A (informative) Préparation des gammes de dilution des mélanges en eau de mer (effluents ou éluutriats)	11
Bibliographie	12

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 10253 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 10253:1995), dont elle constitue une révision technique.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a424c60d-79f8-4aa0-a9ba-2c24e9a0ae68/iso-10253-2006>

Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricorutum*

ATTENTION — Il convient que les personnes utilisant la présente Norme internationale soient familiarisées avec les pratiques de laboratoire normales. La présente Norme internationale ne prétend pas couvrir tous les problèmes de sécurité potentiels associés 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 absolument essentiel que les essais requis dans la présente Norme internationale soient menés par du personnel expérimenté.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination de l'inhibition de la croissance des algues marines unicellulaires *Skeletonema costatum* et *Phaeodactylum tricorutum* provoquée par des substances et des mélanges présents dans l'eau de mer.

Cette méthode peut être utilisée pour soumettre à essai des substances facilement solubles dans l'eau et qui ne sont pas sensiblement dégradées ou éliminées d'une autre manière du milieu d'essai.

NOTE Avec les modifications décrites dans l'ISO 14442 et dans l'ISO 5667-16, il est possible de soumettre à essai les effets inhibiteurs de matières organiques et inorganiques peu solubles, de composés volatils, de composés métalliques, d'effluents, d'échantillons d'eaux marines et d'élutriats de sédiments.

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 14442, *Qualité de l'eau — Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec des matières peu solubles, des composés volatils, des métaux et des eaux résiduelles*

3 Termes et définitions

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

3.1

densité cellulaire

nombre de cellules par unité de volume du milieu (x cellules/ml)

3.2
taux de croissance spécifique

μ
taux proportionnel de l'augmentation de la densité cellulaire par unité de temps:

$$\mu = \frac{1}{x} \times \frac{dx}{dt} \text{ (1/jour)}$$

3.3
milieu de croissance

mélange d'eau de mer et de nutriments utilisé pour les précultures et les témoins

3.4
milieu d'essai

mélange d'eau de mer, de nutriments (milieu de croissance 3.3) et de matériel d'essai dans lequel sont incubées les cellules algales

3.5
lot d'essai

mélange d'eau de mer, de nutriments et de matériel d'essai (milieu d'essai 3.4) inoculé avec les algues

3.6
témoin

mélange d'eau de mer, de nutriments (milieu de croissance 3.3) sans matériel d'essai, inoculé avec les algues

3.7
concentration efficace

$EC(r)_x$
concentration de la substance d'essai qui entraîne une réduction de x % du taux de croissance spécifique par rapport à celui des témoins

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a424c60d-79f8-4aa0-a9ba-2c24e9a0ae68/iso-10253-2006>

4 Principe

Des souches monospécifiques d'algues sont cultivées pendant plusieurs générations dans un milieu défini contenant une plage de concentrations de la substance d'essai, préparées en mélangeant des quantités adéquates de concentré de nutriments, d'eau de mer et de solutions mères de la substance d'essai avec un inoculum de cellules algales à croissance exponentielle. Les solutions d'essai sont incubées pendant une période de (72 ± 2) h, pendant laquelle la densité cellulaire est mesurée dans chacune des solutions à intervalles réguliers, au moins toutes les (24 ± 2) h. L'inhibition est mesurée en tant que réduction du taux de croissance spécifique, par rapport aux cultures témoins cultivées dans des conditions identiques.

5 Matériels

5.1 Organismes d'essai

Utiliser l'une quelconque des algues marines suivantes:

- a) *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (CCAP 1077/1C, NIVA BAC 1); ou
- b) *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (CCAP 1052/1A, SAG 1090-1a, NIVA BAC 2).

Ces algues sont des espèces importantes et largement représentées du phytoplancton (phylum *Bacillariophyta*) dans les zones estuariennes et côtières.

Les souches recommandées sont disponibles sous la forme de cultures algales monospécifiques, non axéniques auprès des sources suivantes:

NIVA	Norwegian Institute for Water Research P.O Box 173 Kjelsås N-0411 Oslo Norvège
CCAP	Dunstaffnage Marine Laboratory P O Box 3 Oban Argyll PA37 1QA Royaume-Uni
SAG	Collection of Algal Cultures University of Göttingen Albrecht-von-Haller Institute for Plant Science Untere Karspüle 2 37073 Göttingen Allemagne

Les cultures mères peuvent être conservées dans le milieu décrit en 7.1. Il est nécessaire de procéder à des repiquages réguliers. Des intervalles hebdomadaires peuvent s'avérer nécessaires dans le cas de *Skeletonema*, alors que des intervalles de deux ou de trois semaines peuvent suffire dans le cas de *Phaeodactylum*. Les cultures mères peuvent aussi être conservées pendant des périodes plus longues dans des milieux algaux plus riches tels que ceux recommandés par la collection de souches. Il est recommandé de conserver la culture mère dans le milieu décrit en 7.1 et dans une phase de croissance exponentielle, juste avant de préparer la préculture pour essai comme décrit en 7.2.

NOTE Comme pour un grand nombre d'algues d'eau douce, il est aussi possible de conserver la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* pendant plusieurs mois dans des billes d'alginate, sans qu'elle perde sa viabilité^[1]. Les algues peuvent être libérées des billes algales au moment voulu de réalisation des essais de toxicité^[1].

5.2 Eau

Toute l'eau utilisée pour la préparation de l'eau de mer synthétique, du milieu de croissance et des solutions de substance d'essai doit être déionisée ou d'une pureté équivalente. Veiller tout particulièrement à éviter la contamination de l'eau par des substances inorganiques ou organiques pendant la préparation et la conservation. Il ne faut pas utiliser de matériel fabriqué avec du cuivre.

5.3 Eau de mer

Pour la culture et l'essai de *Phaeodactylum*, le milieu de croissance (7.1) est obtenu en ajoutant des nutriments à de l'eau de mer naturelle [salinité = (30 ± 5) g/kg] ou synthétique (salinité approximative = 33 g/kg). Dans le cas de *Skeletonema*, l'utilisation d'eau de mer naturelle peut s'avérer nécessaire pour la perpétuation des souches à long terme et peut aussi s'avérer nécessaire pour le milieu d'essai, car un milieu d'eau de mer synthétique peut ne pas toujours supporter la croissance minimale satisfaisant aux critères de qualité de l'essai. Si de l'eau de mer naturelle est utilisée, il faut faire attention à garantir qu'elle n'est pas polluée.

1) Les billes d'algues fournies par MICROBIOTESTS Inc., Venecoweg 19, 9810 Nazareth, Belgique, Tél. (32) 9 380 8545, Fax (32) 9 380 8546, courriel microbiotests@skynet.be, sont un exemple convenable de produit 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 ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il peut être démontré qu'ils permettent d'obtenir les mêmes résultats.

Préparer l'eau de mer synthétique d'après la composition indiquée dans le Tableau 1 (salinité approximative = 33 g/kg). Tous les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique.

Tableau 1 — Eau de mer synthétique

Sel	Concentration de sel dans l'eau de mer synthétique g/l
NaCl	22
MgCl ₂ ·6H ₂ O	9,7
Na ₂ SO ₄ (anhydre)	3,7
CaCl ₂ (anhydre)	1,0
KCl	0,65
NaHCO ₃	0,20
H ₃ BO ₃	0,023

Filtrer l'eau de mer sur une membrane filtrante de 0,45 µm pour éliminer les particules et les algues.

5.4 Nutriments

Préparer trois solutions mères nutritives avec de l'eau, selon les compositions indiquées dans le Tableau 2.

NOTE Ces solutions mères sont éventuellement diluées (voir 7.1 et l'Annexe A), afin d'obtenir les concentrations finales des nutriments dans les solutions d'essai.

Tous les produits chimiques utilisés doivent être des réactifs de qualité reconnue.

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane de 0,2 µm. Il est aussi possible de stériliser les solutions mères 1 et 3 en autoclave à 120 °C pendant au moins 15 min.

Conserver les solutions mères à l'abri de la lumière à 4 °C.

Tableau 2 — Solutions mères nutritives

Nutriment	Concentration dans la solution mère	Concentration finale dans la solution d'essai
Solution mère 1		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	48 mg/l	149 µg/l (Fe)
MnCl ₂ ·4H ₂ O	144 mg/l	605 µg/l (Mn)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	45 mg/l	150 µg/l (Zn)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,157 mg/l	0,6 µg/l (Cu)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,404 mg/l	1,5 µg/l (Co)
H ₃ BO ₃	1 140 mg/l	3,0 mg/l (B)
Na ₂ EDTA	1 000 mg/l	15,0 mg/l
Solution mère 2		
Chlorhydrate de thiamine	50 mg/l	25 µg/l
Biotine	0,01 mg/l	0,005 µg/l
Vitamine B ₁₂ (cyanocobalamine)	0,10 mg/l	0,05 µg/l
Solution mère 3		
K ₃ PO ₄	3,0 g/l	3,0 mg/l; 0,438 mg/l P
NaNO ₃	50,0 g/l	50,0 mg/l; 8,24 mg/l N
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O	14,9 g/l	14,9 mg/l; 1,97 mg/l Si

6 Appareillage

Tout le matériel entrant en contact avec le milieu d'essai doit être fabriqué en verre ou à partir d'un matériau chimiquement inerte.

Utiliser l'appareillage normal de laboratoire en sus de ce qui suit.

6.1 Caisson ou **pièce à température contrôlée**, avec un tube fluorescent blanc fournissant un éclairage uniforme continu, convenant aux exigences de luminosité spécifiées pour l'essai en 7.6.

6.2 Appareillage pour le mesurage de la densité cellulaire des algues, de préférence un compteur de particules ou un microscope sur cellule de comptage.

Sinon, déterminer l'état de croissance des cultures algales par un mode opératoire indirect, en utilisant par exemple un fluorimètre (par exemple fluorescence *in vitro*^[2]), lorsqu'il est suffisamment sensible et s'il est démontré que sa corrélation avec la densité cellulaire est suffisamment élevée. L'appareillage utilisé doit être capable de mesurer exactement des densités cellulaires aussi faibles que la densité cellulaire de l'inoculum et de faire la distinction entre la croissance algale et les effets perturbateurs, par exemple présence de particules et couleur de l'échantillon. Des spectrophotomètres peuvent être suffisamment sensibles pour mesurer 10^4 cellules/ml à condition qu'une longueur de trajet suffisante (jusqu'à 10 cm) puisse être utilisée. Cependant, cette technique est particulièrement sensible aux interférences des matières en suspension et des substances colorées à de faibles densités cellulaires.

6.3 Flacons de culture, par exemple des flacons coniques d'une capacité de 250 ml avec bouchon perméable à l'air.

6.4 Appareillage pour filtration sur membrane, filtres de diamètre moyen de pore de 0,2 μm et de 0,45 μm .

6.5 Autoclave.

[ISO 10253:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a424c60d-79f8-4aa0-a9ba-2c24e9a0ae68/iso-10253-2006)

6.6 pH-mètre.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a424c60d-79f8-4aa0-a9ba-2c24e9a0ae68/iso-10253-2006>

7 Mode opératoire

7.1 Préparation du milieu de croissance

Ajouter 15 ml de solution mère nutritive 1, 0,5 ml de solution mère nutritive 2 et 1 ml de solution mère nutritive 3 (voir Tableau 2) à environ 900 ml d'eau de mer naturelle ou synthétique (5.3); puis compléter à 1 l avec la même eau de mer.

Ajuster le pH à $8,0 \pm 0,2$ en ajoutant une solution diluée d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium.

NOTE La complexation de métaux lourds par une concentration relativement élevée d'EDTA présente dans le milieu nutritif peut empêcher l'essai sur les effluents contenant des métaux lourds. Pour des directives, voir l'ISO 14442.

7.2 Préparation de la préculture et de l'inoculum

Il est nécessaire de démarrer une préculture de deux à quatre jours avant le début de l'essai (voir la Note en 5.1).

Afin de conserver la croissance exponentielle jusqu'au début de l'essai, ajouter assez de cellules de la culture mère d'algues au milieu de croissance (7.1) pour obtenir une densité cellulaire suffisamment faible de, par exemple, 2×10^3 cellules/ml à 10^4 cellules/ml pour trois jours de préculture. Incuber la préculture dans les mêmes conditions que celles de l'essai. Mesurer la densité cellulaire de la préculture juste avant l'utilisation pour calculer le volume adéquat de l'inoculum.