

---

---

**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 résiduaires**

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

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 14442:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c16eb07e-7485-498a-bfbd-256444127679/iso-14442-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c16eb07e-7485-498a-bfbd-256444127679/iso-14442-2006>



**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 14442:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c16eb07e-7485-498a-bbfd-256444127679/iso-14442-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c16eb07e-7485-498a-bbfd-256444127679/iso-14442-2006>

© 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
<b>1</b> <b>Domaine d'application.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b> <b>Caractérisation analytique des matériaux d'essai et confirmation des concentrations et de la stabilité .....</b>	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Substances organiques peu solubles .....</b>	<b>3</b>
4.1 Généralités .....	3
4.2 Préparation de solutions saturées et sursaturées .....	4
4.3 Addition de solvants.....	4
4.4 Dispersion à l'aide d'un agent émulsifiant .....	5
4.5 Interférence avec la croissance algale et son mesurage .....	6
<b>5</b> <b>Mélanges peu solubles de substances organiques.....</b>	<b>7</b>
5.1 Généralités .....	7
5.2 Préparation des milieux d'essai .....	7
5.3 Réalisation de l'essai.....	8
<b>6</b> <b>Matériaux solides inorganiques peu solubles.....</b>	<b>8</b>
<b>7</b> <b>Substances volatiles .....</b>	<b>9</b>
7.1 Généralités .....	9
7.2 Système d'essai et milieu de culture .....	10
7.3 Rendement de l'essai .....	10
7.4 Interférences avec la croissance algale .....	10
<b>8</b> <b>Eaux résiduelles et échantillons environnementaux aqueux.....</b>	<b>11</b>
<b>9</b> <b>Échantillons colorés et/ou turbides.....</b>	<b>12</b>
<b>10</b> <b>Métaux et composés métalliques.....</b>	<b>12</b>
10.1 Introduction .....	12
10.2 Modification des modes opératoires d'essai d'inhibition de la croissance algale pour l'essai de matériaux contenant des métaux lourds.....	13
<b>11</b> <b>Tamponnage du pH .....</b>	<b>14</b>
<b>12</b> <b>Interprétation des résultats .....</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 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 14442 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 14442:1999), qui a fait l'objet d'une révision technique.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c16eb07e-7485-498a-bfbd-256444127679/iso-14442-2006>

# 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 résiduaires

**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 de mettre en place 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 conduits conformément à la présente norme soient effectués par un personnel ayant reçu une formation adéquate.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale a pour objectif de fournir des modes opératoires, non couverts par les méthodes décrites dans l'ISO 8692 et l'ISO 10253, applicables aux essais d'inhibition de la croissance algale impliquant des substances difficiles.

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 de façon appropriée. 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 inorganiques 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 relatif aux essais sur des substances difficiles sont récapitulées dans la Bibliographie.

## 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 8692, *Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires*

ISO 10253, *Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec Skeletonema costatum et Phaeodactylum tricornutum*

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

La caractérisation analytique des substances et des matériaux soumis à essai ainsi que la confirmation de leur concentration et de leur stabilité dans l'environnement d'essai est une préoccupation majeure pour les autorités réglementaires. Ces activités ne font normalement pas partie intégrante des méthodes d'essai d'inhibition de la croissance algale développées dans la présente Norme internationale.

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 pour le calcul des valeurs de concentration effective (CE) des substances volatiles (Article 7). Si des pertes de substance ont lieu par adsorption sur les parois des récipients d'essai ou pendant le transfert des solutions et du milieu, cette confirmation analytique sera essentielle. Cet aspect est également spécifié dans l'ISO 5667-16.

En raison du système d'essai sous forme de lots utilisé pour les essais d'inhibition de la croissance algale, il n'est pas toujours possible d'éviter les pertes de substance dues à la biodégradation (la plupart des cultures algales contiennent des bactéries), la photodégradation, l'hydrolyse et/ou l'adsorption. La diminution des concentrations mesurées étant difficile à empêcher par des moyens techniques, elle est considérée comme acceptable dans le cadre des essais 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) stérilisation des milieux de culture et des matériels utilisés pour réduire les effets de la croissance bactérienne;
- b) changement de la qualité de la lumière pour empêcher une photodégradation des substances d'essai;
- c) absence de tout contact de la substance d'essai avec l'eau avant l'essai pour réduire les risques liés à la décomposition par hydrolyse;
- d) traitement de la verrerie (par exemple par silanisation); ce type de traitement est plus ou moins efficace selon la substance chimique concernée;

- e) préconditionnement de la verrerie avec la substance d'essai aux concentrations utilisées au cours de l'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 des algues (par précipitation d'un nutriment limitant, complexation d'éléments essentiels, addition de nutriments) et par voie de conséquence, d'affecter de façon non négligeable la croissance algale sans implication de composés toxiques. En présence de ce type de problèmes, il peut être recommandé de déterminer la teneur de ces composés clés du matériau d'essai. Parmi ces composés, on compte: le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium, les sulfates, les chlorures, l'ammonium, 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 a 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 ou non centrifugées) peuvent entraîner une contamination par d'autres espèces algales.

## 4 Substances organiques peu solubles

### 4.1 Généralités

Une substance pure est une substance constituée d'un composé principal et de composés secondaires à l'état d'impuretés. On entend par substances peu solubles les substances 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 limite de solubilité dans l'eau ou dans le milieu de croissance des algues (la limite de solubilité dans le milieu d'essai peut être différente de celle observée dans l'eau), les substances peu solubles peuvent alors être soumises à l'essai 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 est inférieure à 1 mg/l jusqu'à 10 mg/l (substances très peu solubles).

Les méthodes décrites dans le présent article font donc référence à des essais sur des substances affectant la croissance algale à des concentrations qui correspondent à la limite de solubilité dans l'eau ou qui sont proches de celle-ci, ainsi qu'à des substances très peu solubles.

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

NOTE Terminologie selon Référence [3]:

- 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 soumettre à essai des substances pures. Pour préparer les solutions mères, il est conseillé, en général, d'utiliser des moyens mécaniques.

## 4.2 Préparation de solutions saturées et sursaturées

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 5.1) une quantité en excès de la substance d'essai dans l'eau pendant un certain temps 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 à l'abri de la lumière et à une température équivalente à 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 l'utiliser pour l'essai en tant que 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.

Certains types de membranes 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. Ensuite, pour commencer l'essai, un petit volume de la suspension algale concentrée mise en culture est ajouté aux milieux d'essai.

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 traces dans la substance d'essai peuvent être présentes en plus grande proportion 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 sursaturées stables à partir de la substance dans le milieu d'essai (c'est-à-dire des solutions mères à des concentrations de l'ordre de 2 à 10 fois la valeur de saturation), à l'aide d'un dispositif mécanique d'agitation à grande vitesse [par exemple un mélangeur grande vitesse <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, une température constante doit être maintenue par refroidissement pendant le traitement. 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 élimine 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 sursaturée.

## 4.3 Addition de solvants

L'utilisation d'un solvant comme vecteur de transfert de la substance dans un milieu d'essai est un moyen pratique, approprié à la manipulation des substances organiques soumises à essai à des concentrations inférieures à 10 mg/l. La concentration recommandée de solvant est sans effet sur la solubilité des substances mais facilite 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 4.2 pour préparer des solutions saturées (qui sont traitées ultérieurement comme indiqué en 4.2).

---

1) Le mélangeur grande vitesse «Ultra Turrax» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

2) Le papier-filtre «Schleicher & Schüll 604» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.



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 rapidement biodégradable;
- 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 à l'ISO 8692. En pratique, pour les essais d'inhibition de la croissance algale, cette concentration en solvant peut être obtenue en ajoutant 10 µl de solvant pour 100 ml de milieu d'essai, ce volume de solvant pouvant être ajouté 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 susceptible, dans certains cas, d'interagir plus facilement avec les substances et l'organisme d'essai. Des essais ont permis de démontrer qu'aucun des solvants utilisés seuls n'a d'effet sur la croissance algale jusqu'à une concentration de 1 ml/l (Référence [3]). 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.

## iTeh STANDARD PREVIEW

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

Le groupe témoin contenant le solvant est approprié pour la comparaison avec les groupes traités. Chaque groupe doit avoir la même concentration de solvant que le témoin. Dans le cas d'un bioessai dans lequel le solvant est utilisé conjointement avec le produit chimique d'essai, il est supposé que le solvant n'a aucun effet sur les réponses recherchées et qu'aucune interaction ne se produit entre le produit chimique d'essai et le solvant. Il est possible de vérifier le postulat concernant l'effet du solvant en ajoutant un témoin négatif (c'est-à-dire sans solvant, comme exigé pour toutes les expériences utilisant un solvant). Cependant, à moins que le produit chimique ne soit également soumis à l'essai en l'absence de solvant, il n'est pas possible de vérifier le postulat concernant l'absence d'interaction entre le solvant et le produit chimique. Des lignes directrices supplémentaires sur l'analyse des données issues d'essais incluant un témoin du solvant sont données dans la Référence [18].

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

Il est généralement déconseillé d'utiliser un agent émulsifiant pour préparer des dispersions mères ou d'essai. Les concentrations nominales d'essai peuvent facilement être 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 algales. Toutefois, si les conditions d'exposition avec un émulsifiant sont le reflet des conditions environnementales réelles d'exposition (par exemple formulations des pesticides) et que les autres méthodes d'addition se révèlent irréalisables, il est possible d'avoir recours à cette méthode. Il convient de ne pas ajouter de dispersant aux formulations.

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.

Il a été démontré que les agents émulsifiants suivants remplissaient les critères énoncés mais d'autres agents peuvent être utilisés si les propriétés de la substance d'essai le nécessitent.

- éthers de polyoxyéthylène <sup>3)</sup>;
- alkyl polyoxyéthylène sorbitan <sup>4)</sup>;
- alkyl sorbitan <sup>5)</sup>

Une dispersion peut être préparée en mélangeant, en quantités appropriées, la substance d'essai et l'émulsifiant choisi, selon l'une des méthodes décrites en 4.2. Il convient que la concentration de l'émulsifiant ne dépasse pas 100 mg/l. Le choix de l'émulsifiant le mieux adapté s'effectue 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. L'utilisation des témoins émulsifiants pour l'analyse des données est identique à celle décrite pour les témoins de solvant en 4.3.

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

Si les essais sont réalisés sur des concentrations nominales de la substance d'essai supérieures à sa limite de solubilité ou sur des suspensions, la concentration de particules dans le milieu d'essai peut s'avérer relativement élevée. Un nombre élevé de particules peut perturber les mesurages de la croissance effectués à l'aide d'un compteur de particules ou d'un spectrophotomètre. Pour cette raison, une gamme de concentrations de la substance d'essai ne contenant pas d'algues doit être incluse pour corriger le bruit de fond lors des mesures.

En général, des concentrations de particules relativement élevées (c'est-à-dire du même niveau de concentration que celle de l'inoculum) sont acceptables au début de l'essai car leur influence sur les mesurages ultérieurs diminue progressivement, en raison de la croissance algale.

Si des traitements pour réduire les concentrations de particules (par filtration ou centrifugation) conduisent à une perte importante de 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 être validée par un comptage au microscope des cellules algales.

La mesure fluorimétrique de pigments extraits à l'aide de solvants (Référence [5]) peut être une méthode indirecte intéressante pour estimer la biomasse algale, ce qui élimine les interférences dues aux particules. Cette méthode est cependant indirecte dans la mesure où la teneur en pigments peut varier selon les conditions de croissance.

La croissance bactérienne sur des substances d'essai biodégradables ou des substances auxiliaires (telles que les solvants ou émulsifiants) ne peut être évitée, puisque les cultures d'algues contiennent pratiquement toujours des bactéries. Cette croissance peut cependant être retardée si l'on travaille le plus possible dans des conditions d'asepsie et en utilisant du matériel et des milieux stériles. Une interférence significative n'est à

---

3) Le «Brij 56» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

4) Le «Tween 80» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

5) Le «Span 20» est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.

craindre qu'avec les concentrations d'essai les plus élevées (de l'ordre de 10 mg/l à 100 mg/l) de substances facilement dégradables [ayant, par exemple, un rapport DBO<sub>5</sub>/DCO <sup>6</sup> égal ou supérieur à 0,5].

Les solvants et, en particulier, les émulsifiants peuvent inhiber ou stimuler la croissance algale. L'effet stimulant est probablement dû aux émissions de dioxyde de carbone ou d'autres nutriments résultant du processus de dégradation (à des densités 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 de CE (voir l'Article 12).

## 5 Mélanges peu solubles de substances organiques

### 5.1 Généralités

On entend par mélanges de substances organiques aussi bien des agrégats homogènes d'un certain nombre de composés ayant des caractéristiques physico-chimiques et/ou chimiques différentes, qui ne peuvent pas être facilement décomposés en éléments simples par des moyens physiques (par exemple des corps gras, des mélanges d'isomères), que des produits formulés (préparations telles que les formulations de pesticides ou des fluides de forage à base d'huile minérale <sup>[3]</sup>).

La méthode la mieux adaptée pour soumettre à essai des 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 <sup>[2]</sup>. Une fraction en suspension dans l'eau (WAF) est un milieu aqueux contenant uniquement la fraction de substance qui reste dans la phase aqueuse une fois le mode opératoire de préparation terminé. Les composés de la substance d'essai peuvent se présenter sous la forme soit d'une solution proprement dite, soit d'une émulsion stable. Après filtration sur des filtres appropriés, on obtient des fractions solubles dans l'eau (WSF).

Comme l'équilibre (supposé) entre la substance d'essai et la phase aqueuse dépend du rapport substance d'essai/liquide, on prépare une WAF par concentration d'essai et il convient de ne pas la diluer. Cependant, si la préparation de WAF aboutit à des dispersions stables, celles-ci peuvent être traitées ultérieurement conformément à 4.4.

Une description complète du mode opératoire général de préparation d'une WAF est donnée en 5.2.

Les résultats d'essai sur des WAF 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> et EL<sub>10</sub>, L désignant le taux de charge.

### 5.2 Préparation des milieux d'essai

Les fractions en suspension dans l'eau (WAF) sont préparées pour une plage de taux de charge dans des récipients propres et à l'aide d'un appareillage approprié en mélangeant la substance d'essai au milieu de culture des algues. Les récipients utilisés pour le mélange doivent être de forme cylindrique et munis d'un orifice de drainage à proximité du fond par lequel le liquide peut ainsi être aspiré (les flacons à tubulure basse vendus dans le commerce sont tout à fait acceptables). La capacité du récipient utilisé pour le mélange doit être suffisamment grande pour préparer le volume de WAF requis pour l'exposition (et pour l'échantillonnage pour analyse, le cas échéant).

Elle doit aussi être suffisamment petite pour réduire au minimum l'espace de tête tout en maintenant une surface de contact optimale entre le matériau d'essai et le milieu de culture. Il est préférable de fermer hermétiquement les récipients à l'aide de bouchons en verre rodé, même si les bouchons à vis recouverts de PTFE ou les bouchons en néoprène recouverts d'une feuille d'aluminium soigneusement ajustée peuvent également convenir. Les pertes de substances volatiles sont évitées en fermant hermétiquement les

6) DBO = demande biochimique en oxygène; DCO = demande chimique en oxygène.