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

*Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with
unicellular green algae*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 8692:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5914d7a-ec4d-41c8-93d8-3794c6e82988/iso-8692-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5914d7a-ec4d-41c8-93d8-3794c6e82988/iso-8692-2012>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 8692:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5914d7a-ec4d-41c8-93d8-3794c6e82988/iso-8692-2012>



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 Principe	2
5 Réactifs et milieux	3
6 Appareillage	4
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 Choix des concentrations de la solution pour essai	6
7.4 Préparation de l'échantillon pour essai et des solutions mères	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 Calculs	8
9.1 Représentation graphique des courbes de croissance	8
9.2 Calcul du pourcentage d'inhibition	8
9.3 Détermination de CE_{rx} (par exemple CE_{10} et CE_{50})	9
10 Expression des résultats	9
11 Interprétation des résultats	9
12 Fidélité	9
13 Rapport d'essai	10
Annexe A (informative) Détection rapide de l'inhibition de la croissance algale par les eaux résiduaires	12
Annexe B (informative) Mode opératoire avec des algues provenant de billes d'alginate, avec mesurage direct de la croissance algale dans des cellules spectrophotométriques	15
Annexe C (informative) Mode opératoire d'immobilisation des algues dans des billes d'alginate	21
Bibliographie	23

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 8692 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 8692:2004), qui a fait l'objet d'une révision technique.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 8692:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5914d7a-ec4d-41c8-93d8-3794c6e82988/iso-8692-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5914d7a-ec4d-41c8-93d8-3794c6e82988/iso-8692-2012>

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

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 de détermination de l'inhibition de la croissance des algues vertes unicellulaires par des substances et des mélanges contenus dans l'eau ou par des eaux résiduaires. Cette méthode peut être utilisée avec des substances aisément solubles dans l'eau.

En apportant à cette méthode les modifications spécifiées dans l'ISO 14442 et l'ISO 5667-16, il est possible d'évaluer les effets inhibiteurs des substances inorganiques et organiques faiblement solubles, des composés volatils, des métaux lourds et des eaux résiduaires.

L'Annexe A décrit un essai de détection rapide de l'inhibition de la croissance des algues par des eaux résiduaires.

L'Annexe B décrit un mode opératoire alternatif utilisant des algues provenant de billes d'alginate avec mesurage direct de la croissance algale dans des cellules spectrophotométriques.

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/TR 11044, *Qualité de l'eau — Aspects scientifiques et techniques des essais d'inhibition de croissance d'un lot d'algues*

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 résiduaires*

ISO/TS 20281, *Qualité de l'eau — Lignes directrices relatives à l'interprétation statistique de données écotoxicologiques*

3 Termes et définitions

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

3.1 concentration cellulaire

n
nombre de cellules par unité de volume de milieu

NOTE La concentration cellulaire est exprimée en cellules par millilitre.

3.2 concentration efficace

concentration de l'échantillon pour essai (CE_x) à laquelle un effet de x % est mesuré par rapport au témoin

NOTE Pour désigner sans ambiguïté une valeur CE déterminée à partir du taux de croissance, il est proposé d'utiliser le symbole « CE_r ».

3.3 plus faible dilution sans effet LID

niveau de dilution pour lequel aucune inhibition n'est observée, ou bien uniquement des effets ne dépassant pas la variabilité spécifique à l'essai

NOTE Adapté de l'ISO 15088:2007^[13], 3.5.

3.4 taux de croissance spécifique

μ
taux proportionnel d'augmentation de la concentration cellulaire par unité de temps:

$$\mu = \frac{1}{n} \frac{dn}{dt}$$

où

n est la concentration cellulaire, exprimée en cellules par millilitre;

t est le temps, exprimé en jours.

NOTE Le taux de croissance spécifique est exprimé en jours à la puissance moins un.

[ISO/TR 11044:2008, 3.2]

4 Principe

Des souches d'algues monospécifiques sont mises en culture pendant plusieurs générations dans un milieu défini contenant une gamme de concentrations de l'échantillon pour essai préparé en mélangeant des quantités appropriées de milieu de croissance, d'échantillon pour essai et un inoculum de cellules algales en phase exponentielle de croissance. Les lots d'essai sont incubés pendant une période de (72 ± 2) h, pendant laquelle la concentration cellulaire de chaque solution d'essai est mesurée au moins toutes les 24 h.

L'inhibition est quantifiée par la diminution du taux de croissance spécifique, par comparaison à des cultures témoins réalisées dans des conditions identiques.

5 Réactifs et milieux

5.1 Organisme d'essai, utiliser l'une des deux espèces suivantes d'algue planctonique d'eau douce:

- a) *Desmodesmus subspicatus* (R. Chodat) E. Hegewald et A. Schmidt¹⁾ [86.81 SAG²⁾];
- b) *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak³⁾ [ATCC[®] 22662TM 2), CCAP 278/4²⁾ ou 61.81 SAG²⁾].

NOTE 1 Les deux espèces ne réagissent pas de façon identique aux agents toxiques.

NOTE 2 Ces deux espèces algales sont des algues vertes planctoniques appartenant à l'ordre des Sphaeropleales (Chlorophytes, Chlorophycées), qui se trouvent généralement à l'état unicellulaire en culture.

On peut se procurer les souches recommandées sous forme de cultures monospécifiques et non axéniques auprès de:

— SAG — Sammlung von Algenkulturen Göttingen, Allemagne

www.epsag.uni-goettingen.de (consulté le 2012-01-30);

— ATCC — American Type Culture Collection, États-Unis

www.atcc.org (consulté le 2012-01-30);

— CCAP — Culture Collection of Algae and Protozoa, Royaume-Uni

www.ccap.ac.uk (consulté le 2012-01-30);

— ALCP — Algothèque du Laboratoire de Cryptogamie, France

www.mnhn.fr (consulté le 2012-01-30);

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5914d7a-ec4d-41c8-93d8-579d66290746-8692-2012>

Il est possible de conserver les cultures mères dans le milieu spécifié en 5.3 et 7.1. Cependant, des repiquages fréquents sont nécessaires (une fois par semaine) pour empêcher toute perturbation de la croissance. La culture mère peut se conserver plus longtemps dans des milieux pour algues plus riches, tels que ceux recommandés par la collection de souches.

Sinon, les algues peuvent être conservées pendant plusieurs mois dans des boîtes de gélose ou dans des billes d'alginate⁴⁾ sans perte de viabilité^[1]. Les algues peuvent être facilement retirées de la gélose ou des billes d'alginate (voir l'Annexe C) pour réaliser les essais de toxicité.

Il convient de confirmer l'aspect des cellules et l'identité des organismes d'essai lors d'un examen au microscope.

5.2 Eau, déionisée ou d'une pureté équivalente (conductivité <10 µS/cm), pour la préparation du milieu de croissance et des solutions de substance d'essai.

Veiller à éviter toute contamination de l'eau par des substances inorganiques ou organiques pendant la préparation et le stockage. Ne pas utiliser de matériel en cuivre.

1) Cette espèce était antérieurement connue sous la dénomination de *Scenedesmus subspicatus* Chodat.

2) Les appellations commerciales des souches sont des exemples de souches appropriées disponibles sur le marché. 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 des produits ainsi désignés.

3) Cette espèce était antérieurement connue sous la dénomination de *Selenastrum capricornutum* Prinz. La nouvelle dénomination est couramment citée par les collections de souches.

4) Les billes d'alginate fournies par MicroBioTests Inc., Mariakerke-Gent, Belgique, sont un exemple de produit disponible sur le marché. 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. Des produits équivalents peuvent être utilisés si les critères de validité spécifiés dans le présent document sont respectés.

5.3 Substances nutritives

Préparer quatre solutions mères de substances nutritives dans l'eau, selon les compositions données dans le Tableau 1.

Ces solutions sont finalement diluées (voir 7.1 et 7.4) pour obtenir les concentrations finales en substances nutritives dans les solutions d'essai. Toutefois, les macronutriments peuvent, à l'inverse, être ajoutés directement dans l'eau.

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

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane (diamètre moyen des pores de 0,2 µm) ou par passage à l'autoclave [(120 ± 2) °C, 15 min]. Conserver les solutions à l'abri de la lumière à 4 °C.

La solution mère 4 ne doit pas être stérilisée à l'autoclave pour éviter toute perte par évaporation de NaHCO₃, mais uniquement par filtration sur membrane.

Tableau 1 — Concentrations massiques de substances nutritives dans la solution d'essai

Solution mère	Substance nutritive	Concentration massique de la solution mère	Concentration massique finale dans la solution d'essai
1: Macronutriments	NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l (N: 3,9 mg/l)
	MgCl ₂ , 6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l (Mg: 2,9 mg/l)
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l (Ca: 4,9 mg/l)
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l (S: 1,95 mg/l)
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l (P: 0,36 mg/l)
2: Fe-EDTA	FeCl ₃ , 6H ₂ O	64 mg/l	64 µg/l (Fe: 13 µg/l)
	Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	100 mg/l	100 µg/l
3: Éléments traces	H ₃ BO ₃ ^a	185 mg/l	185 µg/l (B: 32 µg/l)
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	415 mg/l	415 µg/l (Mn: 115 µg/l)
	ZnCl ₂	3 mg/l	3 µg/l (Zn: 1,4 µg/l)
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 µg/l (Co: 0,37 µg/l)
	CuCl ₂ , 2H ₂ O	0,01 mg/l	0,01 µg/l (Cu: 3,7 ng/l)
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	7 mg/l	7 µg/l (Mo: 2,8 µg/l)
4: NaHCO ₃	NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l (C: 7,14 mg/l)

^a H₃BO₃ peut être dissous en ajoutant une solution de NaOH à 0,1 mol/l.

6 Appareillage

Tout le matériel en contact avec le milieu d'essai doit être en verre ou en matière chimiquement inerte.

Appareillage courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Enceinte ou pièce à température contrôlée, pourvue d'une lampe fluorescente blanche, fournissant un éclairage uniforme et continu, répondant aux exigences d'éclairage spécifiées pour l'essai en 7.6.

6.2 Appareil de mesure de la concentration cellulaire algale, de préférence un compte-particules capable de compter les particules de 2,5 µm à 25 µm (diamètres sphériques) ou un microscope à chambre de comptage.

Les concentrations algales peuvent également être déterminées par une méthode indirecte avec, par exemple, un fluorimètre (par exemple fluorescence in vitro^[2] ou fluorescence in vivo induite par le DCMU⁵⁾[3]) de sensibilité

5) DCMU est la 3-(3,4-dichlorophényle)-1,1-diméthylurée (n° CAS 330-54-1).

suffisante, et si cette méthode est suffisamment bien corrélée avec la concentration cellulaire. L'appareil utilisé doit pouvoir permettre de mesurer des concentrations cellulaires aussi faibles que 10^4 cellules/ml et de distinguer la croissance algale des effets perturbateurs, par exemple la présence de matières particulaires et la coloration de l'échantillon. Des spectrophotomètres peuvent être assez sensibles pour mesurer 10^4 cellules/ml à condition qu'un trajet optique suffisant (jusqu'à 10 cm) puisse être utilisé. Cependant, cette technique est particulièrement sensible aux interférences venant de matériaux en suspension et de substances colorées à faibles concentrations cellulaires (voir l'ISO/TR 11044).

6.3 Récipients de culture (en verre), par exemple des fioles coniques de 250 ml avec bouchons perméables à l'air.

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

6.5 Autoclave.

6.6 pH-mètre.

7 Mode opératoire

7.1 Préparation du milieu de croissance

Préparer un milieu de croissance en ajoutant un volume approprié des solutions mères de substances nutritives (5.3) à de l'eau (5.2).

Ajouter à environ 500 ml d'eau (5.2)

— 10 ml de solution mère 1 (5.3);

— 1 ml de solution mère 2 (5.3);

— 1 ml de solution mère 3 (5.3);

— 1 ml de solution mère 4 (5.3).

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

Avant utilisation, équilibrer le milieu en laissant à l'air pendant une nuit ou par un bullage avec de l'air filtré pendant 30 min. Après obtention de l'état d'équilibre, ajuster le pH à $8,1 \pm 0,2$, si nécessaire, en utilisant une solutions d'acide chlorhydrique à 1 mol/l ou une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l.

Ce milieu de croissance est tamponné par l'hydrogénocarbonate et le CO_2 atmosphérique. Différentes valeurs de pH peuvent être obtenues en modifiant la concentration de HCO_3^- et/ou la concentration de CO_2 atmosphérique (cela exige l'utilisation de récipients clos) tel que spécifié dans l'ISO 14442. Si de telles modifications sont nécessaires pour réaliser un essai à une valeur de pH différente spécifique, il convient que cela soit expliqué et enregistré.

7.2 Préparation de la préculture et de l'inoculum

Une préculture doit être lancée deux à quatre jours avant le début de l'essai. Le milieu de croissance (7.1) est ensemencé à une concentration cellulaire suffisamment faible (par exemple 5×10^3 cellules/ml à 10^4 cellules/ml pour une préculture de trois jours) de façon à maintenir la croissance en phase exponentielle jusqu'au début de l'essai. La préculture doit être incubée dans les mêmes conditions que l'essai (7.6).

Cette préculture en phase exponentielle de croissance est utilisée comme inoculum pour l'essai. Mesurer la concentration cellulaire de la préculture immédiatement avant utilisation afin de calculer le volume d'inoculum nécessaire.

7.3 Choix des concentrations de la solution pour essai

Il convient d'exposer les algues à des concentrations de la solution pour essai en suivant une progression géométrique avec un facteur ne dépassant pas 3,2 (par exemple 1,0 mg/l, 1,8 mg/l, 3,2 mg/l, 5,6 mg/l et 10 mg/l).

Il convient de choisir les concentrations de manière à obtenir au moins un niveau d'inhibition sur la croissance en deçà et au-dessus du paramètre CE_{rx} voulu. Il convient, en outre, d'inclure au moins deux niveaux d'inhibition entre 10 % et 90 % pour permettre l'obtention de données en vue de l'analyse de régression.

Il est possible de réaliser un essai limite avec une seule concentration pour démontrer l'absence de toxicité. Il convient de réaliser au moins six réplicats pour cette concentration unique.

Si la «plus faible dilution sans effet» (LID) d'une eau résiduaire doit être déterminée, la série de dilutions suivante doit être utilisée: 1:1,25, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:12.

NOTE La gamme de concentrations appropriées est déterminée aisément en effectuant un essai préliminaire permettant de cibler la gamme et couvrant plusieurs ordres de grandeur de différence entre les concentrations d'essai. La répétition de chaque concentration d'essai n'est pas nécessaire lors de l'essai préliminaire.

7.4 Préparation de l'échantillon pour essai et des solutions mères

L'échantillon pour essai peut être aqueux (par exemple eau résiduaire) ou non aqueux (par exemple substance chimique ou mélange de produits chimiques) pour lequel sont déterminés les effets inhibiteurs sur la croissance des algues.

Si l'échantillon pour essai est aqueux (par exemple eau résiduaire), il est recommandé d'envisager un prétraitement (par exemple filtration, neutralisation), suivant la nature de l'échantillon et l'objectif de l'essai. Ajouter à l'échantillon des solutions mères de substances nutritives (5.3) préparées conformément à 7.1.

Pour des échantillons pour essai non aqueux, il est en général nécessaire de préparer des solutions mères. Il est recommandé de choisir avec soin la méthode de préparation des solutions mères suivant les propriétés de l'échantillon. Les solutions mères sont habituellement préparées en dissolvant l'échantillon pour essai dans le milieu de croissance. Lorsque l'échantillon pour essai ne se dissout pas aisément dans le milieu d'essai comme spécifié dans l'ISO 14442 et l'ISO 5667-16, il est nécessaire de procéder à des modifications.

L'essai doit normalement être effectué sans ajustement du pH du milieu après l'ajout de l'échantillon pour essai. Toutefois, certaines substances peuvent avoir un effet toxique dû à leur extrême acidité ou alcalinité. Pour évaluer la toxicité d'une substance indépendamment du pH, ajuster le pH de l'échantillon aqueux ou de la solution mère (avant préparation de la gamme de dilution) en fonction de celui du milieu de culture, en utilisant une solution d'acide chlorhydrique à 1 mol/l ou d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l (voir l'ISO 5667-16).

7.5 Préparation des lots d'essai et des témoins

Préparer les lots d'essai en mélangeant les volumes appropriés d'échantillon pour essai ou de solutions mères de l'échantillon pour essai (7.4), de milieu de croissance (7.1) et d'inoculum (7.2) dans les récipients d'essai. Le volume total, les concentrations de substances nutritives ajoutées au milieu de croissance et la concentration cellulaire doivent être les mêmes dans tous les récipients. Préparer au moins trois réplicats pour chaque concentration de l'échantillon soumis à essai.

La concentration cellulaire initiale doit être suffisamment faible pour permettre l'obtention d'une croissance en phase exponentielle dans la culture témoin pendant toute la durée de l'essai, sans variation du pH supérieure à 1,5 unité de pH (voir l'Article 8). Par conséquent, les concentrations cellulaires initiales ne doivent pas excéder 10^4 cellules/ml.

Préparer six réplicats témoins en ajoutant le volume approprié d'inoculum au milieu de croissance.

Mesurer le pH d'un réplicat pour chaque concentration d'essai et pour le témoin.

Si cela est approprié, préparer une gamme distincte de concentrations de l'échantillon pour essai sans algues afin de servir de valeur de base pour les déterminations de la concentration cellulaire.

Le nombre de réplicats par concentration peut être réduit pour des raisons statistiques (voir l'ISO/TS 20281) si l'on augmente le nombre de concentrations et si l'on réduit l'intervalle entre les concentrations.

Si des produits chimiques sont soumis à essai à des fins d'enregistrement, la concentration d'exposition au début, pendant et à la fin de l'exposition doit être vérifiée par une analyse chimique spécifique. Il peut alors être nécessaire de préparer des lots additionnels pour analyse. De plus amples informations peuvent être trouvées dans l'OCDE 201^[4].

7.6 Incubation

Les récipients d'essai doivent être suffisamment couverts pour éviter toute contamination aérienne et pour réduire l'évaporation d'eau, mais ils ne doivent pas être étanches à l'air de façon à ce que le CO₂ puisse y pénétrer (une petite ouverture suffit). Incuber les récipients d'essai à (23 ± 2) °C sous lumière blanche continue. L'intensité lumineuse au niveau moyen des milieux d'essai, mesurée à l'aide d'un récepteur approprié, doit être homogène à ± 10 % et doit se situer dans l'intervalle de 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ à 120 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ dans le domaine de longueur d'onde effective de la photosynthèse de 400 nm à 700 nm.

Il est important de noter que la méthode de mesure, en particulier le type de récepteur (collecteur), influe sur la valeur mesurée. Les récepteurs sphériques (lesquels répondent à la lumière sous tous les angles au-dessus et au-dessous du plan de mesure) et les récepteurs hémisphériques (lesquels répondent à la lumière sous tous les angles au-dessus du plan de mesure) sont préférés aux récepteurs unidirectionnels. Ils donnent des résultats plus élevés pour une source lumineuse multipoint du type de celle décrite dans la note ci-après.

NOTE L'intensité lumineuse spécifiée dans le premier alinéa du présent paragraphe peut être obtenue à l'aide de quatre à six lampes fluorescentes du type lumière blanche universelle (naturelle), c'est-à-dire un étalon de couleur 2 spécifié (d'une température de couleur de 4 300 K). La distance optimale des lampes est d'environ 0,35 m du milieu de culture algale.

Pour les instruments de mesure de lumière étalonnés en lux, un intervalle équivalent de 6 000 lx à 10 000 lx est acceptable pour l'essai.

Des essais avec des solutions d'essai colorées nécessitent des modifications spécifiques spécifiées dans l'ISO 14442.

Secouer, agiter ou aérer les cultures en continu pour maintenir les cellules en suspension et pour faciliter les échanges gazeux air/eau (CO₂) et, par voie de conséquence, réduire la variation du pH.

7.7 Mesurages

Mesurer la concentration cellulaire dans chaque lot d'essai (y compris les témoins) au moins toutes les 24 h. Mélanger parfaitement les lots d'essai avant de procéder aux mesurages. Il convient de ne pas réintroduire les parties aliquotes prélevées dans les récipients d'essai à des fins de mesurages.

La concentration cellulaire nominale peut être utilisée en tant que concentration cellulaire initiale; le mesurage de cette dernière n'apparaît donc pas nécessaire.

L'essai doit durer (72 ± 2) h.

À la fin de l'essai, mesurer le pH d'au moins un réplicat de chaque concentration d'échantillon pour essai et d'un réplicat témoin.

8 Critères de validité

Considérer l'essai comme valide si les conditions suivantes sont remplies:

- Le taux de croissance moyen des réplicats témoins doit être au moins de 1,4 jours⁻¹. Cela correspond à une augmentation de la concentration cellulaire d'un facteur 67 en 72 h.
- Le coefficient de variation du taux de croissance des réplicats témoins ne doit pas dépasser 5 %.