

---

---

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

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

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

[ISO 10253:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fed751ae-a3e1-446c-ba07-f27212cfd6a6/iso-10253-2016)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fed751ae-a3e1-446c-ba07-f27212cfd6a6/iso-10253-2016>



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

ISO 10253:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fed751ae-a3e1-446c-ba07-f27212cfd6a6/iso-10253-2016>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2016, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5 Matériels</b> .....	<b>3</b>
5.1 Organismes d'essai.....	3
5.2 Réactifs.....	4
5.2.1 Eau.....	4
5.2.2 Eau de mer.....	4
5.2.3 Nutriments.....	4
<b>6 Appareillage</b> .....	<b>5</b>
<b>7 Mode opératoire</b> .....	<b>6</b>
7.1 Préparation du milieu de croissance.....	6
7.2 Préparation de la préculture et de l'inoculum.....	6
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.....	7
7.6 Incubation.....	7
7.7 Mesurages.....	8
<b>8 Critères de validité</b> .....	<b>8</b>
<b>9 Interprétation des données</b> .....	<b>8</b>
9.1 Tracé des courbes de croissance.....	8
9.2 Calcul du pourcentage d'inhibition.....	9
9.3 Détermination des valeurs de $EC(r)_x$ .....	9
<b>10 Expression des résultats</b> .....	<b>10</b>
<b>11 Interprétation des résultats</b> .....	<b>10</b>
<b>12 Rapport d'essai</b> .....	<b>10</b>
<b>Annexe A (informative) Préparation des gammes de dilution des mélanges en eau de mer (effluents ou éluutriats)</b> .....	<b>12</b>
<b>Annexe B (informative) Mode opératoire d'essai à partir d'inocula algaux de conservation, avec mesurage direct de la croissance algale en cuve spectrophotométrique</b> .....	<b>13</b>
<b>Annexe C (informative) Données de performance</b> .....	<b>19</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>20</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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed751ae-a3e1-446c-ba07-f27212cfd6a6/iso-10253-2016).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, Sous-comité 5, *Méthodes biologiques*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 10253:2006), qui a fait l'objet de la révision technique suivante:

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

**AVERTISSEMENT** — Il convient que les utilisateurs du présent document maîtrisent les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document 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 indispensable que les essais menés conformément au présent document le soient par du personnel qualifié.

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination de l'inhibition de la croissance des algues marines unicellulaires *Skeletonema* sp. et *Phaeodactylum tricorutum* provoquée par des substances et des mélanges présents dans l'eau de mer (effluents, éluutriats, etc.).

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

**NOTE** Avec les modifications telles que décrites dans l'ISO 14442 et l'ISO 5667-16, il est possible d'évaluer par cet essai les effets inhibiteurs des matières organiques et inorganiques peu solubles, des composés volatils, des composés métalliques, des effluents, des échantillons d'eaux marines et des éluutriats de sédiments.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fed751ae-a3e1-446c-ba07-f27212cfd6a6/iso-10253-2016>

## 2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 résiduaires*

## 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- IEC Electropedia disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

**3.1**  
**densité cellulaire**

nombre de cellules par unité de volume du milieu

Note 1 à l'article: La densité cellulaire est exprimée en  $x$  cellules/ml.

**3.2**  
**taux de croissance spécifique**

$\mu$   
taux proportionnel de l'augmentation de la densité cellulaire par unité de temps:

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

où

$x$  est la densité cellulaire, exprimée en cellules par millilitre;

$t$  est le temps, exprimé en jours.

Note 1 à l'article: Le taux de croissance spécifique est exprimé en inverse de jours ( $j^{-1}$ ).

**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

## 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, et un inoculum de cellules algales à croissance exponentielle. Les solutions d'essai sont incubées pendant une période de  $(72 \pm 2)$  h, pendant laquelle la densité cellulaire est mesurée dans chacune des solutions à intervalles réguliers au moins toutes les  $(24 \pm 2)$  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* sp.<sup>1)</sup> (CCAP 1077/1C, NIVA BAC 1); ou
- b) *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (CCAP 1052/1A, SA G 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 algues recommandées sont disponibles sous la forme de cultures algales monospécifiques, non axéniques auprès des sources suivantes.

NIVA

Norwegian Institute for Water Research

Gaustadaléen 21

N 0349 Oslo

Norvège

CCAP

Dunstaffnage Marine Laboratory

P O Box 3 Oban

Argyll PA37 1QA

Royaume-Uni

**iTeh STANDARD PREVIEW**

(standards.iteh.ai)

[ISO 10253:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fed751ae-a3e1-446c-ba07-f27212cfd6a6/iso-10253-2016)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fed751ae-a3e1-446c-ba07-f27212cfd6a6/iso-10253-2016>

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* sp., alors que des intervalles de deux ou trois semaines peuvent suffire dans le cas de *Phaeodactylum tricornutum*. 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

---

1) Les éditions précédentes du présent document suggéraient l'emploi de deux souches de *Skeletonema costatum*. Une étude taxonomique du genre *Skeletonema* indique que plusieurs souches identifiées à l'origine comme *S. costatum* pourraient en réalité appartenir à d'autres espèces. À la lumière de cette étude, et dans le but d'assurer une continuité par rapport aux souches acceptées jusqu'ici, la présente révision du présent document a remplacé la référence *Skeletonema costatum* par *Skeletonema* sp. afin d'éviter la non-conformité des laboratoires utilisant des souches différentes.

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 Il est possible de conserver des cultures concentrées de la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* pendant plusieurs mois sans qu'elle perde sa viabilité. Les cultures mères pour les essais de toxicité peuvent aisément être préparées à partir des cultures concentrées ainsi conservées<sup>2)</sup>.

## 5.2 Réactifs

### 5.2.1 Eau

Toute 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.

### 5.2.2 Eau de mer

Pour la culture et l'essai de *Phaeodactylum tricorutum*, le milieu de culture (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* sp., 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 assurer 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.

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.

ISO 10253:2016  
 Tableau 1 — Eau de mer synthétique  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/siv/id/9/1446c-ba07-27212-f16a6/iso-10253-2016>

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

Filter l'eau de mer (qu'elle soit synthétique ou naturelle) sur une membrane filtrante de 0,45 µm pour éliminer les particules et les algues.

### 5.2.3 Nutriments

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

2) Des cultures concentrées de *Phaeodactylum tricorutum* peuvent être obtenues auprès de MicroBioTests Inc. Mariakerke-Gent, Belgique. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document 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.

Tableau 2 — Solutions mères nutritives

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

Ces solutions mères doivent être 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 pendant deux mois au maximum.

## 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 Enceinte 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 la croissance des cultures algales par un mode opératoire indirect, en utilisant par exemple un fluorimètre [par exemple fluorescence *in vitro* (voir la Référence [4])], 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 les 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<sup>4</sup> cellules d'algue/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.

L'[Annexe B](#) décrit un mode opératoire pour le mesurage spectrophotométrique de la densité cellulaire des algues.

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

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

**6.5 Autoclave.**

**6.6 pH-mètre.**

## 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 le [Tableau 2](#)) à environ 900 ml d'eau de mer naturelle ou synthétique ([5.2.2](#)); 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 lignes directrices, voir l'ISO 14442.

### 7.2 Préparation de la préculture et de l'inoculum

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

Ajouter suffisamment de cellules de la culture mère au milieu de croissance ([7.1](#)) pour obtenir une densité cellulaire suffisamment faible de, par exemple,  $2 \times 10^3$  cellules d'algue/ml à  $10^4$  cellules d'algue/ml pour trois jours de préculture, afin de conserver la croissance exponentielle jusqu'au début de l'essai. 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.

### 7.3 Sélection des concentrations de l'essai

Il convient d'exposer les algues aux concentrations de la substance d'essai dans une suite géométrique de raison inférieure ou égale à 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 une inhibition au-dessous et une inhibition au-dessus de la valeur prévue pour le paramètre  $EC(r)_x$ . De plus, il convient d'inclure au moins deux niveaux d'inhibition entre 10 % et 90 % pour fournir des données pour l'analyse de régression.

NOTE La meilleure façon de déterminer une plage de concentrations adéquate consiste à effectuer un essai préliminaire de détection de plage, couvrant plusieurs ordres de grandeur de différence entre les concentrations d'essai. La répétition des concentrations d'essai n'est pas exigée pour l'essai préliminaire.

### 7.4 Préparation des solutions mères de substance d'essai

Préparer les solutions mères en dissolvant la substance d'essai dans le milieu de croissance ([7.1](#)). Certaines modifications sont nécessaires lorsque la substance d'essai ne se dissout pas facilement dans le milieu d'essai, comme décrit dans l'ISO 14442 et l'ISO 5667-16.

Si les essais portent sur des échantillons d'eau (effluent, éluutriats, etc.), doper ceux-ci avec des solutions mères nutritives (5.2.3) et, le cas échéant, afin d'éviter toute inhibition de la croissance en raison d'une salinité trop faible, avec des sels d'eau de mer (5.2.2) afin d'amener la salinité de l'échantillon à la salinité du milieu de croissance. L'Annexe A fournit un exemple de protocole de dilution pour les échantillons d'eau de mer.

Effectuer l'essai normalement sans ajuster le pH après addition de la substance d'essai. Cependant, certaines substances peuvent avoir un effet toxique en raison d'une acidité ou d'une basicité extrême. Afin de déterminer la toxicité d'une substance indépendamment du pH, ajuster le pH de la solution mère générale (avant la gamme de dilution) à  $8,0 \pm 0,2$ , au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium. Il convient que la concentration en acide ou en base soit telle que le changement de volume soit le plus petit possible.

## 7.5 Préparation des lots d'essai et des témoins

Préparer les lots d'essai en mélangeant des volumes adéquats de solutions mères de substance d'essai (7.4), de milieu de croissance (7.1) et d'inoculum (7.2) dans les récipients d'essai. Le volume total, la concentration en nutriments ajoutés au milieu de croissance et la densité cellulaire doivent être les mêmes dans tous les lots d'essai.

La densité cellulaire initiale doit être suffisamment faible pour permettre une croissance exponentielle dans la culture témoin pendant toute la durée de l'essai, ou a minima pendant le laps de temps requis pour atteindre une augmentation d'un facteur 16 de la densité cellulaire, sans dérive du pH supérieure à 1,0 unité de pH (voir l'Article 8). Par conséquent, les densités cellulaires initiales ne doivent pas dépasser  $10^4$  cellules d'algue/ml.

Une plus faible densité cellulaire initiale (de trois à cinq fois inférieure) est recommandée pour *Skeletonema* sp. en raison de son volume cellulaire plus important et de son taux de croissance plus élevé. Prendre en considération la formation de chaînes par *Skeletonema* sp. lors de la détermination de la densité cellulaire initiale.

Préparer trois répliquats au moins pour chaque concentration de substance d'essai. Ajouter, à six autres récipients, uniquement du milieu de croissance et de l'inoculum sans substance d'essai. Ces récipients servent de témoins.

Le cas échéant (par exemple, échantillons environnementaux, colorés ou turbides), préparer une seule gamme de concentrations de la substance d'essai, un seul récipient à chaque fois, sans algue pour servir de fond pour les déterminations de la densité cellulaire.

Le plan d'essai peut être modifié, sur la base de considérations statistiques, pour augmenter le nombre de concentrations et réduire le nombre de répliquats par concentration.

Mesurer le pH des échantillons de chaque concentration de la solution d'essai et des témoins.

## 7.6 Incubation

Les récipients d'essai doivent être suffisamment recouverts pour éviter toute contamination aérienne et pour réduire l'évaporation de l'eau; ils ne doivent cependant pas être étanches, pour permettre le passage du CO<sub>2</sub> vers l'intérieur des récipients. Incuber les récipients d'essai à une température nominale de 20 °C, sous une lumière blanche continue. La température ne doit pas varier de plus de 2 °C au cours de l'essai. Le débit de fluence des photons au niveau moyen des solutions d'essai doit être uniforme et se trouver dans la plage de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$  à 120  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ , lorsqu'il est mesuré dans la gamme des longueurs d'onde efficaces du point de vue photosynthétique de 400 nm à 700 nm au moyen d'un récepteur approprié.

Il est important de noter que la méthode de mesure, en particulier le type de récepteur (détecteur), influe sur la valeur mesurée. Les récepteurs sphériques (qui réagissent à la lumière directe et réfléchie en provenance de tous les angles au-dessus et au-dessous du plan de mesurage) et les récepteurs «cosinus» (qui réagissent à la lumière en provenance de tous les angles au-dessus du plan de mesurage)