

E-V-1v1-Détermination de l'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires

1. Préambule

Il existe deux méthodes de détermination de l'inhibition de croissance des algues d'eau douce : une méthode dite « conventionnelle » qui utilise des souches d'algues monospécifiques mises en culture pendant plusieurs générations et la méthode dite « en kit » qui utilise des microalgues immobilisées dans une matrice spéciale qui peuvent être « désimmobilisées » pour l'essai et directement utilisées. Cette dernière méthode est a priori plus facile à mettre en œuvre puisqu'elle ne nécessite pas le maintien de cultures d'algues.

2. Objet

Cette procédure décrit une méthode relative à la détermination de l'inhibition de croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires, par exemple de l'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement *Selenastrum capricornutum*), par des substances solubles dans l'eau.

3. Domaine d'application

Cette procédure s'applique à différents types d'échantillons d'eaux et d'extraits aqueux : solutions aqueuses de substances pures, effluents urbains et industriels, éluats, eaux interstitielles, eaux douces (de surface ou souterraines).

4. Définitions et abréviations

Concentration cellulaire x : nombre de cellules par unité de volume de milieu. La densité cellulaire est exprimée en nombre de cellules par millilitre.

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

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

où :

x est la concentration cellulaire, exprimée en nombre de cellules par millilitre.
 t est le temps, exprimé en jours.

NOTE : le taux de croissance spécifique est exprimé en jours⁻¹.

Milieu de croissance : mélange d'eau et de substances nutritives, utilisé pour les pré-cultures et les solutions témoins, dans lequel les cellules algales seront incubées.

Milieu d'essai : mélange d'eau, de substances nutritives et d'échantillon pour essai.

Lot d'essai : milieu d'essai inoculé avec des algues.



Solution témoin : milieu de croissance sans échantillon pour essai, inoculé avec des algues.

Concentration efficace EC_{rx} : concentration de l'échantillon pour essai qui entraîne une diminution de x du taux de croissance spécifique par rapport aux solutions témoin.

NOTE : pour désigner sans ambiguïté une valeur de la concentration efficace (EC) dérivant du taux de croissance, il est proposé d'utiliser le symbole EC_r .

5. 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 heures, pendant laquelle la concentration cellulaire de chaque solution d'essai est mesurée au moins toutes les 24 heures. Toutefois, pour la détection de l'inhibition de la croissance algale par les eaux résiduaires et conformément à l'annexe A de la Norme ISO 8692, la durée de l'essai peut être ramenée à 48 heures. L'inhibition est quantifiée par la diminution du taux de croissance, par comparaison à des cultures témoins réalisées dans des conditions identiques.

6. Appareillages et matériels utilisés

5.1. Appareillage

- Pièce ou enceinte climatisée à $23 \pm 2^\circ\text{C}$ équipée de néons
- Réfrigérateur (4°C)
- pH-mètre
- Luxmètre pour le contrôle de la luminosité dans l'enceinte climatisée
- Appareil de mesure de concentration cellulaire algale :
 -) soit un compteur de particules, par exemple un Coulter Multisizer 3
 -) soit un spectrophotomètre modulaire (UV-VIS) + module de spectrofluorométrie (doit permettre de mesurer des concentrations cellulaires aussi faibles que 10^4 cellules/ml)
 -) soit un microscope équipé d'une chambre de comptage (par exemple une cellule de Thoma)
- Hotte à flux laminaire pour la préparation des cultures d'algues dans des conditions stériles
- Autoclave
- Pompe à vide pour la filtration des échantillons
- Bain à ultrasons
- Balance de sensibilité 10^{-4} g/l
- Agitateurs

5.2. Petit matériel

- Microplaques 48 puits stériles
- Cuvettes en polystyrène de 10 cm de long pour la mesure d'absorbance avec le spectrophotomètre
- Ballons jaugés en verre de classe A
- Micropipettes
- Flacons Bulk® de capacité 20 ml pour le comptage des algues de la préculture et pour le prélèvement des solutions essais
- Tourie en verre, par exemple de 5 l, équipée d'un robinet pour faciliter la distribution du milieu
- Bouteilles en verre avec col fileté pour la filtration des échantillons
- Supports de filtres Nalgène® en polysulfone pouvant s'adapter sur les bouteilles en verre préalablement mentionnées
- Filtres 0,45 µm de diamètre de pores (par exemple en acétate de cellulose) pour la filtration des échantillons
- Filtres de 0,22 µm de diamètre de pores (par exemple en acétate de cellulose) pour la stérilisation du milieu de culture
- Flacons pour cultures cellulaires, stériles, d'une capacité de 50 ml

6. Matériel biologique

Les organismes sont des algues vertes unicellulaires d'eau douce, appartenant à l'une des 2 espèces suivantes : *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement *Selenastrum capricornutum*) ou *Desmodesmus subcapitatus*.

On peut se procurer des souches sous formes de cultures monospécifiques non axéniques par exemple auprès de :

Culture Centre of Algae and Protozoa (CCAP)
Freshwater Biological Association
The Ferry House
Ambleside
Cumbria LA22 0LP
Royaume-Uni

Algothèque du laboratoire de cryptogamie
Muséum National d'Histoire Naturelle
12, rue Buffon
75005 Paris
France

Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
Universität de Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-37073
Allemagne

7. Réactifs utilisés



7.1. Eau

Il convient d'utiliser de l'eau déionisée ou d'une pureté équivalente (conductivité < 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$) pour la préparation du milieu de croissance et des solutions de substance à expérimenter.

Veiller à éviter toute contamination de l'eau par des substances inorganiques ou organiques pendant la préparation et la conservation. Aucun matériel en cuivre ne doit être utilisé.

7.2. Substances nutritives

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

Ces solutions pourront éventuellement être diluées 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 °C, 15 minutes). Conserver les solutions à l'abri de la lumière et à 4 °C.

Remarquons qu'afin d'éviter toute perte de NaHCO_3 par évaporation, la solution mère 4 ne doit pas être stérilisée en autoclave mais uniquement par filtration sur membrane.

Tableau 1 : concentrations massiques des 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
Solution mère 1: macro-nutriments	NH_4Cl	1,5 g/l	15 mg/l
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g/l	12 mg/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g/l	18 mg/l
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g/l	15 mg/l
	KH_2PO_4	0,16 g/l	1,6 mg/l
Solution mère 2: Fe-EDTA	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg/l	64 $\mu\text{g}/\text{l}$
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg/l	100 $\mu\text{g}/\text{l}$
Solution mère 3: éléments traces	H_3BO_3 (a)	185 mg/l	185 $\mu\text{g}/\text{l}$
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg/l	415 $\mu\text{g}/\text{l}$
	ZnCl_2	3 mg/l	3 $\mu\text{g}/\text{l}$
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/l	1,5 $\mu\text{g}/\text{l}$
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg/l	0,01 $\mu\text{g}/\text{l}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg/l	7 $\mu\text{g}/\text{l}$
Solution mère 4 : NaHCO_3	NaHCO_3	50 g/l	50 mg/l

(a) H_3BO_3 peut être dissous en ajoutant 0,1 N NaOH

7.3. Solution de référence – Dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)

Préparer une solution de dichromate de potassium à 1 g/l en dissolvant par exemple 100 mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ pesés à l'aide d'une balance analytique précise au 10^{-4} g dans 100 ml d'eau déionisée. La solution peut se conserver pendant 4 mois au réfrigérateur (4 °C) et à l'obscurité.

7.4. Electrolyte isotonique (par exemple ISOTON II®)



Un électrolyte isotonique, par exemple l'ISOTON II®, est utilisé pour le comptage des cellules algales avec le compteur de particules. Cette solution commerciale provient de Beckman Coulter Inc.

7.5. Solution algistatique

Si nécessaire, une solution algistatique peut être distribuée dans les flacons de prélèvement pour arrêter la croissance algale en fin de test (habituellement, une solution concentrée à 7,5 mg/l est utilisée. 1 ml de cette solution est nécessaire pour 2 ml de solution d'essai). Cette solution peut être préparée à partir la solution de référence (voir **point 7.3.** ci-dessus) ou indépendamment.

8. Instructions opératoires

8.1. Préparation du milieu de croissance (diluant)

Préparer le milieu de croissance avant chaque essai à partir des solutions mères de substances nutritives préalablement préparées (**point 7.2.**).

Par exemple, pour 1 l de milieu de croissance, à environ 800 ml d'eau déionisée, ajouter :

- 10 ml de solution mère 1
- 1 ml de solution mère 2
- 1 ml de solution mère 3
- 1 ml de solution mère 4

Compléter à 1000 ml avec de l'eau déionisée.

Avant utilisation, le milieu doit atteindre l'état d'équilibre en restant à l'air pendant une nuit ou par un bullage d'air filtré pendant minimum 30 minutes. Vérifier le pH et l'ajuster si nécessaire à $8,1 \pm 0,2$ avec une solution diluée de HCl (1 mol/l) ou de NaOH (1 mol/l).

8.2. Préparation de la préculture et de l'inoculum

L'inoculum d'algues pour l'essai doit être prélevé sur une préculture en phase exponentielle de croissance. Préparer la préculture, environ 3 jours avant le début de l'essai comme suit :

- Dans le milieu de croissance, ajouter un inoculum provenant d'une culture mère dont la concentration a été préalablement déterminée, pour que la concentration soit comprise entre $5 \cdot 10^3$ et 10^4 cellules/ml.
- Maintenir la préculture dans les mêmes conditions que celles de l'essai pendant environ 3 jours après lesquels elle devrait être en phase exponentielle de croissance et la concentration cellulaire devrait être suffisante pour qu'elle soit utilisée comme inoculum.
- Déterminer la concentration cellulaire de la préculture juste avant l'essai pour calculer le volume d'inoculum nécessaire.
- La détermination de la concentration cellulaire de la culture mère et de la préculture se fait habituellement avec le compteur de particules ou avec la cellule de Thoma.

8.3. Pré-traitement de l'échantillon

Pour des échantillons aqueux (par exemple, eau résiduaire), il est recommandé de réaliser un prétraitement (filtration, neutralisation par exemple), suivant la nature de l'échantillon et l'objectif de l'essai. Ajouter les solutions mères de substances nutritives.

Procédure :

- Amener progressivement l'échantillon à température ambiante.
- Généralement, filtrer sur filtre 0,45 μm de porosité
- Ajouter à l'échantillon les solutions mères de substances nutritives (7.2) tel que décrit au point 8.1.
- Contrôler le pH. Si nécessaire, en fonction de la nature de l'échantillon et de l'objectif de l'essai (par exemple, essai ne comportant qu'une seule concentration), le pH de l'échantillon ou de la solution d'essai peut être ajusté à la valeur du contrôle (milieu de croissance).

NOTE : Normalement, l'essai est effectué sans ajustement du pH mais si l'échantillon ou la substance devait présenter une acidité ou une alcalinité trop importante, il peut s'avérer nécessaire d'effectuer un ajustement du pH. Par exemple, ajuster le pH à $8,1 \pm 0,2$ (pH du milieu de croissance) en utilisant des solutions diluées de HCl ou de NaOH. Comme le stipule la norme ISO 5667 -16, il convient que le volume d'agent neutralisant utilisé soit le plus faible possible afin de limiter au maximum les effets de la neutralisation sur le résultat de l'essai. Il est donc important d'utiliser une concentration appropriée en agent neutralisant et d'éviter de dépasser le point de neutralité.

8.4. Concentrations des solutions d'essai

La gamme de dilutions utile est fonction de la toxicité de l'échantillon ou de la substance et du paramètre d'effet ciblé (EC50). Un essai préliminaire peut être nécessaire pour déterminer la gamme de concentrations utile.

On peut également procéder à un test limite, essai ne comportant qu'une seule concentration de l'échantillon ou de la substance (par exemple 98 %). Dans ce cas, le nombre de répliques de l'échantillon est identique au nombre de répliques témoins.

NOTE 1 :

La répétition de chaque concentration d'essai n'est pas nécessaire lors de l'essai préliminaire.

NOTE 2 :

Si possible, les concentrations doivent être choisies pour permettre l'obtention de plusieurs effets induisant une inhibition de croissance comprise entre 10 et 90 %.

8.5. Préparation des milieux d'essai

Conformément au point 7.5 de la norme ISO 8692, les lots d'essai et les témoins sont préparés en mélangeant les volumes appropriés d'échantillon pour essai ou de solutions mères de l'échantillon pour essai, de milieu de croissance et d'inoculum dans les récipients d'essai. Le volume total, les concentrations de substances nutritives ajoutées au milieu de croissance et la densité de cellules doivent être les mêmes dans tous les récipients.

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. Par conséquent, les concentrations cellulaires initiales ne doivent pas excéder 10^4 cellules/ml.

Au moins trois répliques doivent être préparées pour chaque concentration de substance à expérimenter. Il faut également 6 témoins pour lesquels on ajoute uniquement le milieu de culture et l'inoculum sans échantillon pour essai. Si cela est approprié, une gamme distincte de concentrations de l'échantillon pour essai sans algues, servant de valeur de base pour les déterminations de la concentration cellulaire, peut être préparée.

Le pH d'un échantillon de chaque lot d'essai ainsi que celui des solutions témoins doit être mesuré.

8.5.1. Echantillon (effluent, eau de surface, eau interstitielle de sédiment, ...)

Pour le système en microplaques, ajouter à l'échantillon les volumes appropriés de solutions mères de substances nutritives nécessaires pour que les concentrations en substances nutritives ajoutées correspondent à celles des solutions témoins (milieu de croissance).

Par exemple, dans un ballon jaugé de 200 ml, introduire environ 150 ml d'échantillon, puis ajouter les volumes de concentrés nutritifs adéquats, soit 2 ml de solution mère 1 et 200 μ l de chacune des solutions mères 2, 3 et 4 (voir **point 7.2.** pour la préparation de ces solutions). Compléter ensuite jusqu'au trait de 200 ml avec l'échantillon.

Réaliser une série de dilutions successives de l'échantillon enrichi en substances nutritives en respectant une progression géométrique, par exemple des dilutions de facteur 2. Diluer avec le milieu de croissance.

8.6. Lots d'essai

8.6.1. Exemple en microplaque

Une fois les dilutions successives de l'échantillon terminées, prélever un volume défini de chaque dilution (par exemple 1200 μ l) qui servira de blanc sans algues et ajouter un volume de suspension algale (inoculum) au volume restant de sorte que la concentration initiale soit inférieure ou égale à 10^4 cellules/ml.

Par concentration d'essai, distribuer dans trois puits (test limite : six puits) un volume, habituellement de 1200 μ l, de chacune des dilutions de l'échantillon (lots d'essai) et un quatrième (ou septième s'il s'agit d'un test limite) avec le milieu d'essai (blanc sans algues).

Pour la préparation du lot d'essai témoin, remplir un ballon jaugé (par exemple 100 ml) avec du milieu de croissance auquel sera ajouté l'inoculum. Six puits de la microplaque ne contiendront que le lot d'essai témoin et un septième le milieu d'essai témoin (milieu de croissance sans inoculum).

Remplir les puits vides surnuméraires de la microplaque avec de l'eau Milli-Q.

Mesurer ensuite le pH sur les volumes restant de chaque concentration d'essai ainsi que sur le témoin.



8.6.2. Exemple en flacon

Par concentration d'essai, préparer cinq récipients (huit récipients s'il s'agit d'un test limite), par exemple des flacons Costar® en polystyrène de 50 ml.

Distribuer un volume, habituellement 25 ml, de chacun des milieux d'essai et ajouter un volume de suspension algale (inoculum) de sorte que la concentration initiale soit inférieure ou égale à 10^4 cellules/ml. Dans un des récipients, ne pas ajouter d'algues (blanc).

Pour la préparation du lot témoin, huit récipients ne contiendront que du milieu de croissance (témoins). L'inoculum sera distribué dans sept récipients, le huitième en sera exempt (témoin sans algues).

Utiliser une réplique de chaque lot d'essai et lot témoin pour la mesure du pH, les autres pour le test.

8.7. Incubation

Conformément au point 7.6 de la norme ISO 8692, les récipients ou les microplaques doivent être suffisamment couverts pour éviter toute contamination aérienne et pour réduire l'évaporation de l'eau, mais ils ne doivent pas être étanches à l'air de façon à ce que le CO_2 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 dans le domaine de longueur d'onde effective de la photosynthèse de 400 nm à 700 nm, doit être homogène à ± 10 % et doit se situer dans l'intervalle de $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$ à $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{ s})$.

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-dessous.

Pour les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, un intervalle équivalent de 6000 lux à 10000 lux est acceptable pour l'essai.

Secouer, agiter ou aérer les cultures en continu pour maintenir les cellules en suspension, faciliter les échanges gazeux air/eau (CO_2), et par voie de conséquence, réduire la variation du pH.

NOTE : l'intensité lumineuse spécifiée ci-dessus peut être obtenue à l'aide de quatre à six lampes fluorescentes du type lumière blanche universelle (naturelle) [par exemple, un étalon de couleur 2 spécifié (d'une température de couleur de 4300 K)]. La distance optimale des lampes est d'environ 0,35 m du milieu de culture algale.

8.8. Mesures

Les mesures sont effectuées conformément au point 7.7 de la norme ISO 8692 ou conformément au point A9 de l'Annexe de cette norme lors de l'utilisation de microplaques.

Déterminer la concentration cellulaire dans chaque récipient si possible toutes les 24 h, tout au moins en fin d'essai (48 ou 72 h). Pour les échantillons turbides, il est recommandé que les mesures se fassent avec le fluorimètre pour maintenir les interférences dues à la turbidité aussi faibles que possible, mais en cas de nécessité, elles peuvent se faire avec le compteur de particules.

Essai en microplaque :

- par fluorimétrie : effectuer directement la lecture de la plaque d'essai ;
- par comptage au compteur de particules : effectuer le comptage sur un prélèvement, par exemple, de 1 ml (dans ce cas, le prélèvement ne sera effectué qu'en fin de test vu le faible volume disponible dans une microplaque).

Essai en flacon :

- par fluorimétrie : prélever 1,2 ml de chaque réplique des lots d'essai et transférer dans une microplaque puis effectuer les mesures ;
- par comptage au compteur de particule sur un prélèvement de faible volume, par exemple 2 ml.

NOTE :

Si le dénombrement cellulaire ne peut être effectué juste après les prélèvements, arrêter la croissance par l'ajout de solution algistatique (voir **point 7.5.** pour la préparation de cette solution) dans les flacons de prélèvement puis les conserver au réfrigérateur.

En fin de test, contrôler le pH d'une réplique des témoins, excepté le témoin sans algues.

9. Critères de validité

L'essai peut être considéré comme valide si les conditions suivantes sont remplies :

- a) le taux de croissance moyen du témoin doit être au moins de $1,4 \text{ j}^{-1}$, ce qui correspond à une augmentation de la densité cellulaire d'un facteur 67 en 72 heures ;
- b) le coefficient de variation du taux de croissance des solutions témoins ne doit pas dépasser 5% ;
- c) le pH des solutions témoins ne doit pas avoir augmenté de plus de 1,5 unités pendant l'essai par rapport au pH du milieu de croissance.

Une augmentation du pH pendant l'essai pouvant influencer significativement sur les résultats, une limite de 1.5 unités est fixée. Il convient toutefois de toujours maintenir ces variations aussi faibles que possible, par exemple en maintenant une agitation continue pendant l'essai.

- d) il ne doit pas y avoir de croissance d'algue qui interfère dans le témoin négatif à la fin de l'essai.



Si ces critères ne sont pas satisfaits, passer en revue les techniques expérimentales et utiliser des inoculums d'origine différente, si nécessaire.

10. Expression des résultats

10.1. Présentation des résultats

Calculer les taux de croissance spécifiques moyens, μ , pour chaque culture d'essai, d'après l'équation :

$$\mu = \frac{\ln x_L - \ln x_0}{t_L - t_0}$$

où

x_0 est la concentration cellulaire nominale initiale ;

x_L est la concentration cellulaire mesurée à l'instant t_L ;

t_0 est l'heure du début de l'essai ;

t_L est l'heure de fin d'essai [l'heure de la dernière mesure au cours de la phase de croissance exponentielle des cultures témoins]

Calculer la valeur moyenne de μ pour chaque réplicat du lot d'essai et du témoin.. A partir de ces valeurs, calculer le pourcentage d'inhibition pour chaque réplicat du lot d'essai :

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c}$$

$I_{\mu i}$ est le pourcentage d'inhibition (taux de croissance) pour la concentration d'essai i

μ_i est le taux de croissance moyen à la concentration d'essai i ,

μ_c est le taux de croissance moyen de la culture témoin.

Pour calculer les concentrations efficaces EC_{rx} , il convient d'ajuster un modèle non linéaire adapté aux points des données expérimentales en effectuant une analyse de régression de façon à déterminer les valeurs de EC_{rx} , de préférence avec leurs intervalles de confiance. Le logiciel ToxCAL5® peut par exemple être utilisé pour le traitement statistique.

Noter les valeurs de EC_{10} et EC_{50} se rapportant au taux de croissance sous la forme CE_{r10} et CE_{r50} . Ces valeurs sont exprimées en mg/l ou ml/l. Les intervalles de confiance correspondants doivent également être mentionnés.

Indiquer clairement l'intervalle de temps utilisé pour effectuer la détermination, par exemple CE_{r50} (0 à 72 h).

Les comptages cellulaires ou les données de fluorimétrie ainsi que le calcul des résultats peuvent être encodés dans un fichier Excel spécifique.



10.2. Interprétation des résultats

Les valeurs de EC₁₀ et EC₅₀ sont des données toxicologiques obtenues à partir d'une expérience réalisée en laboratoire dans des conditions types définies. Elles donnent une indication des risques potentiels, mais ne peuvent pas être utilisées directement pour prévoir les effets dans un environnement naturel.

NOTE :

Il est important de tenir compte de la forme des courbes de croissance lors de l'interprétation des valeurs. En effet, certaines caractéristiques de ces courbes (par exemple : départ tardif de la croissance, bonne croissance initiale mais non soutenue par la suite,...) peuvent donner des indications sur le mode d'action de la substance toxique concernée.

11. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne et éventuellement à la méthode normalisée ;
- l'identification complète de l'échantillon ;
- la date de prélèvement ; ceci qu'il ait été réalisé par le laboratoire ou par le client ;
- la date d'analyse ;
- les résultats du dénombrement conformément au **point 10** ;
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

La feuille d'essai, les feuilles d'encodage et de rapport des résultats, et la feuille de traitement statistique (par exemple par le logiciel ToxCalc5®) reprennent l'ensemble des informations qui doivent être fournies.

12. Références

Norme internationale ISO 8692: Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires.

Norme internationale ISO 5667-16: Qualité de l'eau – Échantillonnage – Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons.