

E-V-2v1-Détermination de l'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires - Méthode en Kit (ALGALTOXKIT)

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. Introduction à l'ALGALTOXKIT

4.1. Origine

Ce bioessai basé sur l'inhibition de la croissance des algues a été développé par les équipes de recherche du Prof.Dr.G.Persoone au « Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution »¹ (LABRAP) à l'Université de Gand en Belgique.

4.2. Champ d'application

Les TOXKITS sont des microbioessais contenant tout ce qui est nécessaire (y compris les organismes d'essai) pour réaliser des essais de toxicité simples, rapides, sensibles et reproductibles avec un bon rapport coût/efficacité. Les essais Toxkits sont particulièrement adaptés pour les essais de toxicité de routine sur des produits chimiques et des rejets évacués dans le milieu aquatique aussi bien que dans les environnements terrestres.

¹ Le Laboratoire a récemment été renommé « Laboratory for Environmental Toxicology and Aquatic Ecology » (LETAE).

4.3. Avantages des essais Toxkit

L'avantage majeur des microbioessais Toxkit par rapport aux bioessais conventionnels est que les organismes d'essai sont intégrés dans les kits sous une forme dormante ou immobilisée, à partir de laquelle ils peuvent être activés à la demande avant l'exécution de l'essai de toxicité. Ceci élimine la nécessité d'un approvisionnement continu et/ou d'une culture d'organismes d'essai et donc diminue la charge de travail liée à l'entretien d'une culture pour des laboratoires qui n'exécutent pas ce test en routine.

Tous les essais Toxkit ont été « miniaturisés » en microbioessais pratiques et faciles à utiliser qui peuvent être effectués avec du matériel de laboratoire et des équipements conventionnels, sur un espace de travail relativement réduit.

4.4. Avantages de l'essai Algaltoxkit

- **Pas de culture** : l'Algaltoxkit est basé sur l'utilisation de microalgues immobilisées dans une matrice spéciale dans laquelle elles sont immobilisées pendant plusieurs mois sans perdre leur viabilité. Après « désimmobilisation » et transfert dans un milieu de culture d'algues adéquat, les microalgues reprennent leur croissance immédiatement; le bon état physiologique est mis en évidence par le fait que le taux de division est analogue à celui des algues provenant des cultures mères.

- **Une lecture rapide** : l'Algaltoxkit fait usage d'un nouveau type de flacons d'essai, à savoir des cellules jetables en polystyrène. Ces cellules peuvent être utilisées avec tout type de spectrophotomètre muni d'un support pour cellules de 10 cm de longueur. Chaque cellule est pourvue d'un couvercle spécial en élastomère, une matière thermoplastique chimiquement inerte.

- Les cellules en tant que flacons d'essai

- a. Elles permettent la détermination de la croissance des algues par mesure de la densité optique directement dans les flacons d'essai. Cette nouvelle technologie permet un gain de temps substantiel pour la mesure quotidienne de la croissance des algues en comparaison aux techniques conventionnelles de comptage.
- b. L'utilisation de cellules d'une longueur de 10 cm permet de réaliser l'essai Algaltoxkit selon les conditions prescrites par les directives nationales et internationales (par exemple ISO, OCDE, USEPA, ASTM). Les mesures de densité optique constituent en effet une technique rapide et très commode pour déterminer le taux de croissance des algues avec une bonne précision.
- c. Les cellules peuvent contenir un volume d'essai de 25 ml sur une surface de base de seulement 12 cm². Le plateau contenant les 18 flacons d'essai prend une surface de 13 x 25 cm seulement sur l'espace de travail. En pratique, cela signifie que 3 tests Algaltoxkit peuvent être réalisés sur l'espace nécessaire à un seul essai classique.
- d. Les cellules étant jetables et peu coûteuses, il n'y a pas de long et coûteux nettoyage des flacons d'essai.



4.5. Principe du test Algaltoxit

L'essai d'inhibition de la croissance des algues à 72 h est réalisé dans des cellules d'essai, avec l'espèce d'algues *Pseudokirchneriella subcapitata* sous forme « désimmobilisée » à partir de billes d'algues. L'essai Algaltoxit décrit ci-dessous suit les prescriptions de, et a été conçu sur base des, normes de l'OCDE « Test d'inhibition de la croissance des algues » (ligne directrice 201) et de la norme ISO « Qualité de l'eau » - Essais d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires "(Norme ISO 8692). A noter que cette dernière prévoit dans son annexe A concernant les eaux résiduaires que la durée de l'essai peut être ramenée à 48 heures.

4.6. Caractéristiques

Chaque Algaltoxit contient tous les matériaux (jetables) pour effectuer deux essais complets en 72 h (ou 48 h) (essais préliminaires ou essais définitifs).

Outre la verrerie de laboratoire conventionnelle, les seuls équipements nécessaires sont :

- a) un incubateur (ou une chambre à température contrôlée) à 23 ± 2 °C équipé d'un système d'éclairage,
- b) un spectrophotomètre équipé d'un support pour les cellules d'une longueur de 10 cm.
- c) une centrifugeuse pour centrifuger à 3000 rotations par minute (rpm).

4.7. Sensibilité

La sensibilité de l'essai Algaltoxit a été déterminée pour une variété de produits chimiques organiques et inorganiques et d'échantillons environnementaux en parallèle aux essais classiques d'inhibition de la croissance des algues. Les données générées par les laboratoires de différents pays ainsi que par des exercices interlaboratoires indiquent que la sensibilité du microbioessai « algues » est la même que celle de l'essai « algues » conventionnel.

4.8. Précision

Une étude comparative entre les tests algues classiques et les tests Algaltoxit a également révélé que la précision des tests Algaltoxit pour les produits chimiques et les échantillons environnementaux est égale à celle des tests algues classiques.

4.9. Durée de conservation

Etant donné que le taux de croissance des microalgues reste constant même après un stockage de plusieurs mois au réfrigérateur dans l'obscurité, les tests Algaltoxit peuvent être effectués dans un délai de plusieurs mois, comme indiqué par la date d'expiration.

5. Contenu de l'ALGALTOXKIT

L'Algaltoxit contient :

- Deux tubes contenant de petites billes de microalgues *Pseudokirchneriella subcapitata* immobilisées dans une matrice inerte. Les tubes avec le milieu de stockage et les billes d'algues doivent être conservés au réfrigérateur à l'obscurité à 5 ± 2 °C jusqu'à utilisation.



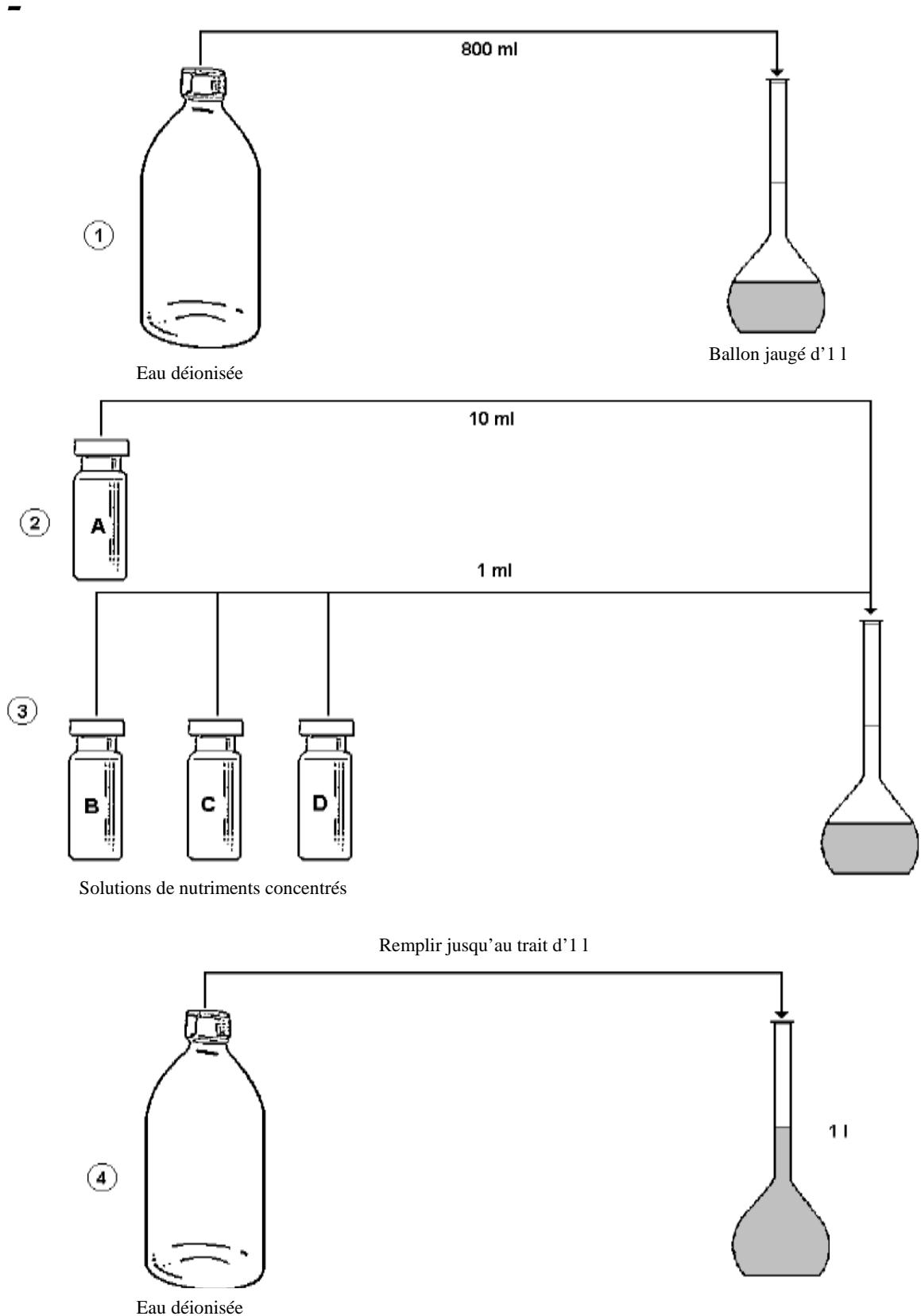
- Une bouteille en verre contenant le milieu destiné à dissoudre la matrice dans laquelle les microalgues sont immobilisées. Le milieu de dissolution de la matrice doit être conservé dans le réfrigérateur et dans l'obscurité à 5 ± 2 °C jusqu'à utilisation.
- Cinq bouteilles en verre contenant des solutions concentrées de produits chimiques permettant de préparer 2 litres de milieu de culture pour les algues avec de l'eau déionisée, selon la formule de la ligne directrice de l'OCDE 201 «Test d'inhibition de la croissance des algues» et de la norme ISO 8692 «Qualité de l'eau» - Essais d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires». Le protocole de préparation de ce milieu est décrit ci-dessous (**point 6**). Les flacons doivent être conservés dans le réfrigérateur à 5 ± 2 °C dans l'obscurité jusqu'à utilisation.
- Deux séries de 18 cellules jetables de 10cm de long avec couvercle, chacune dans un bac transparent muni de deux bandes de matière plastique. Les cellules servent aussi bien de flacons d'essai que de cuvettes permettant la mesure directe de la densité optique (DO) dans les récipients d'essai.
- Deux cellules avec couvercle, pour la calibration du spectrophotomètre et la mesure de la DO de la suspension concentrée d'algues.
- Le Manuel de Protocole Standard, c'est-à-dire une brochure détaillée contenant toutes les instructions pour l'exécution des essais préliminaires ou définitifs sur des produits chimiques purs et des effluents.
- Une version abrégée du manuel détaillé du protocole standard.
- Des fiches pour consigner les lectures quotidiennes de DO dans les cellules.
- Une feuille indiquant le numéro de lot des billes d'algues, du milieu de dissolution de la matrice, du milieu de culture des algues, la date d'expiration du Toxkit et l'EC50 à 72 h pour le dichromate de potassium, utilisé comme substance de référence.

6. Préparation du milieu de culture des algues

6.1. Procédure (voir figure 1)

1. Transférer 800 ml d'eau déionisée dans un ballon jaugé de 1 l.
2. Déboucher un des deux flacons étiquetés "Nutrient Stock A" et transférer 10 ml de la solution dans le ballon jaugé.
3. Déboucher les flacons étiquetés "Nutrient Stock B, C et D", et transférer 1 ml de chacune de ces solutions dans le ballon jaugé. Reboucher les flacons et les conserver à nouveau dans le réfrigérateur à l'obscurité à 5 ± 2 °C.
4. Remplir le ballon jaugé jusqu'au trait de 1 litre avec de l'eau déionisée, boucher et agiter vigoureusement pour homogénéiser le milieu de culture des algues.
5. Avant utilisation, équilibrer le milieu en le laissant toute la nuit en contact avec l'air, ou en faisant buller de l'air filtré pendant 30 min. Ajuster ensuite le pH si nécessaire à 8.1 ± 0.2 avec du HCl 1 mol/l ou du NaOH 1 mol/l.

Figure 1 : préparation du milieu de culture des algues (d'après la *standard operational procedure* de l'Algatoxkit de MicroBio Tests).



7. Désimmobilisation des algues

Selon la norme ISO 8692 - Section 5.1 «Organisme d'essai», les billes d'algues fournies par MicroBio Tests Inc. sont un exemple de produit adapté disponible sur le marché.

7.1. Procédure (voir figure 2)

1. Prendre l'un des deux tubes contenant les billes d'algues et vider le liquide en prenant garde à ne pas éliminer de billes d'algues au cours de la manœuvre.
2. Ouvrir le flacon étiqueté "Matrix dissolving medium" et en transférer 5 ml dans le tube.
3. Boucher le tube et agiter vigoureusement. Répéter l'agitation toutes les deux minutes jusqu'à ce que la matrice d'immobilisation des algues soit totalement dissoute. Les algues devraient être entièrement libérées en 5 à 10 minutes. Un vortex peut être utilisé pour accélérer le processus.
4. Centrifuger le tube pendant 10 minutes à 3000 rpm dans une centrifugeuse de laboratoire conventionnelle.
5. Éliminer le surnageant et le remplacer par 10 ml d'eau déionisée.
6. Boucher le tube et l'agiter vigoureusement pour remettre les algues en suspension de façon homogène.
7. Centrifuger à nouveau le tube pendant 10 minutes à 3000 rpm et éliminer le surnageant.
8. Remettre les algues en suspension dans 10 ml de milieu de culture.

7.2. Règles générales pour la fiabilité des mesures de densité optique de suspensions d'algues

La technologie de l'Algaltoxkit est basée sur la mesure (rapide) de la densité optique (DO) de suspensions cellulaires d'algues dans les cellules spectrophotométriques jetables de 10 cm de longueur.

*(Les explications nécessaires sont données au **point 12.1.** pour faire face aux interférences rencontrées avec des échantillons troubles ou colorés.)*

La mesure de la DO peut être réalisée avec n'importe quel spectrophotomètre muni d'un filtre de 670 nanomètres et équipé d'un support pour cellules de 10 cm.

Les densités optiques peuvent être facilement converties en nombres d'algues à l'aide des formules de régression données sur la feuille DO/N comprise dans chaque Algaltoxkit (voir annexe I).



Figure 2 : préparation de l'inoculum d'algues (d'après la *standard operational procedure* de l'Algaltokit de MicroBio Tests).

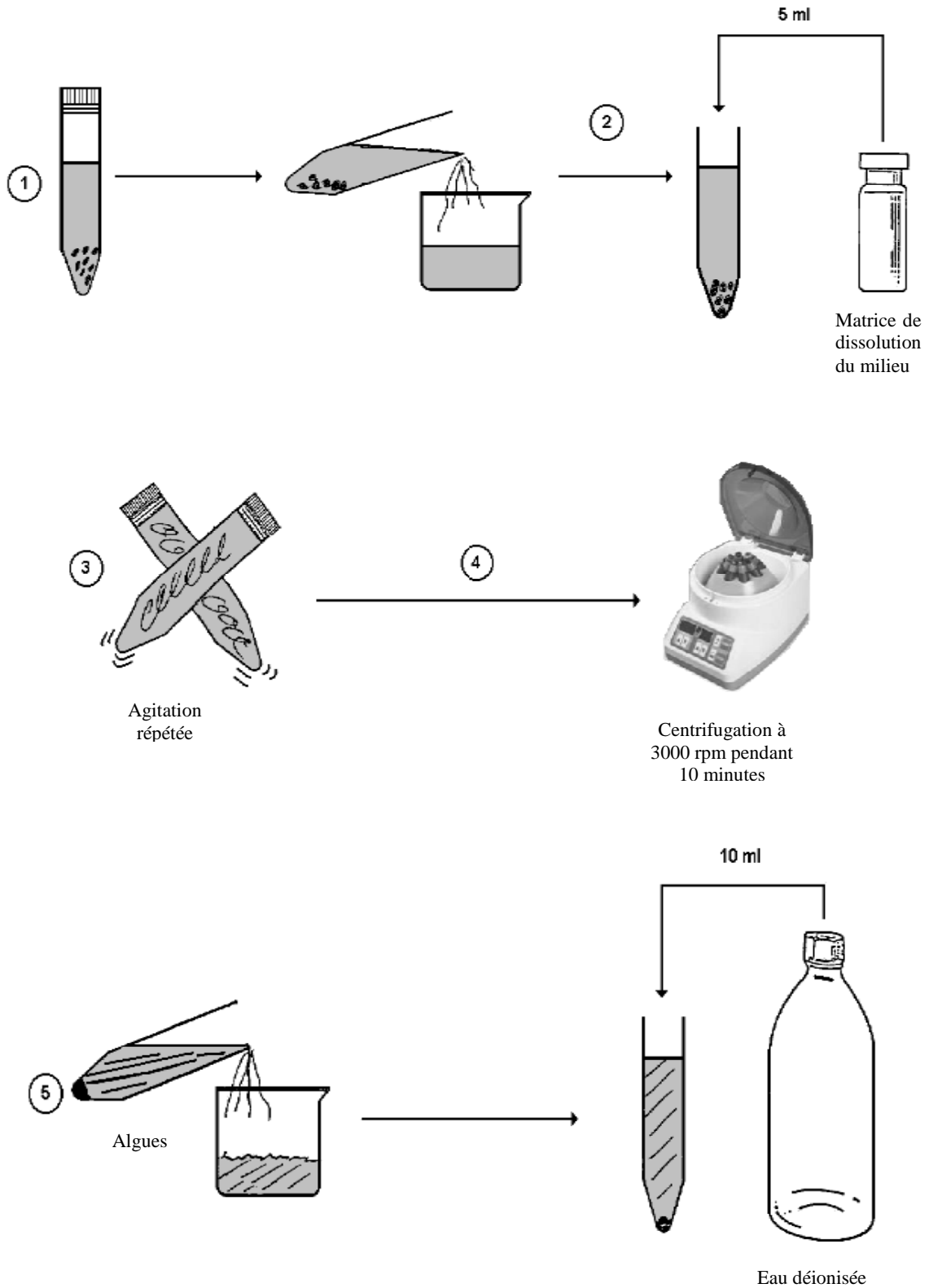
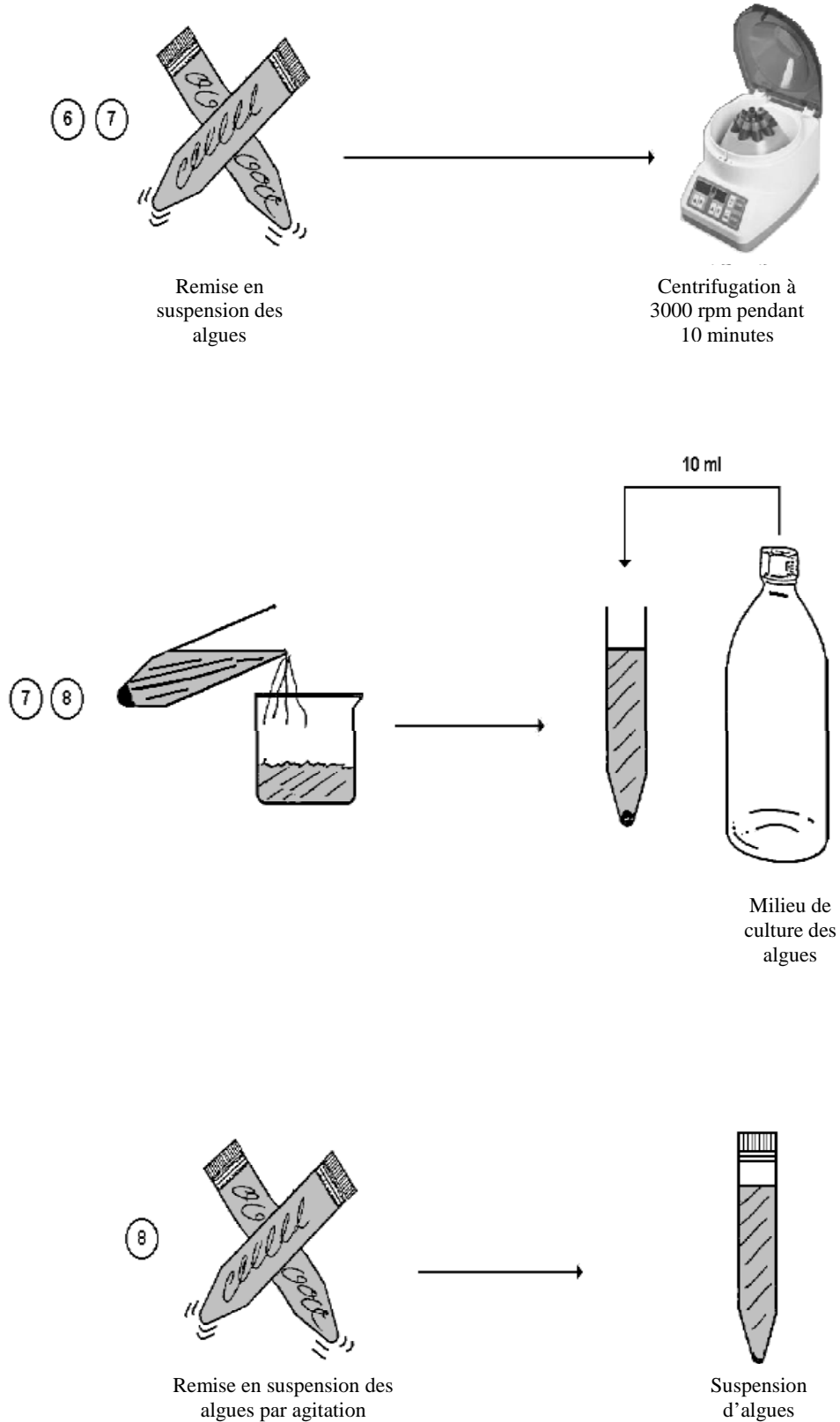


Figure 2 : préparation de l'inoculum d'algues (d'après la *standard operational procedure* de l'Algaltokit de MicroBio Tests).



Afin de maximiser la reproductibilité de la lecture des DO, **les précautions suivantes doivent être respectées de manière très stricte:**

- Les cellules doivent toujours être placées dans le spectrophotomètre dans le même sens, à savoir avec les flèches imprimées sur les deux côtés latéraux des cellules pointant vers la gauche.
- Le spectrophotomètre doit être étalonné avant les mesures de DO des suspensions d'algues. L'étalonnage doit être effectué avec la cellule d'étalonnage remplie de milieu de culture (**point 6.1**). Il est conseillé d'étalonner le matériel à intervalles réguliers au cours de la journée de mesures.
- Les suspensions d'algues dans les cellules doivent être agitées pendant 10 secondes immédiatement avant leur introduction dans le spectrophotomètre pour assurer une répartition homogène des algues.
- Les lectures de DO doivent être réalisées dans les 10 secondes après l'agitation des cellules, c'est-à-dire avant que les algues ne commencent à se redéposer.

REMARQUE IMPORTANTE:

La régression DO/N est donnée à titre d'exemple et a été déterminée avec un spectrophotomètre Jenway 6300 (fabricant: Jenway Ltd, Angleterre). Elle est spécifique à ce type de matériel. Dans le cas où un autre spectrophotomètre est utilisé, les valeurs de DO mesurées peuvent ne pas correspondre exactement avec le nombre d'algues de la régression donnée. Dans ce cas, il est conseillé de contrôler d'abord les lectures de DO avec ses propres comptages d'algues, et si nécessaire de travailler sur un nouveau graphique DO/N.

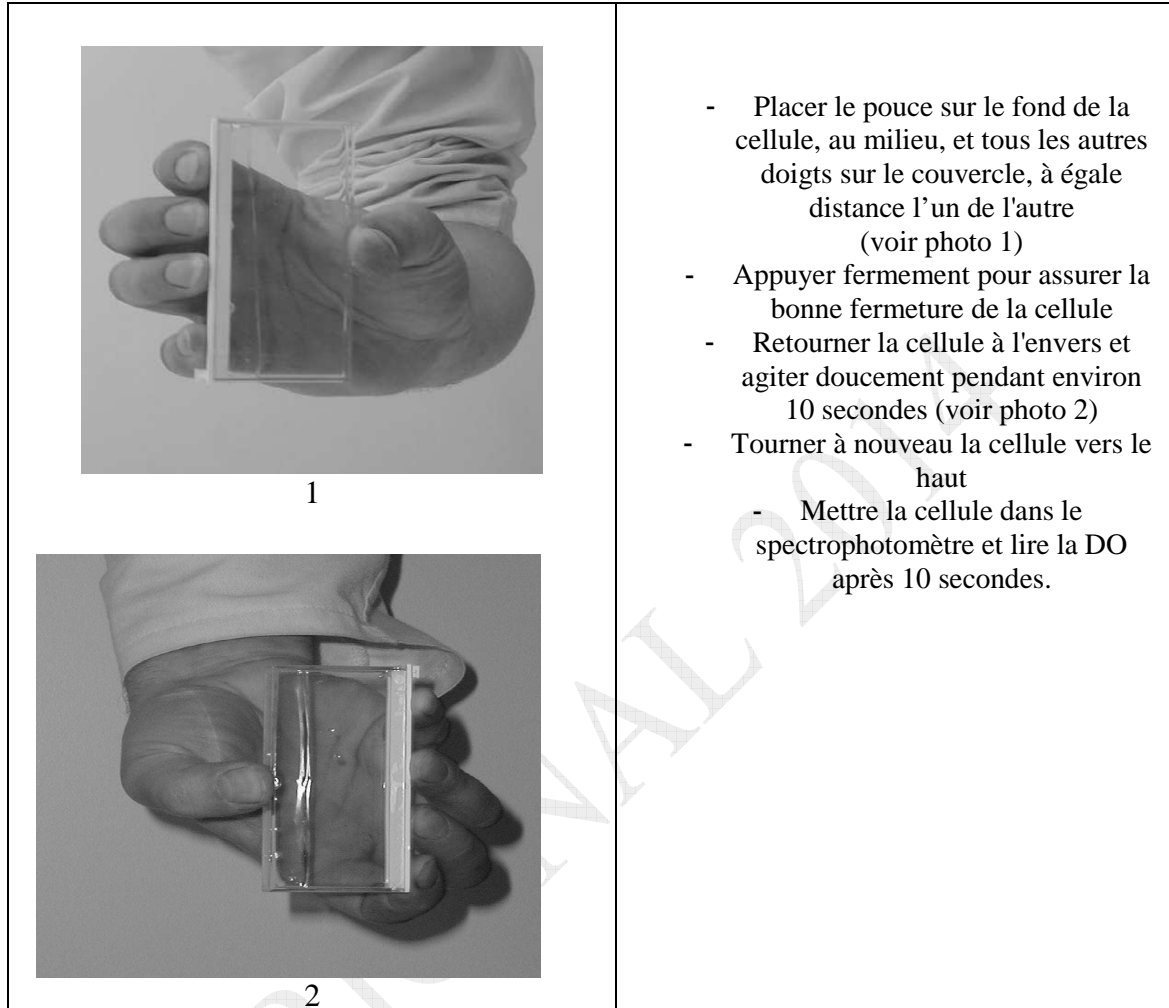
8. Préparation de l'inoculum d'algues concentré

8.1. Procédure (voir figure 3bis)

1. Verser la suspension d'algues du tube dans un ballon jaugé de 25 ml et amener le liquide au trait avec du milieu de culture. Boucher et agiter pour homogénéiser la suspension d'algues.
2. Prendre les deux cellules étiquetées «Calibration long cell» et « Algal Stock cell ».
3. Remplir la cellule d'étalonnage avec 25 ml de milieu de culture d'algues et fermer la cellule avec le couvercle.
4. Mettre cette cellule dans le spectrophotomètre et étalonner l'instrument.
5. Transférer la suspension d'algues dans la cellule « Algal Stock cell » et bien fermer le couvercle.
6. Bien agiter cette cellule pour distribuer uniformément la suspension d'algues (**figure 3**).

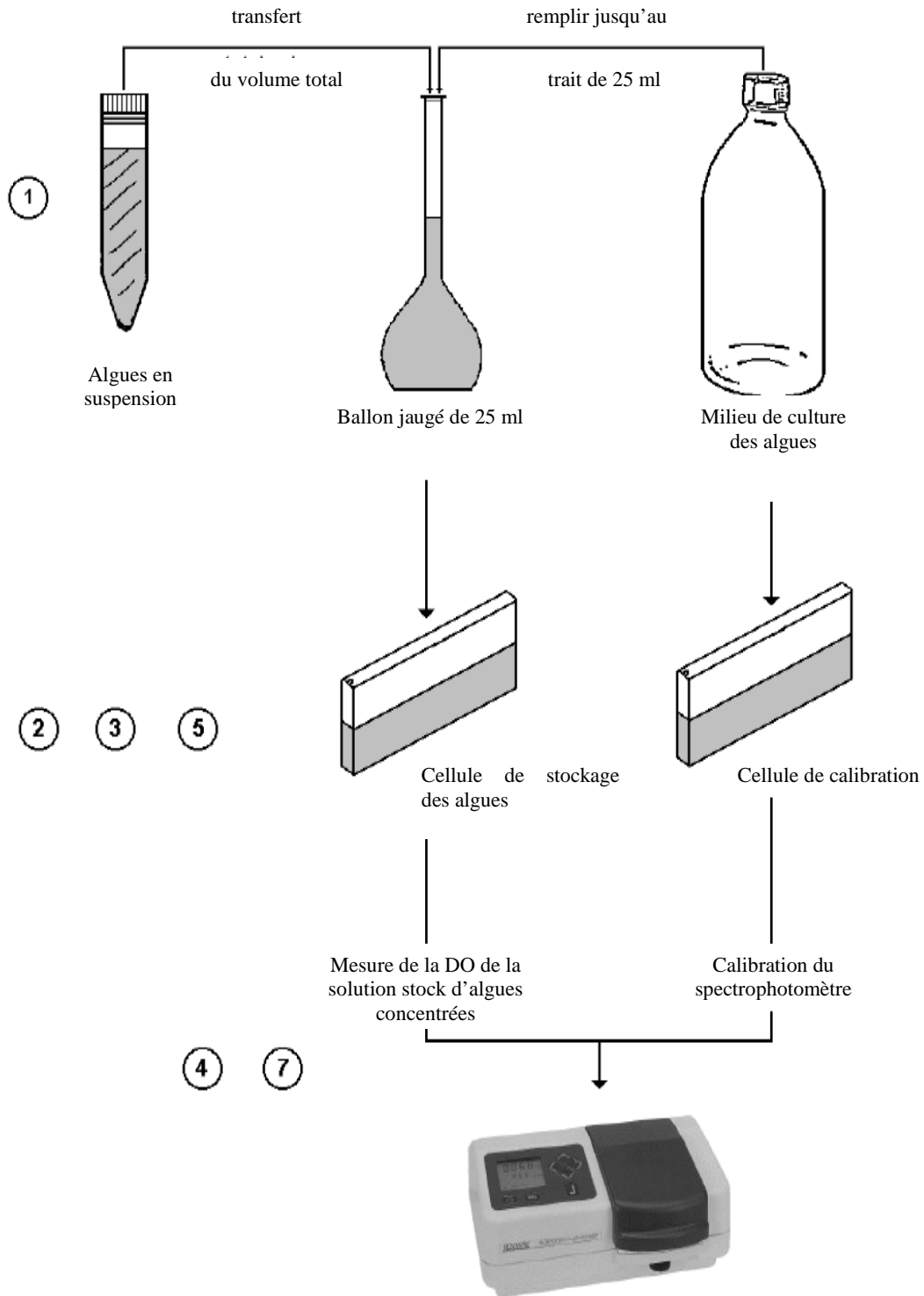


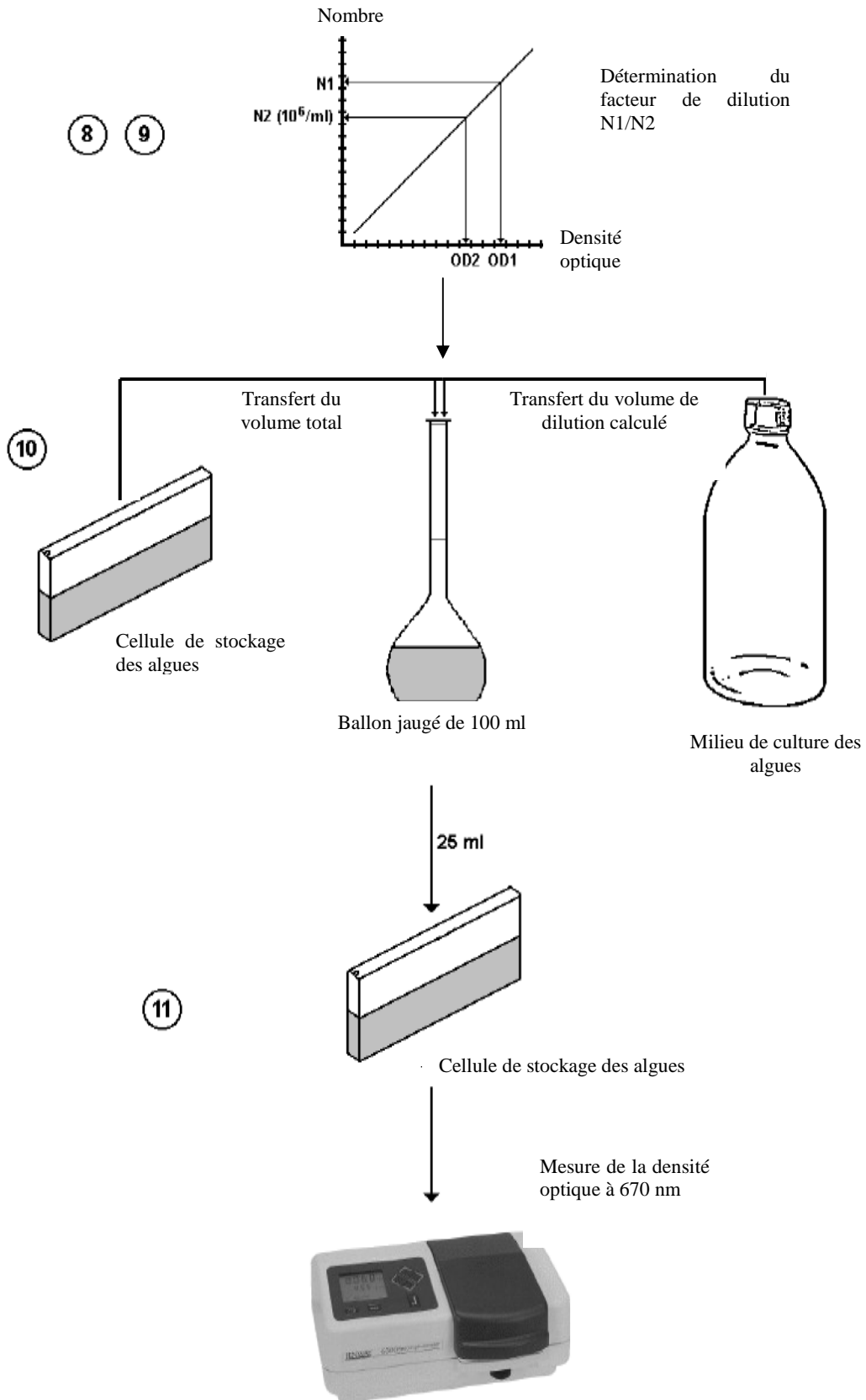
Figure 3 : Procédure d'agitation des cellules contenant les suspensions d'algues (d'après la *standard operational procedure* de l'Algaltokit de MicroBio Tests).



Pour assurer une reproductibilité maximale, cette opération, qui sera par la suite appliquée à toutes les mesures de DO des suspensions d'algues dans les cellules, devrait être effectuée d'une manière standard.

Figure 3bis : préparation de l'inoculum d'algues concentré (d'après la *standard operational procedure* de l'Algaltookit de MicroBio Tests).





7. Mettre la cellule « Algal Stock cell » dans le spectrophotomètre et relever la densité optique (DO1) après 10 secondes.
8. Rechercher le nombre d'algues (N1) correspondant à DO1 sur la feuille de densité optique/nombre d'algues (DO/N).
9. Avec un N2 égal à 1.10^6 algues/ml, calculer le facteur de dilution nécessaire pour atteindre une densité optique égale à la DO2 à partir du rapport N1/N2, correspondant à une densité d'algues de 1.10^6 cellules par ml.
10. Transférer la suspension d'algues de la cellule « Algal Stock cell » dans un flacon de 100 ml et ajouter le volume de milieu de culture nécessaire pour obtenir une suspension de 1.10^6 cellules/ml. Boucher et agiter le flacon soigneusement pour distribuer les algues uniformément.

9. Préparation de la série de dilution de l'échantillon

9.1. Effluents

Comme indiqué dans la norme ISO 8692 - Section 7.4 «Préparation de l'échantillon d'essai et des solutions-mères » et/ou à l'annexe A (informative) – « Détection rapide de l'inhibition de la croissance algale par des eaux résiduaires », une série de dilutions 1 :1 (100% - 50% - 25% - 12,5% et 6,25%) est préparée par dilution en série de l'échantillon d'effluent en le diluant successivement de moitié (cf. US EPA/600/4-85/013, 1985) (voir détails ci-dessous).

9.1.1. Traitement de l'échantillon

Pour éliminer la turbidité, les échantillons doivent être filtrés sous vide avant l'essai (par exemple sur un filtre de $0,45 \mu\text{m}$ de porosité).

9.1.2. Préparation de la série de dilution 1 :1 de l'effluent

Procédure (voir **figure 4**)

1. Prendre six ballons jaugés de 200 ml et de les noter de C0 à C5. Le C0 est le flacon contrôle, C1 est l'effluent non dilué et C5 la plus forte dilution (voir **tableau 1**).

Tableau 1 : série de dilution de l'effluent

Flacon	Concentration en effluent (en %)
C0	0
C1	100
C2	50
C3	25
C4	12.5
C5	6.25

2. Remplir le flacon C1 jusqu'au trait avec l'effluent filtré et les solutions de nutriments (2 ml de « Stock Solution A » et 0.2 ml des « Stock Solution B, C et D »). Boucher le flacon et bien l'agiter pour homogénéiser le contenu.

3. Mettre 100 ml de milieu de culture dans les flacons C0, C2, C3, C4 et C5.

4. Transférer la moitié du contenu du flacon C1 (soit 100 ml) dans le ballon jaugé C2 (jusqu'au trait de C2) pour effectuer la première dilution 1:1 (50 % de l'effluent); boucher le flacon C2 et agiter vigoureusement pour homogénéiser le contenu.

5. Répéter l'opération indiquée à l'étape 4, pour les flacons C3, C4 et C5, c'est-à-dire :

- 100 ml de C2 dans C3 (= 25 % de l'effluent)
- 100 ml de C3 dans C4 (= 12.5 % de l'effluent)
- 100 ml de C4 dans C5 (= 6.25 % de l'effluent).

6. Vider et éliminer 100 ml de solution du flacon C5.

7. Ajouter 1 ml de la suspension à 1.10^6 algues/ml dans chaque flacon, afin d'obtenir une concentration initiale d'algues de 1.10^4 algues/ml dans chaque flacon. Boucher les flacons et agiter vigoureusement de façon à répartir uniformément les algues.

N.B. : L'ajout de 1 ml de suspension d'algues concentrée à chaque flacon et de 2.6 ml de solution stock d'éléments nutritifs à C1 (100 % de l'effluent) conduit à une erreur de 1 % dans les dilutions d'effluents respectives.

Cette petite erreur est autorisée afin de permettre une procédure moins compliquée pour la préparation de la série de dilutions de l'échantillon

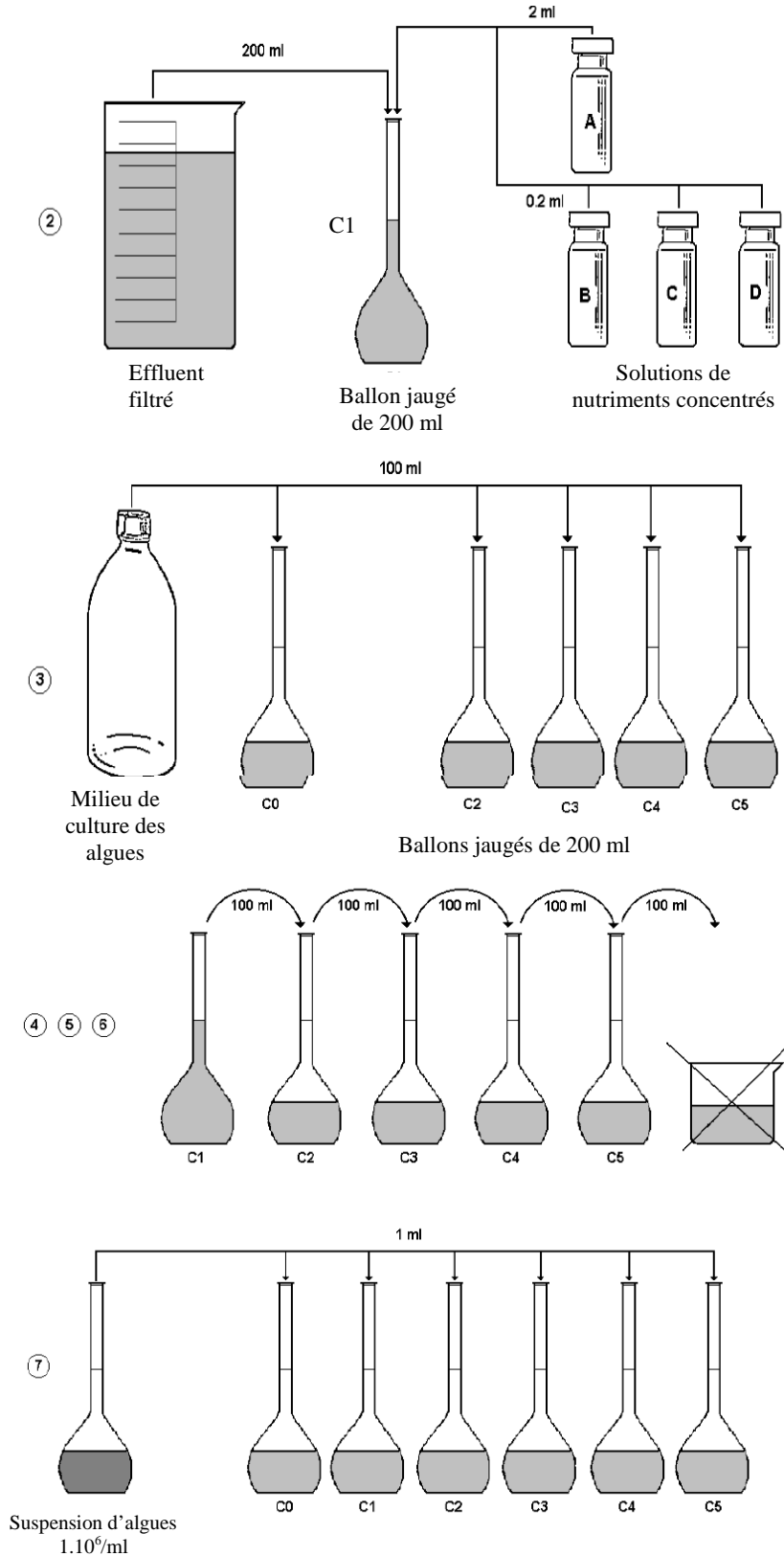
8. Passez au **point 10 : Transfert des dilutions d'algues-échantillon dans les flacons d'essai.**

Si, à la fin de la période d'essai de 3 jours, la plus faible concentration en effluent (6.25 %) inhibe sensiblement la croissance des algues par rapport au contrôle (par exemple, de près de 50 % d'inhibition ou plus), un deuxième essai doit être effectué avec une nouvelle série de dilutions (de concentrations plus faibles). La concentration en effluent la plus importante de cette nouvelle série de dilution sera la concentration la plus faible qui a produit 90-100 % d'inhibition de la croissance des algues dans le premier essai.

9.2. Composés chimiques

Bien que prévus par le kit, la présente méthode ne s'intéresse pas aux tests sur composés chimiques mais uniquement aux tests sur eaux résiduaires (effluents).

Figure 4 : tests sur effluents, préparation de la série de dilutions 1 : 1 (d'après la *standard operational procedure* de l'Algatokit de MicroBio Tests).



10. Transfert des dilutions d'algues-échantillon dans les flacons d'essai

Pour une évaluation statistiquement acceptable de l'inhibition de la croissance des algues, chaque concentration d'essai, ainsi que le contrôle, doivent être testés en trois répétitions.

Chaque Algaltoxkit contient deux ensembles de 18 cellules dans un bac transparent muni de 2 bandes en plastique et maintenus en position par 2 élastiques.

1. Prendre l'un des deux bacs transparents, retirer les élastiques et les bandes en plastique, et marquer les cellules par groupes de 3 (a, b, c) pour chaque concentration (de C0 à C5).

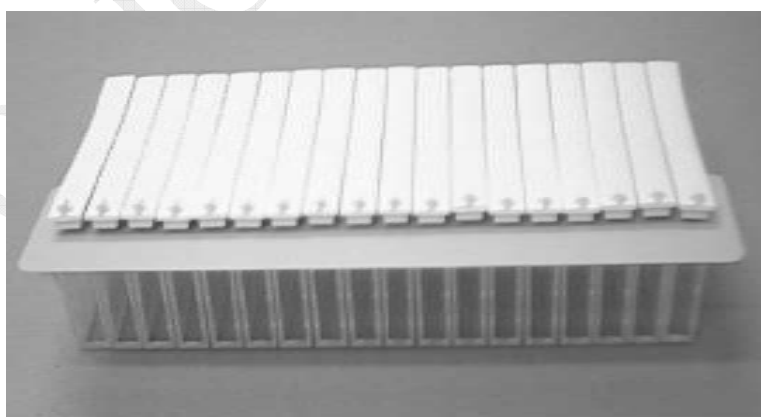
2. Ouvrir toutes les cellules et après agitation vigoureuse, transférer 25 ml des dilutions algues-échantillon à partir de chaque flacon dans les 3 cellules correspondantes.

11. Incubation des flacons d'essai

1. Fermer toutes les cellules et les remettre dans leur bac transparent. Soulever ensuite un peu le couvercle sur un côté des cellules et y glisser la bande en plastique afin de laisser une certaine ouverture vers le milieu des cellules permettant les échanges gazeux (voir **figure 5**).

Les cellules doivent être placées dans le bac transparent d'une façon aléatoire (c'est-à-dire pas dans la séquence C0 à C5, et en séparant les 3 répétitions des différentes dilutions), afin de compenser les éventuelles différences locales au cours de l'incubation.

Figure 5 : bac transparent contenant les cellules (d'après la *standard operational procedure* de l'Algaltoxkit de MicroBio Tests).



2. Suite à la prescription de la norme ISO 8692, section 7.6 «incubation», le bac transparent avec les cellules doit être incubé pendant 72 h dans un incubateur (ou 48 h comme admis par la norme pour des effluents ; ISO 8692 – Annexe A point A.10), ou dans une pièce dont la température ambiante est contrôlée, avec un éclairage uniforme constant par lampes fluorescentes blanc froid. Une illumination de 10000 lux est nécessaire pour l'éclairage latéral du bac ou 3000-4000 lux pour un éclairage par le fond.

Pour obtenir une croissance satisfaisante des algues au cours de la période d'essai de 3 jours (ou de 2 jours, admis pour un effluent ; ISO 8692 – Annexe A point A.10), la température dans l'incubateur ou dans la pièce à température contrôlée devrait être de 23 ± 2 °C.

Les procédures habituelles d'essai de toxicité sur les algues recommandent généralement que les algues soient maintenues en suspension continue pour faciliter le transfert de CO₂ et réduire les variations du pH. Des enquêtes détaillées avec l'Algaltookit ont cependant révélé qu'une remise en suspension des algues une fois par jour, immédiatement avant la lecture de DO des cellules, suffisait largement pour obtenir le nombre minimum de divisions d'algues prescrit dans les procédures habituelles. L'agitation continue des flacons d'essai n'est donc pas obligatoire pour l'essai Algaltookit.

12. Rapport de résultats

Comme indiqué dans la norme ISO 8692, l'inhibition de la croissance des algues par rapport au contrôle doit être déterminée toutes les 24 heures. La mesure de la DO à 670 nm des suspensions d'algues dans les cellules devrait être réalisée durant les 3 jours d'essai, c'est à dire après 24 h, 48 h (et 72 h le cas échéant) d'exposition à la substance toxique. Les cellules doivent être replacées dans l'incubateur de manière aléatoire après la mesure journalière. Les résultats quotidiens pour chaque cellule sont consignés sur la «Feuille de résultats » (exemple **en annexe II**).

12.1. Interférence des échantillons colorés sur les lectures de DO

La couleur des échantillons environnementaux peut interférer avec les lectures de DO des suspensions d'algues, surtout quand la couleur présente une absorption à la longueur d'onde qui est utilisée pour mesurer la densité des algues (670 nm).

Quoi qu'il en soit, il est important de rappeler que la détermination de la toxicité, vis-à-vis des microalgues, des échantillons très colorés est automatiquement biaisée par les interférences de la couleur avec la pénétration de la lumière dans le milieu contenant les algues. En outre, les mesures de densité optique dans les cellules ne sont possibles que jusqu'à une certaine intensité de coloration.

Pour les échantillons colorés, une série de dilution sans algues devrait être constituée. Cette technique nécessite 5 cellules supplémentaires, qui ne sont pas incluses dans les 2 séries de 18 cellules incluses dans chaque Algaltookit mais qui peuvent être obtenues séparément.

1. Après avoir préparé la série de dilution de l'échantillon dans les ballons jaugés mais avant l'ajout de la suspension d'algues concentrée, remplir 5 cellules avec 25 ml de la dilution correspondante.
2. Garder les 5 cellules avec les dilutions (de couleur) à part et procéder à nouveau à l'étape 7 du **point 9.1.2.** (Préparation de la série de dilution 1 :1 de l'effluent), en n'ajoutant que 0.75 ml de suspension concentrée d'algues à chaque flacon de dilution (qui contiennent 75 ml de solution chacun) au lieu de 1 ml.
3. Avant la mesure quotidienne de la DO des cellules contenant les dilutions algues-substances toxiques, étalonner le spectrophotomètre avec les cellules contenant les dilutions correspondantes de substances toxiques colorées.

Les cellules contenant les dilutions toxiques des substances colorées doivent aussi être incubées dans les mêmes conditions de lumière et de température que les cellules du bac transparent. De cette façon, les changements de couleur au cours des 3 (2) jours d'exposition seront automatiquement pris en compte lors de l'étalonnage réalisé tous les jours avec les cellules correspondantes.

En cas d'interférence des valeurs de densité optique par la turbidité, cette méthode peut également être utilisée.

13. Traitement des données

1. Calculer la moyenne journalière des valeurs de DO pour les 3 répétitions de cellules du contrôle et pour les différentes dilutions de la substance toxique.
2. Calculer l'inhibition de croissance des algues pour chaque concentration de substance toxique et la E_rC_{50} à 48 ou 72 h correspondante selon les protocoles de traitement de données internationalement acceptés (par exemple, la norme ISO 8692 ou de la ligne directrice 201 de l'OCDE).

N.B. Un logiciel de traitement automatique des résultats de l'Algaltokit est disponible pour les utilisateurs de l'Algaltokit.

14. Validité de l'essai

Les lignes directrices nationales et internationales pour les tests de toxicité sur les algues ont chacune leurs propres critères de validité.

La norme ISO 8692 - Section 8 «Critères de validité» stipule, par exemple, que le taux de croissance moyen dans le contrôle soit au moins de 1,4 par jour.

La ligne directrice 201 de l'OCDE indique, quant à elle, que le taux de croissance du contrôle doit être d'au moins 0,92 par jour, à savoir un facteur de multiplication de seulement 16.

Les deux organisations indiquent en outre que les valeurs de pH dans les contrôles ne doivent pas augmenter de plus de 1,5 unités par rapport au pH initial dans le milieu de culture.

15. Essai sur substance de référence

Afin de vérifier la bonne exécution du protocole d'essai ainsi que sa sensibilité, il est conseillé d'effectuer un essai sur substance de référence de temps à autre (par exemple tous les 5 à 10 essais).

Ce test de contrôle de qualité peut être réalisé avec la substance chimique de référence dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$).

Procédure:

Une série de dilutions allant de 1.8 mg/l à 0.18 mg/l doit être préparée suivant les instructions données dans la section **9.2.2. Essai définitif – 9.2.2.1. C1-C5 s'étend sur un ordre de grandeur.**

1. Prendre 8 flacons calibrés de 100 ml, les étiqueter «Stock 1» et «Stock 2» et C0 à C5.
2. Peser 100 mg de dichromate de potassium sur une balance analytique et les transférer dans le flacon «Stock 1». Amener le volume jusqu'au trait avec du milieu de culture et agiter pour dissoudre le composé chimique et obtenir une solution de concentration 1 g/l («Stock 1»).
3. Transférer 1 ml de la solution «Stock 1» dans le flacon «Stock 2» et amener jusqu'au trait avec le milieu de culture. Agiter pour homogénéiser le contenu et obtenir une concentration de 10 mg/l («Stock 2»).
4. Transférer les volumes suivants de solution du flacon «Stock 2» dans les autres flacons tel que décrit ci-après:
 - 18 ml dans le flacon C1
 - 10 ml dans le flacon C2
 - 5.6 ml dans le flacon C3
 - 3.2 ml dans le flacon C4
 - 1.8 ml dans le flacon C5

Même remarque que précédemment pour la petite erreur (1%) dans les dilutions résultant de l'ajout de la suspension d'algues concentrée.

5. Ajuster le volume au trait de 100 ml avec du milieu de culture dans les ballons jaugés C0, C1, C2, C3, C4 et C5 (voir tableau 4).
6. Ajouter 1 ml de suspension d'algues (1.10^6 cellules/ml) dans les flacons C0, C1, C2, C3, C4 et C5, afin d'obtenir une densité d'algues de 1.10^4 algues/ml dans chaque flacon. Boucher et agiter vigoureusement les flacons pour répartir les algues de façon homogène.
7. Suivre les instructions du **paragraphe 10 (Transfert des dilutions d'algues-échantillon dans les flacons d'essai)** et des paragraphes suivants.

D'après les données obtenues avec le test de contrôle de qualité, la valeur de l' $E_r C_{50}$ 48 h ou 72 h calculée devrait être dans les limites de confiance à 95% stipulées dans la feuille de spécifications.

16. Version mise à jour du protocole standard de l'Algaltokit

Pour répondre aux spécifications de la norme ISO 8692 et de la ligne directrice 201 de l'OCDE (récemment modifiées), les modifications suivantes ont été apportées à la nouvelle version du protocole standard du microbiotest Algaltokit :

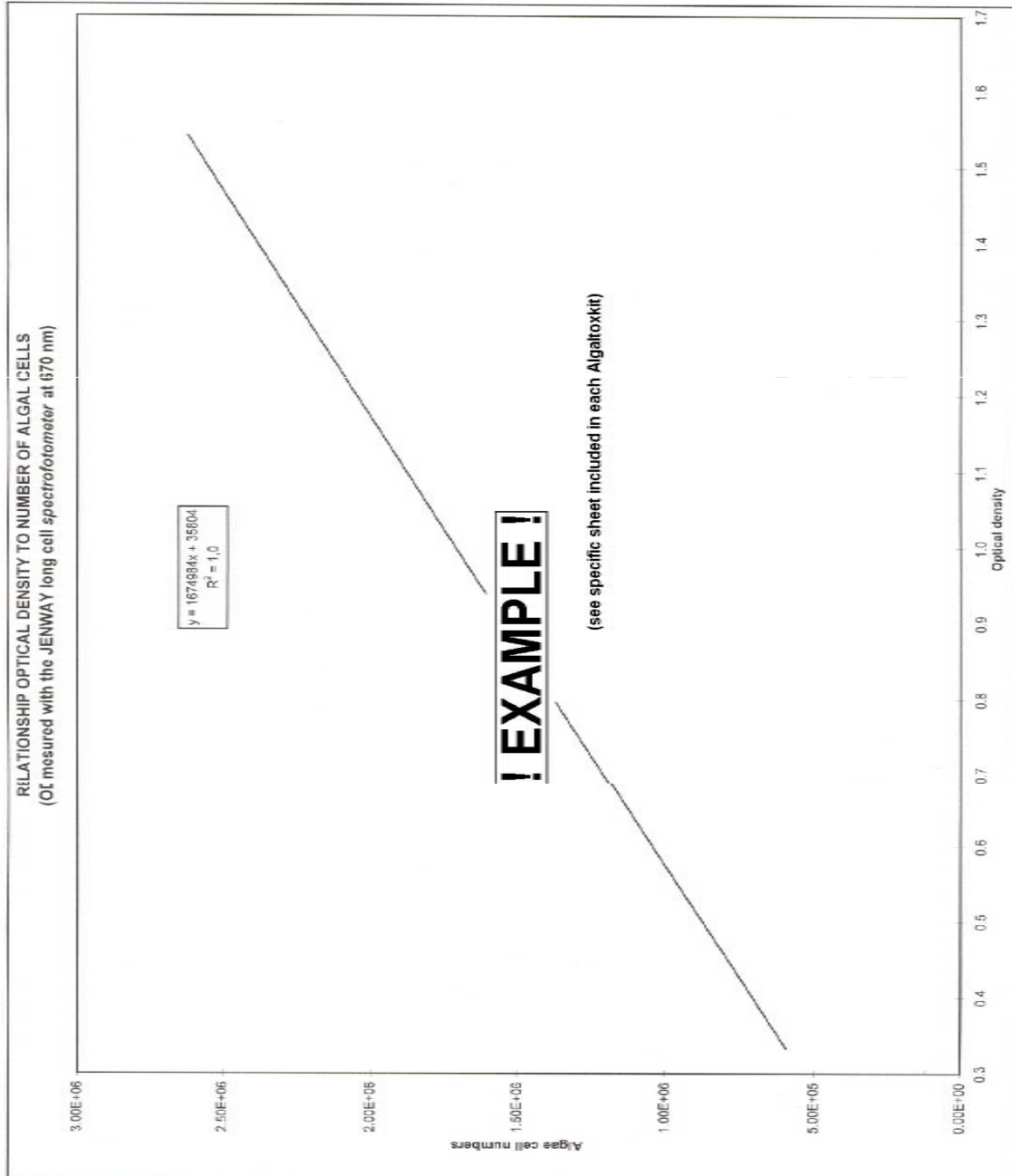
1. Les mesures de la croissance des algues dans les cellules sont réalisées à 24 h, 48 h (et 72 h le cas échéant) d'incubation et ne doivent plus être déterminées au début de l'essai (c'est-à-dire au t_0). La norme ISO 8692 spécifie en effet à la section « 7.7 Mesures » : « la densité cellulaire nominale peut être utilisée comme densité cellulaire initiale et la mesure de la densité cellulaire n'est pas nécessaire. »
2. Les calculs d'inhibition de croissance dans les concentrations d'essai en comparaison à la croissance dans le contrôle sont basés sur la détermination des taux de croissance μ moyens, après transformation des valeurs de DO en nombre de cellules. Un logiciel a été conçu pour le traitement des données de l'Algaltokit, celui-ci calcule les E_rC_{50} à 48 h ou 72h, E_rC_{10} à 48 h ou 72 h et E_rC_{20} à 48h ou 72h avec leurs intervalles de confiance à 95%. Ce logiciel est disponible gratuitement pour les utilisateurs de l'Algaltokit.

17. Références

- **ALGALTOXKIT F_{TM}**: Freshwater Toxicity Test with Microalgae, standard operational procedure.
- **Ligne directrice 201 de l'OCDE** pour les essais de produits chimiques. Algues d'eau douce et cyanobactéries, essai d'inhibition de la croissance.
- **Norme internationale ISO 8692**: Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires



ANNEXE I



ANNEXE II

ALGALTOXKIT F - FEUILLE DE RESULTATS

Nom de l'opérateur: Série de dilutions : concentration 1 :
 testée: concentration 2 :
 concentration 3 :
 concentration 4 :
 concentration 5 :

Date d'application du test :

Espèce testée:

Substance testée:

DENSITE OPTIQUE A 670nm							
Temps d'exposition	Réplicats	Contrôle	C5	C4	C3	C2	C1
24h	1						
	2						
	3						
	Moyenne						
	CV%						
48h	1						
	2						
	3						
	Moyenne						
	CV%						
72h	1						
	2						
	3						
	Moyenne						
	CV%						

