

**Direction de l'expertise Faune-Forêts-Territoire**

**PROCÉDURE DE PRÉPARATION ET DE MONTAGE DES  
OTOLITHES D'ANGUILLE**

**Version 2**

**par  
Rémi Tardif**

**Ministère des Ressources naturelles et de la Faune  
Direction générale du Bas-Saint-Laurent  
Avril 2012**

Référence à citer :

---

Tardif, R. (2012) *Procédure de préparation et de montage des otolithes d'anguille*. Version 2.  
Ministère des Ressources naturelles et de la Faune, Direction de l'expertise Faune-Forêts-  
Territoire, Direction générale du Bas-Saint-Laurent. 23 p.

---

# Procédure de préparation et de montage des otolithes d'anguille

**Ce document présente les différentes manipulations qui permettent d'obtenir l'image d'une coupe transversale de l'otolithe jusqu'à l'estimation de l'âge.**

Note : Ce document ne vise pas à remplacer une formation donnée par une personne expérimentée.

## Aperçu des étapes :

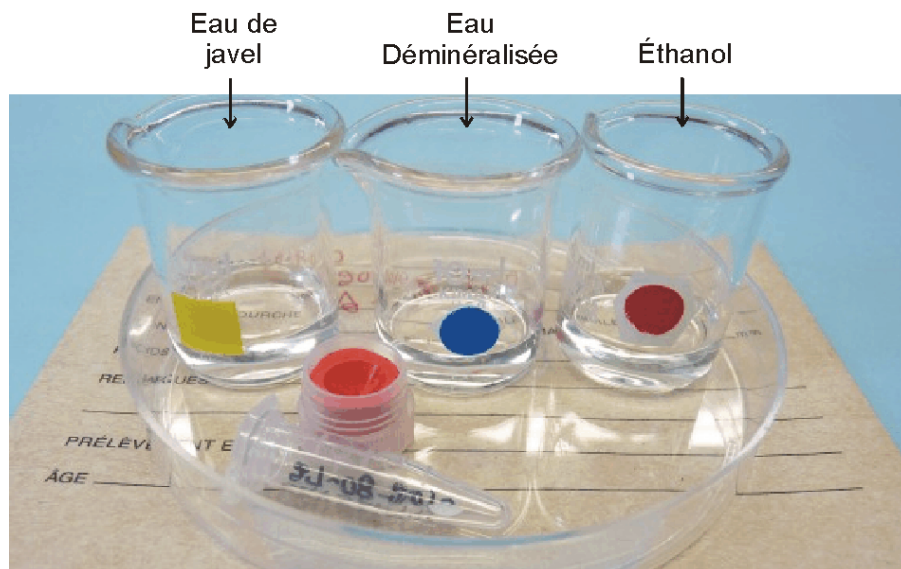
- 1- Nettoyage des otolithes
- 2- Montage sur une petite équerre
- 3- Enrobage dans de la résine époxy
- 4- Démoulage, coupe, ponçage, polissage
- 5- Vérification de la présence d'une marque d'oxytétracycline (OTC)
- 6- Décalcification à l'acide EDTA 5%
- 7- Coloration au bleu de toluidine 0,01%
- 8- Photographie des otolithes
- 9- Estimation de l'âge

Pour les deux premières étapes, soit les étapes qui précèdent l'enrobage dans la résine époxy, procéder par lot de 9 otolithes à la fois.

Note : Les otolithes doivent être conservés à sec dans un microtube inséré dans une enveloppe où les informations concernant la date, l'endroit de capture et la taille du spécimen sont inscrites.

### 1- Nettoyage des otolithes, rinçage, trempage dans l'éthanol, assèchement

Pour chaque échantillon d'otolithe, déposer sur l'enveloppe, un plat de pétri de 100 mm qui sera destiné à recevoir le microtube contenant les otolithes conservés à sec, trois petits béchers de 10 ml et un petit contenant destiné à recevoir l'otolithe lors du séchage.

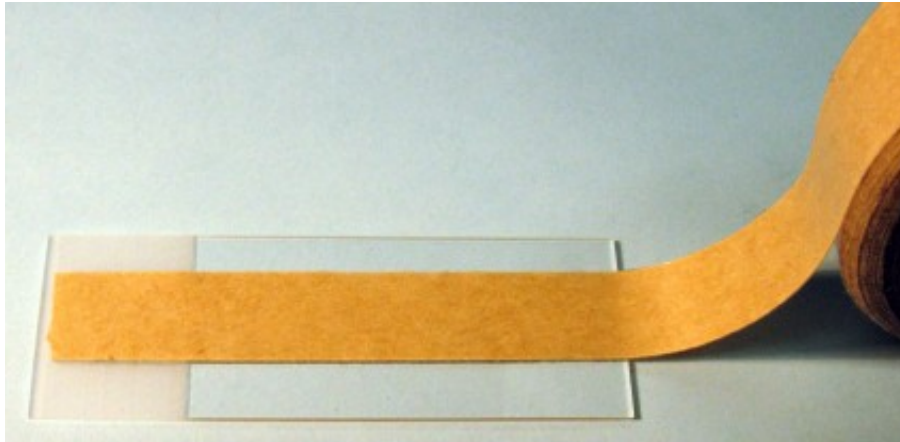


- a. Déposer un des deux otolithes dans le premier bécher de 10 ml et conserver l'autre otolithe en réserve. Utiliser des pinces à bouts en céramique pour les manipulations. Faire de même pour les huit autres otolithes. Lorsque tous les otolithes sont placés dans les béchers, verser la solution d'eau de javel 50 % de façon à recouvrir les otolithes pour une durée de 10 minutes. S'assurer que les otolithes ne flottent pas à la surface de la solution.
- b. Transférer l'otolithe dans un bécher d'eau déminéralisée pour une durée minimale de 10 minutes.
- c. Transférer l'otolithe dans le 3<sup>e</sup> bécher contenant l'éthanol 95 %. Durée 10 minutes.
- d. Transférer les otolithes dans un petit contenant, laisser évaporer l'éthanol à l'air libre.

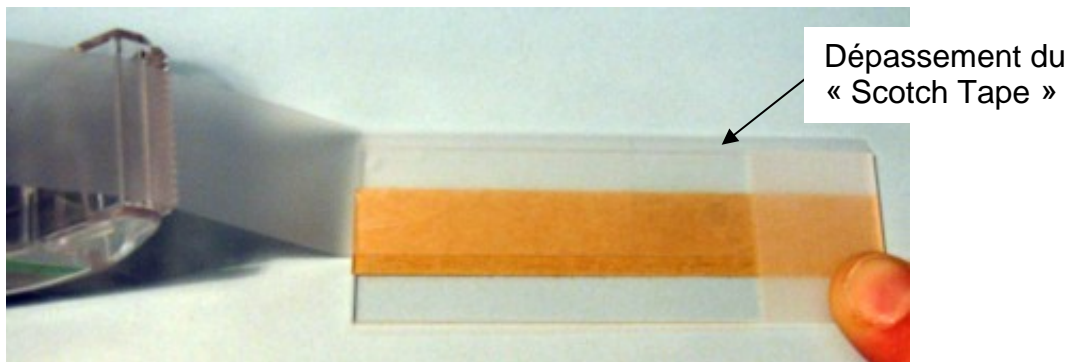
## 2- Montage sur une petite équerre de plastique avec colle à prise rapide

Trois otolithes peuvent être montés par lame de microscope.

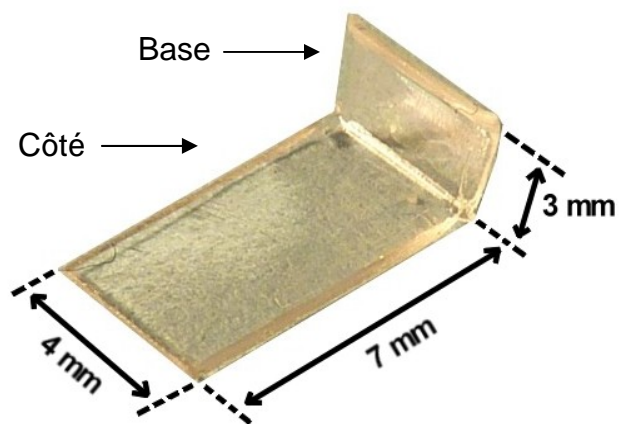
a. Sur une lame, coller le ruban à transfert d'adhésif, Scotch 3M # 465, largeur ½ pouce.



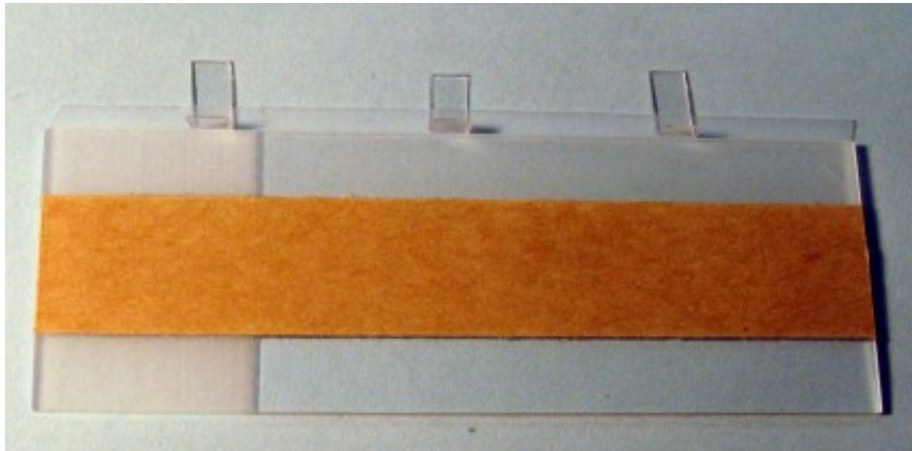
b. À l'endos de la lame, coller un ruban « Scotch Tape » transparent 3M en le laissant dépasser d'environ 3 mm du bord de la lame.



c. Préparer des petites équerres de plastique destinées à supporter les otolithes. Les équerres sont fabriquées dans du plastique clair récupéré sur des emballages « PETE 1 ». Les dimensions présentées ci-dessous peuvent varier légèrement.

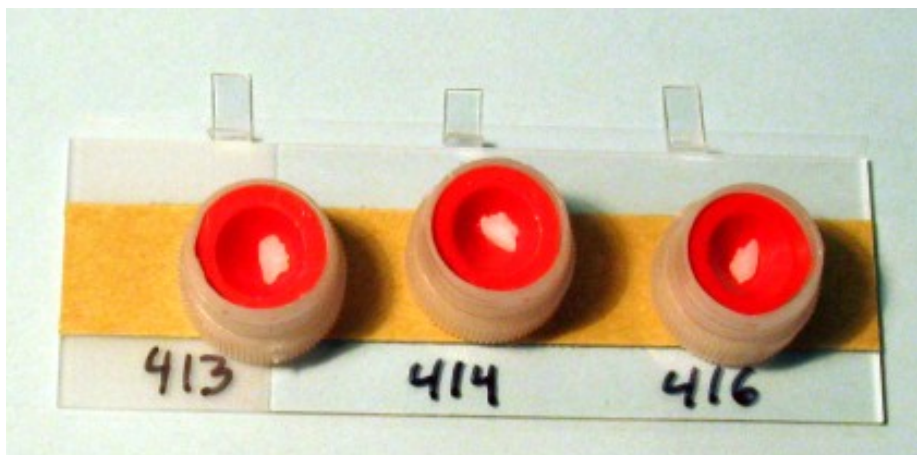


- d. Coller les petites équerres, de façon temporaire, sur la partie du ruban « Scotch Tape » qui dépasse de la lame.

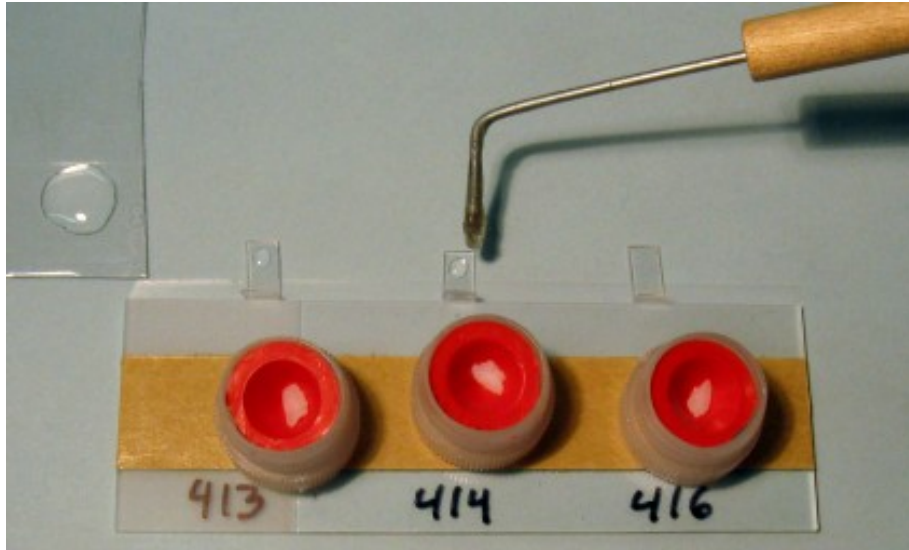


- e. Incrire les numéros d'otolithes sur la lame vis-à-vis les équerres.

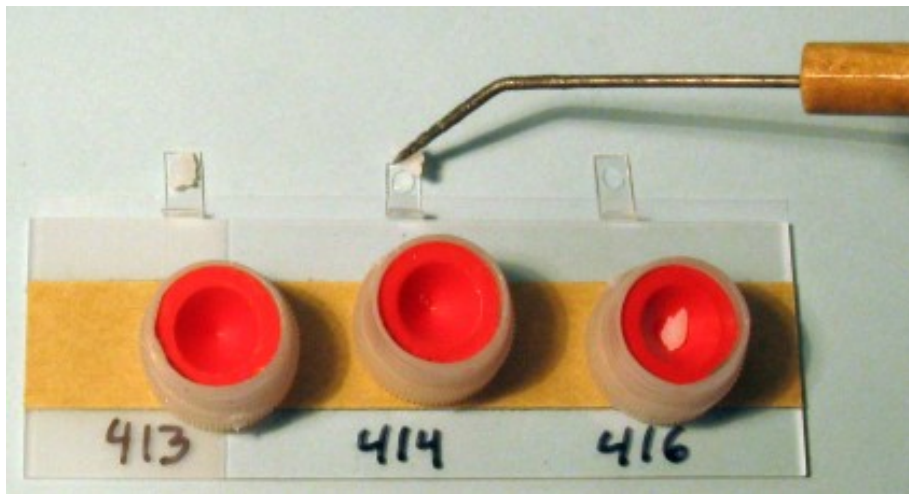
- f. Déposer les otolithes dans des petits contenants et placer ces derniers devant les numéros correspondants.



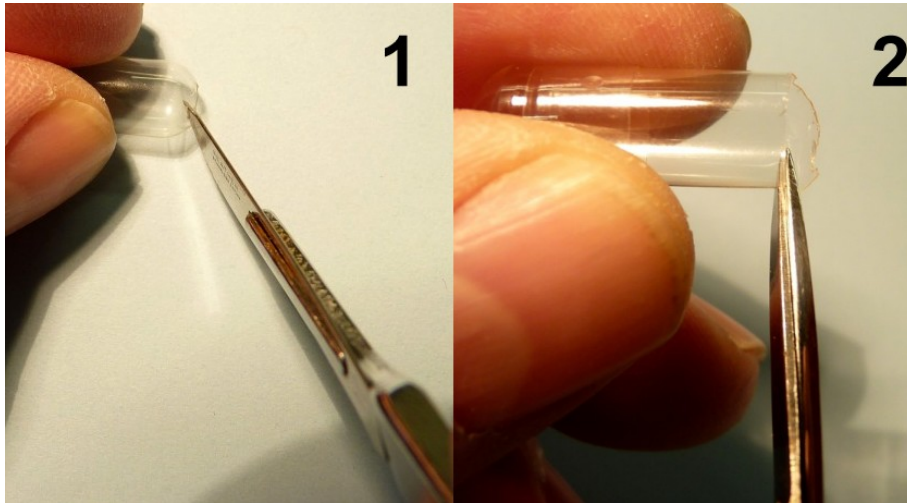
- g.** Verser de la colle à prise rapide de marque Krazy Glue (tout usage) sur une pièce de plastique jetable, tremper la pointe d'une aiguille montée dans la colle puis déposer une très petite goutte sur l'équerre de plastique à l'emplacement où sera collé l'otolithe. Pour plus de facilité, utiliser une aiguille montée dont l'extrémité est déjà enduite de colle séchée. Déposer la colle sur trois équerres à la fois, au maximum.



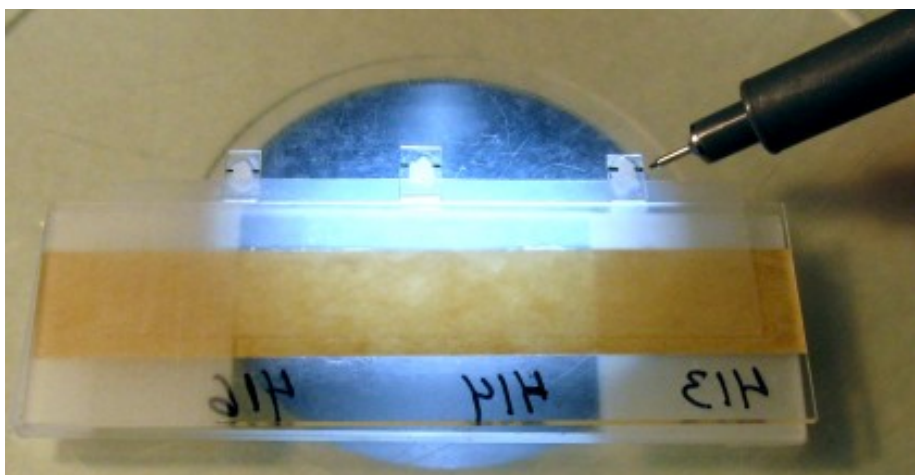
- h.** À l'aide d'une autre aiguille montée dont la pointe a été rendue adhérente par trempage dans la colle, prendre l'otolithe dans le petit contenant et le déposer dans la petite goutte de colle sur l'équerre de plastique. Aligner l'otolithe perpendiculairement à la lame de microscope. Pour les très petits otolithes, utiliser un binoculaire pour mieux les aligner.



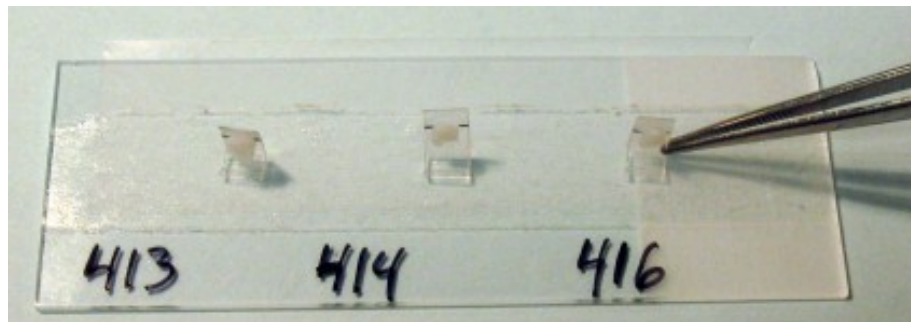
- i. Laisser sécher la colle Krazy Glue au moins trois heures avant de poursuivre. Idéalement, laisser sécher une nuit.
- j. Pendant les temps d'attente, préparer des moules cylindriques. Ceux-ci sont faits de capsules de gélatine vides dont l'extrémité arrondie est coupée. Utilisez seulement la partie la plus longue. Coupez-les de façon à former un moule de la plus grande taille possible.



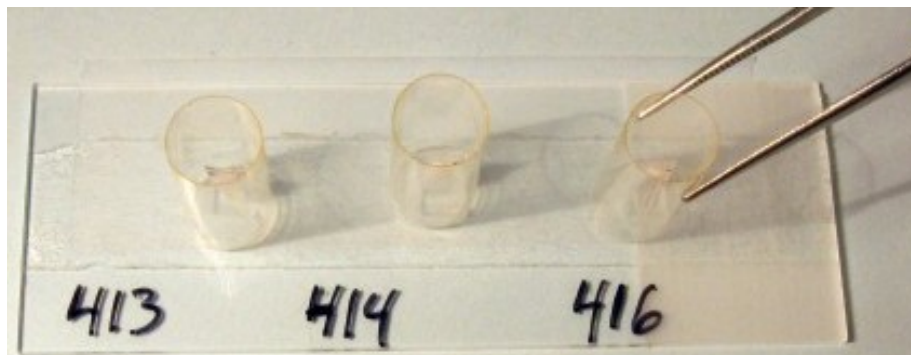
- k. Une fois la colle séchée, repérer le nucléus dans l'otolithe en utilisant l'éclairage diascopique du binoculaire (éclairage par transparence provenant de la base du binoculaire) et tracer deux lignes vis-à-vis le centre du nucléus à l'aide d'un crayon marqueur très fin (0,05 mm). Éviter de tracer directement au-dessus du nucleus pour ne pas le masquer. Idéalement, tracer les lignes à l'endos des petites équerres de plastiques. Si le nucléus n'est pas visible, tracer quand même deux marques de repère vis-à-vis l'endroit où l'on présume la présence du nucléus. S'aider, si possible, avec les cercles formés par les lignes de croissance annuelle. Une fois l'enrobage de l'otolithe terminé, le nucléus sera plus visible.



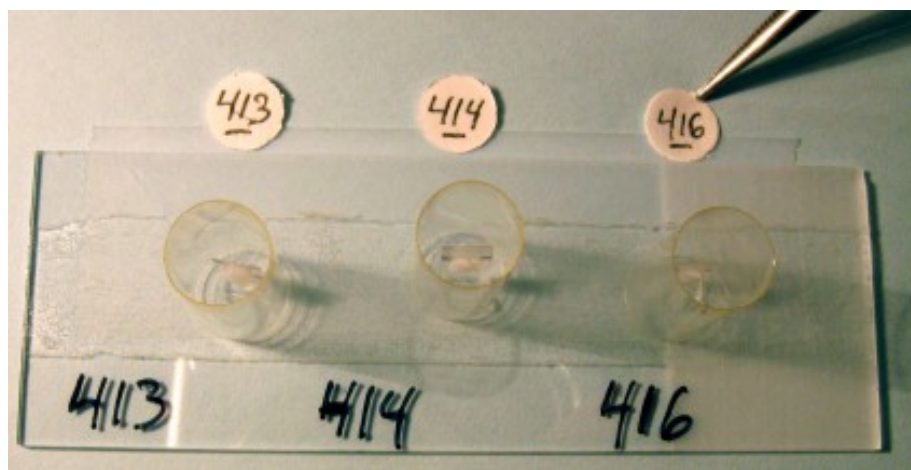
- l.** Enlever le papier protecteur du ruban à transfert d'adhésif et transférer l'équerre sur la pellicule collante, otolithe placé en position debout sur la lame.



- m.** Insérer un moule préparé à l'étape « J » sur chacune des équerres en le centrant par rapport à l'équerre. La partie du moule non coupée est placée sur la base. Exercer une légère pression sur le moule de façon qu'il adhère bien à la pellicule collante.



- n.** Préparer des rondelles de papier imperméable à l'aide d'une perforatrice dont le diamètre correspond à la dimension intérieure des moules en gélatine. Incrire les numéros d'otolithes sur les rondelles à l'aide d'un crayon marqueur indélébile à pointe très fine (0,05mm). Coller temporairement les étiquettes rondes sur la bande de « Scotch Tape ».



- o.** Avant de brasser la résine époxy et d'enrober le tout, on peut préparer deux ou trois lots d'otolithes selon les étapes ci-dessus.

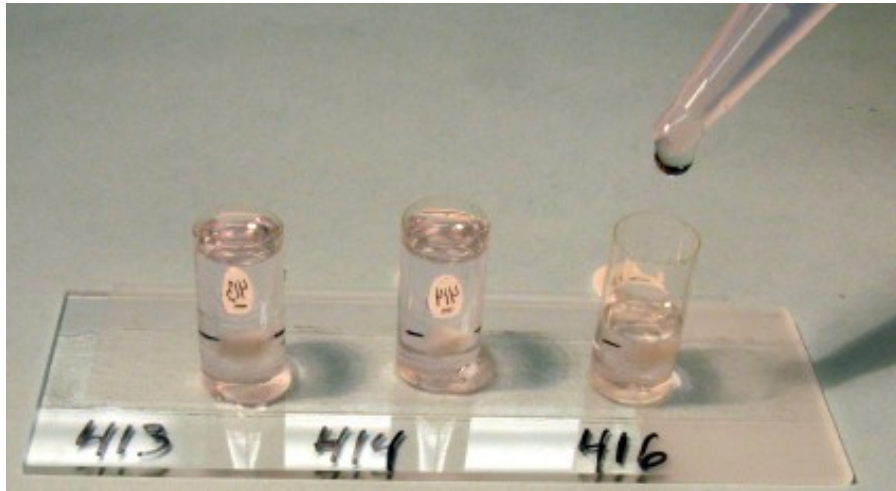
### 3- Enrobage dans de la résine époxy et numérotation

- a. Préparer la résine époxy. Le port de gants et de lunettes est recommandé pour cette étape. Effectuer les manipulations avec précision. La qualité de la résine sera meilleure et il y aura moins de risques qu'une vive réaction exothermique se produise dans la résine. Dans un verre de plastique, à l'aide d'une cuillère jetable, déposer 18,0 g de résine MIA-100 et ajouter 5,0 g de durcisseur MIA-95 avec un compte-gouttes jetable. Placer le verre contenant le mélange dans un bain-marie à 50°C et mélanger délicatement avec un bâtonnet durant 5 minutes. Éviter d'incorporer des bulles d'air dans la résine en brassant trop vite, surtout au début. L'élévation de la température liquéfie la résine et aide les bulles à remonter à la surface. Si le taux d'humidité dans la pièce est plus élevé que 50 %, le durcissement peut se faire très rapidement. Une fois le brassage terminé, utiliser la résine immédiatement. Après 12 minutes, la résine commence déjà à épaissir et n'est plus utilisable.

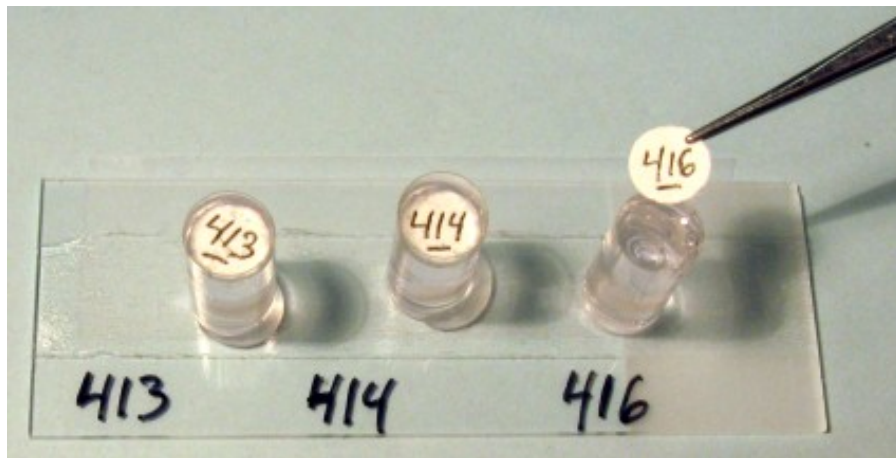
Note : La résine et le durcisseur peuvent normalement se conserver plusieurs années. Toutefois, après une période de quelques mois sans utilisation, faire un test avec la résine sans inclure d'otolithe. Laisser durcir la résine dans les moules de gélatine et vérifier la qualité de la résine. Aussi, avant de refermer les contenants de résine et de durcisseur, prendre soin d'essuyer les goulots avec un papier essuie-tout imbibé d'acétone pour éviter que les bouchons collent.



- b. Remplir les moules de résine jusqu'à environ 1 mm du bord. Utiliser un compte-goutte neuf et non celui qui a servi lors du brassage de la résine.



- c. Déposer les rondelles de papier imperméable numérotées sur la surface de la résine.



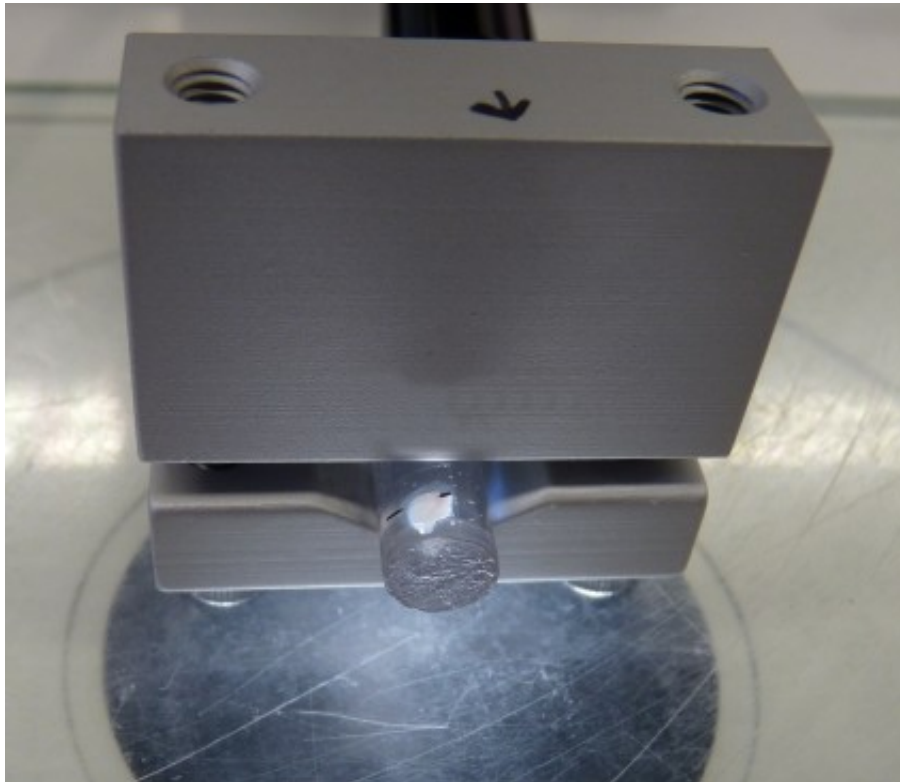
- d. Laisser durcir la résine époxy pendant une nuit.

#### 4- Démoulage, coupe, ponçage, polissage

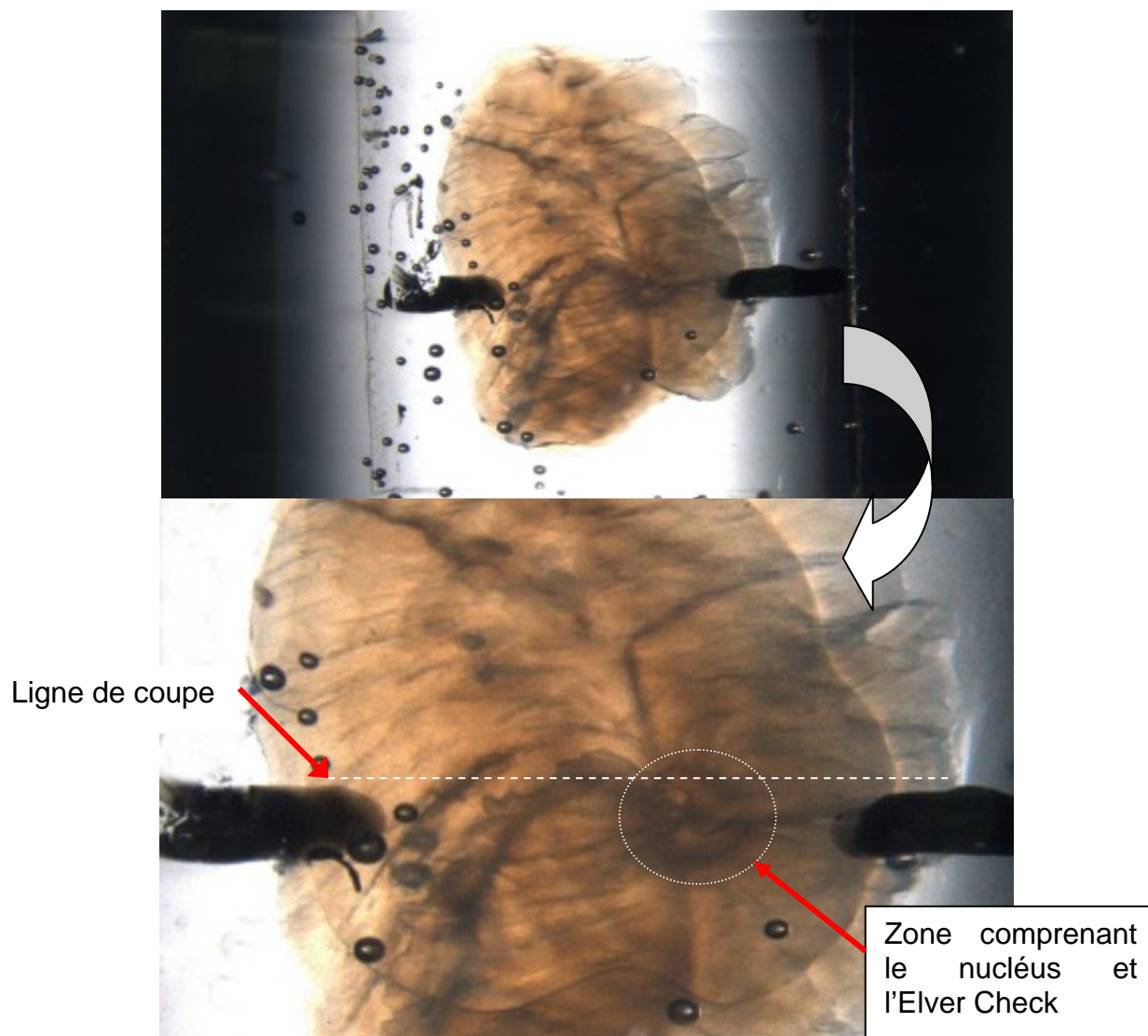
- a. Démoulage des enrobages. Placer les lames dans un plat d'eau tiède durant 30 minutes pour dissoudre les moules de gélatine. Remplacer l'eau à quelques reprises pour accélérer la dissolution de la gélatine. Retirer les lames une à la fois du plat d'eau et séparer l'enrobage de la lame de microscope. Si un bourrelet de résine est présent à la base des enrobages, l'enlever à l'aide d'un scalpel. Faire tremper à nouveau pour éliminer le reste de gélatine. Essuyer avec du papier essuie-tout brun pour enlever toute trace de gélatine.



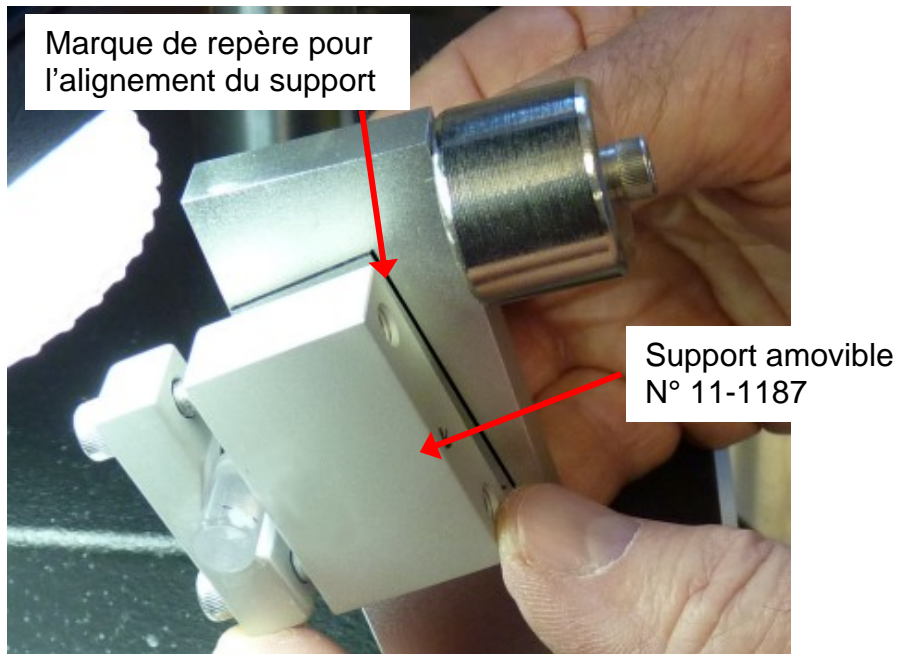
- b. Coupe des otolithes. Fixer l'enrobage sur le support amovible de la scie Isomet de façon que les deux marques de repère soient situés au dessus de l'otolithe une fois le support amovible fixé sur la scie. Serrer les deux vis hexagonales de retenue.



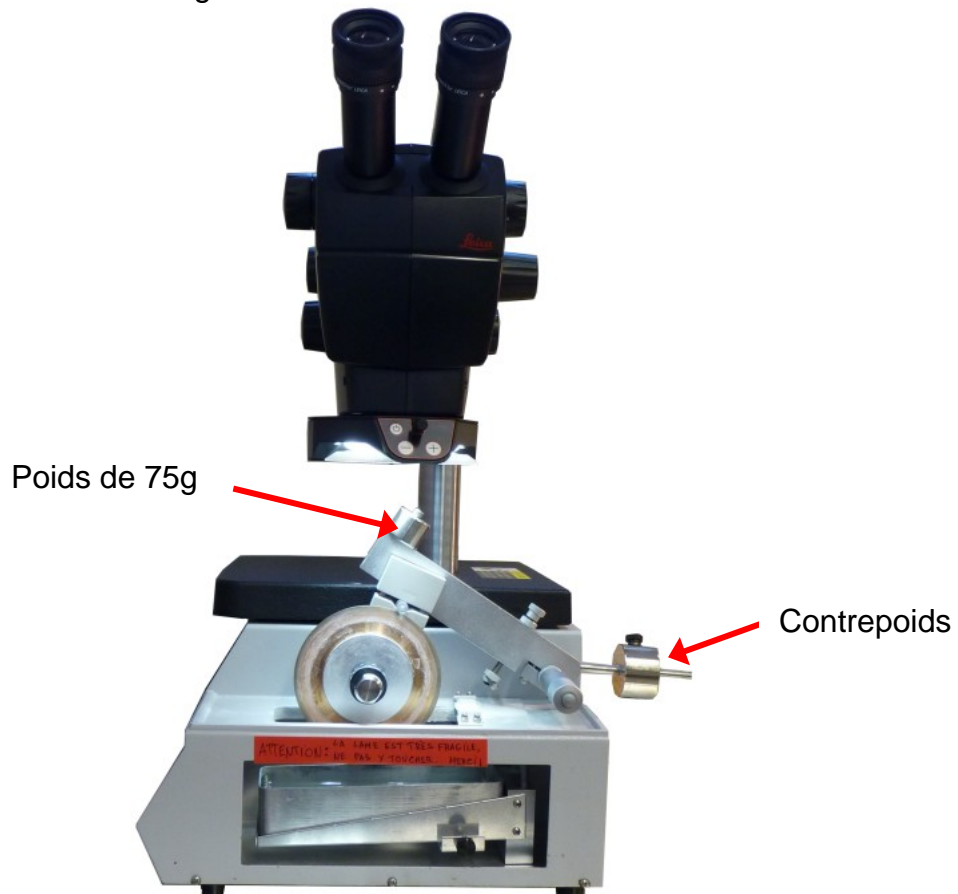
- c. En utilisant l'éclairage diascopique du binoculaire (éclairage par transparence provenant de la base du binoculaire), localiser le nucléus par rapport aux deux marques de repère et déterminer l'emplacement de la ligne de coupe. Garder cet emplacement en mémoire par rapport aux deux marques de repère. (Exemple : ligne de coupe en bordure des deux marques de repère ou légèrement à l'intérieur des marques de repère). Ne pas viser le centre du nucléus, il y a trop de risque de dépasser le nucléus si l'on commet une erreur de manipulation. Il est préférable de viser le  $\frac{1}{4}$  du nucléus.



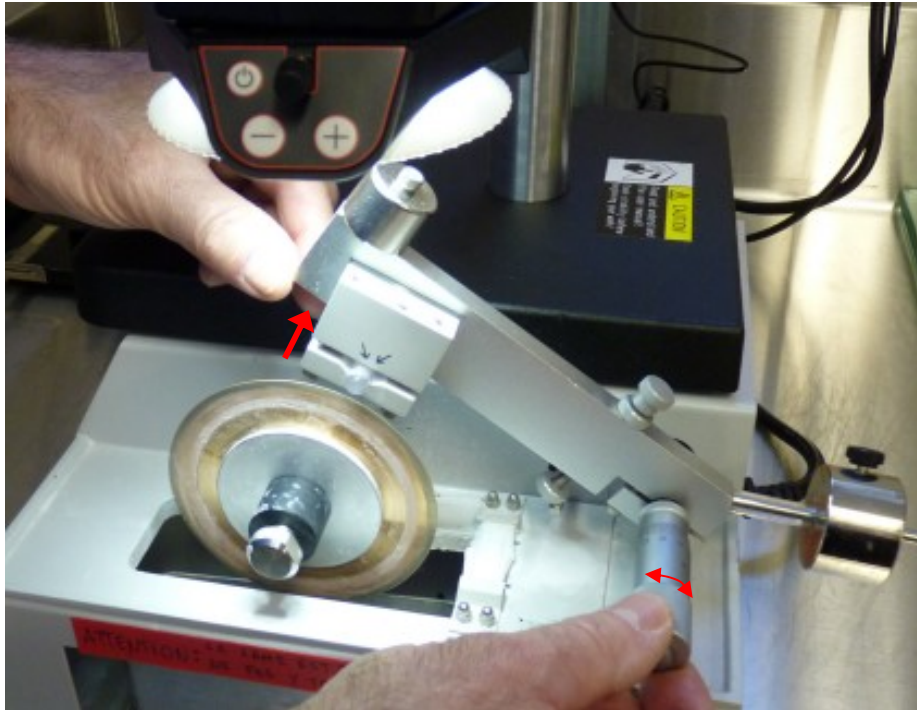
- d. La lame de la scie Isomet (Isomet Wafering Blade 4 po. N° 11-4244) doit tremper dans l'eau pendant la coupe des enrobages. Remplir le bac situé sous la scie avec de l'eau du robinet. Ne pas oublier de vider le bac à la fin des coupes pour éviter tous dépôts sur la lame diamantée.
- e. Installer le support amovible sur le bras de la scie Isomet. Aligner le support sur la marque de repère tracée sur le bras de façon à ce que le mécanisme d'arrêt automatique de la scie fonctionne correctement. *Note : L'utilisation en alternance de deux supports amovibles N° 11-1187 sur la scie Isomet permet de gagner du temps, pendant la coupe d'un enrobage, on peut installer et ajuster un autre enrobage dans le deuxième support.*



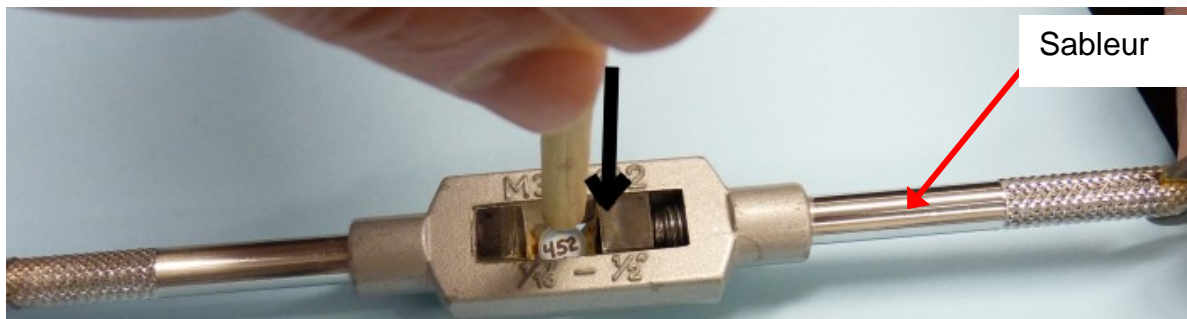
- f. La vitesse de rotation de la scie doit être réglée à la position 6 et la pression sur le bras de la scie doit être de 100g. Utiliser une petite balance à ressort accrochée sur l'enrobage pour vérifier cette pression. Avec l'installation d'un binoculaire au-dessus de la scie Isomet, l'espace pour l'installation des poids est réduit, utiliser un poids de 75g directement au-dessus de la scie et déplacer le contrepoids arrière vers la scie de façon à obtenir une pression de 100g.



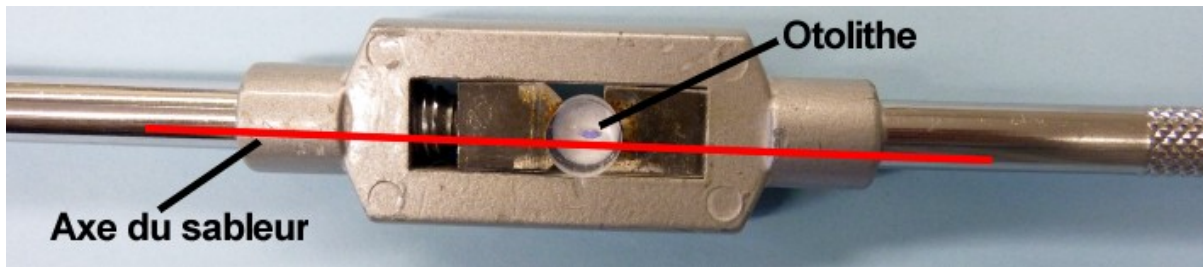
- g.** Ajuster finement l'endroit de la coupe à l'aide du binoculaire installé sur la scie Isomet. Sur le binoculaire, utiliser le grossissement 8X. En observant les deux marques repère près de l'otolithe, positionner la lame sur la ligne de coupe prévue tel que déterminé à l'étape « C ». Pour ce faire, soulever légèrement le bras de façon que l'enrobage ne touche plus à la lame, puis ajuster la vis micrométrique de la scie Isomet de façon que la ligne de coupe soit ajustée sur le bord intérieur de la lame.



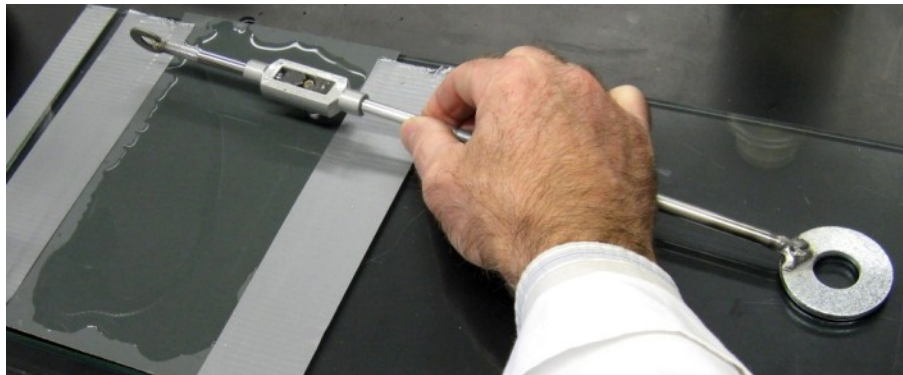
- h.** Une fois la coupe terminée, extraire l'enrobage du support et l'insérer dans le « sableur ». Ajuster l'enrobage sur le sableur de façon à ce que la surface sciée soit bien à plat lorsque l'ensemble est déposé sur une surface plane. Exercer une pression vers le bas sur l'enrobage pendant que l'on serre la vis du sableur.



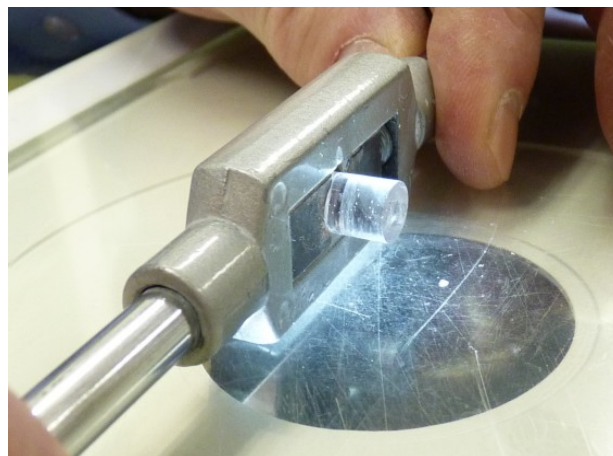
- i. Aligner la partie mince de l'otolithe dans l'axe du sableur.



- j. Poncer sur du papier abrasif 1200 grains légèrement mouillé. Le papier à sabler est maintenu sur une plaque de verre avec du ruban adhésif gris. Commencer par poncer légèrement puis observer la surface de l'otolithe au binoculaire. Si le nucléus n'est pas bien visible, on continue à poncer en alternant ponçage, observation, ponçage jusqu'à ce que le nucléus soit bien visible. Essuyer la surface de l'otolithe avec du papier essuie-tout ou avec l'index et vérifier à nouveau si le nucléus est encore visible.



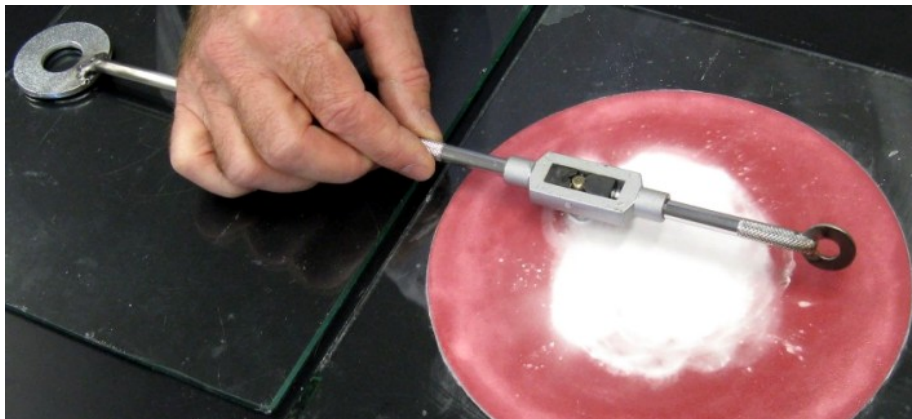
- k. En tournant le sableur de côté, avec l'éclairage diascopique du binoculaire, on peut évaluer où se situe le niveau de ponçage par rapport au nucléus.



- I. L'observation du nucléus sous éclairage épiscopique tel que disposé ci-dessous permet de déterminer finement si le niveau de ponçage passe par le centre du nucléus. Bouger légèrement le bras de lumière placé transversalement pour mieux voir le nucléus.

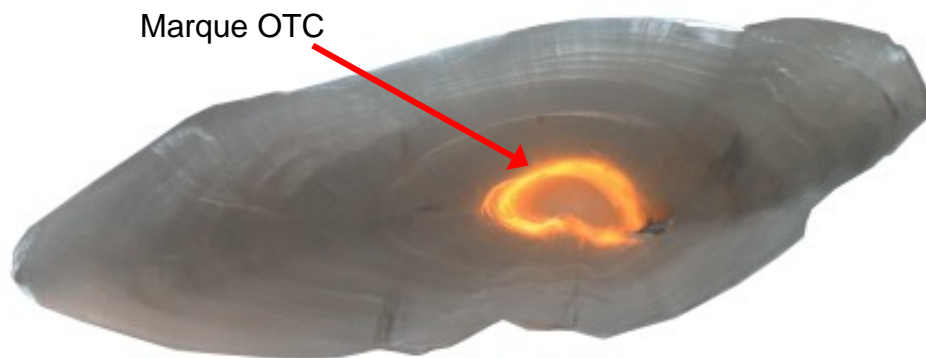


- m. En laissant en place l'enrobage sur le sableur, polir dans un mouvement circulaire sur disque à polir avec de la poudre d'alumine (grain de  $1\ \mu\text{m}$ ) détrempée dans de l'eau déminéralisée. La consistance de la pâte doit être plutôt claire. Sous le binoculaire, vérifier si la surface de la résine est suffisamment polie et ne présente plus de stries de sablage. Une fois le polissage effectué, l'utilisation du papier essuie-tout est à éviter. Rincer à l'eau déminéralisée et vérifier au binoculaire s'il ne reste plus de particules d'alumine. Secouer énergiquement le sableur pour faire disparaître le plus possible d'eau à la surface de l'otolithe.



## 5- Vérification de la présence d'une marque d'oxytétracycline (OTC) sur les otolithes

Vérifier la présence d'une marque d'oxytétracycline (OTC) à l'aide d'un binoculaire équipé d'un système d'éclairage à fluorescence et muni d'un jeu de filtre violet (désignation « V » chez Leica). C'est à cette étape que la marque d'OTC est la plus visible. Les marques d'oxytétracycline n'ont pas toute la même intensité. La décalcification et la coloration réduisent l'intensité de la marque, si l'on attend après ces deux étapes pour vérifier, les otolithes qui ont une faible marque au départ, peuvent facilement passer pour non marqués. Aussi, il est important d'entreposer les otolithes à l'abri de la lumière pour éviter la dégradation des marques. Si l'otolithe porte une marque d'OTC, en tenir compte lors de l'estimation de l'âge. Dans le bassin versant du fleuve Saint-Laurent, les premières civelles marqués à l'OTC ont été ensemencées en 2005.

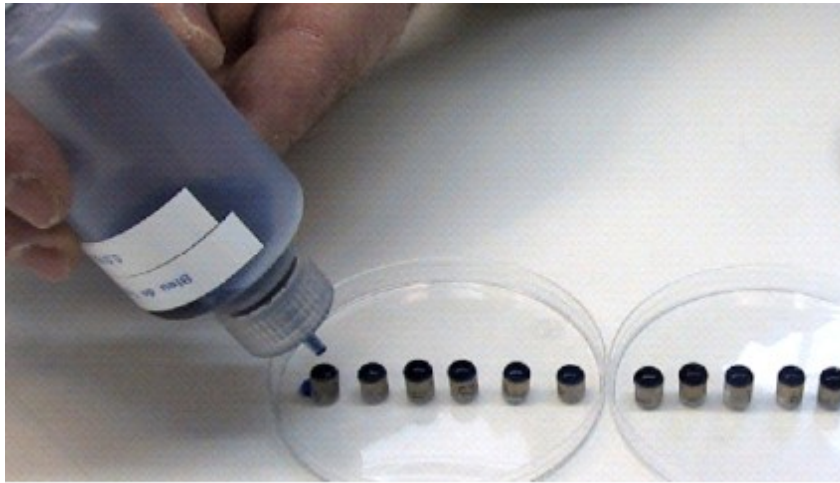


## 6- Décalcification à l'acide EDTA 5%

- a. Avant de procéder à la décalcification, laisser sécher les otolithes une nuit, la partie coupée des otolithes placée vers le haut.
- b. Vérifier s'il reste des dépôts d'alumine à la surface de l'otolithe avant de décalcifier. L'alumine est incompatible avec l'acide utilisé pour la décalcification puisque l'alumine neutralise l'action de l'acide EDTA.
- c. Agiter vigoureusement la bouteille d'acide EDTA avant de l'utiliser. Décalcifier à l'acide EDTA 5% pendant 3 minutes en déposant une grosse goutte directement sur la surface polie des otolithes. Remplacer la solution d'acide EDTA un mois après sa préparation, après ce délai, l'acide perd ses propriétés.
- d. Arrêter l'action de l'acide par immersion des enrobages dans un béccher d'eau déminéralisée, puis rincer individuellement la surface de chacun des otolithes avec un jet d'eau déminéralisé.
- e. Avant d'effectuer la coloration, laisser sécher la surface de l'otolithe à l'air au moins 2 heures, l'action du colorant sera plus efficace si la surface de l'otolithe est bien sèche.

## 7- Coloration au bleu de toluidine 0,01%

- a. Colorer au bleu de toluidine 0,01% durant 3 minutes. Déposer une grosse goutte de solution de colorant sur la surface de l'otolithe.



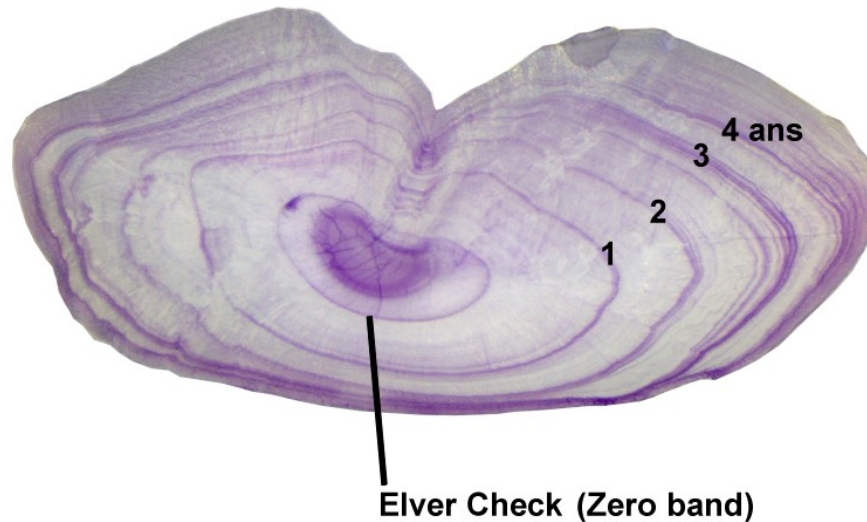
- b. Immerger l'ensemble des enrobages dans un b cher d'eau déminéralisée, puis rincer individuellement la surface des otolithes avec un jet d'eau.

## 8- Photographie des otolithes

- a. On peut procéder immédiatement à la photographie des otolithes tant que la surface des otolithes est encore humide. La présence d'une pellicule d'eau à la surface de l'otolithe améliore le contraste.
- b. Lorsque la surface de l'otolithe commence à sécher, recouvrir d'une goutte de bleu de toluidine 0,01% et attendre environ 15 secondes. Rincer à l'eau déminéralisée et secouer légèrement pour enlever le surplus d'eau. Si l'image est difficile à mettre au point parce que la surface de l'otolithe n'est pas horizontale, corriger en insérant une lame de scalpel sous l'enrobage. On peut aussi réduire légèrement l'ouverture du diaphragme sur le binoculaire pour augmenter la profondeur de champ. Pour la prise des photos, utiliser l'objectif du binoculaire dont le grossissement est le plus élevé même si la profondeur de champ est plutôt faible.
- c. Il arrive que le nucléus ne soit plus visible après la coloration même si on le voyait à l'étape 4K, il est fortement recommandé de prendre une photo quand même, avant de procéder à un léger resablage suivi des étapes ultérieures. Il se peut que cette première photo soit la mieux réussie même après les reprises.
- d. Conserver les enrobages à l'abri de la lumière dans une petite boîte à compartiments. Lorsque le deuxième otolithe est monté, ne classer dans cette boîte que l'otolithe le mieux réussi.
- e. Après un certain temps, si l'on doit faire de nouvelles observations, recolorer systématiquement tous les otolithes 3 minutes. Le contraste des lignes d'arrêt de croissance a tendance à s'estomper à la longue.

## 9- Estimation de l'âge

À partir des images numériques visualisées à l'écran, l'estimation de l'âge est faite par deux ou trois personnes expérimentées. Ne pas compter la première ligne d'arrêt de croissance (Elver Check).



Pour plus de détails sur l'estimation de l'âge, voici deux références à consulter :

ICES. (2011). *Report of the Workshop on Age Reading of European and American Eel (WKAREA2)*, 22-24 March 2011, Bordeaux, France. ICES CM 2011/ACOM:43. 35 pp.

ICES Workshop participants. (2011). *Annex 5 : Manual for the Ageing of Atlantic Eel : Otolith preparation methodologies, age interpretation and image storage*. International Council for Exploration on the Sea, Version 2: April 2011, Copenhagen.

## 10- Liste du matériel

- Binoculaire de qualité avec optique de type planapo ou apochromatique, base avec éclairage diascopique, grossissement d'au moins 60 X, système d'éclairage à fibre optique à bras double. Caméra numérique de qualité d'au moins 5 mégapixels reliée à un ordinateur muni d'un logiciel de capture d'image. Si on doit vérifier les marques d'oxytétracycline, on doit disposer d'un binoculaire équipé d'un éclairage à fluorescence muni d'un jeu de filtre violet (désignation « V » chez Leica). Pour la recherche de marques d'OTC, on doit aussi disposer d'un objectif qui permet d'atteindre un grossissement de 185 X. Le binoculaire Leica MZ16F utilisé au laboratoire de Rivière-du-Loup n'est plus disponible chez Leica. L'équivalent actuel est le modèle M165FC.
- Plaque ronde de couleur noire, diamètre de 120 mm, pour utiliser sur la base du binoculaire
- Scie à basse vitesse Isomet de marque Buehler, modèle N°: 11-1280-170, lame diamantée de 4 pouces N° 11-4244 avec 2 porte-échantillons N° 11-1187
- Binoculaire Leica A60 S, avec statif à bras mobile (ce binoculaire est placé sur la scie Isomet pour améliorer la précision des coupes)
- Sableur de fabrication artisanale pour maintenir les enrobages pendant le sablage
- Disques de polissage en feutre autocollant de 20 cm de diamètre de marque Mecaprex, Société PRESI. (PRESI NT Rose 200mm diamètre, 5/paquet, code 16206)
- Alumine en poudre, grain de 1  $\mu\text{m}$ , (PRESI Alumina powder 1 micron 1kg, code 12018) Fournisseur au Canada pour les produits PRESI : <http://webhome.idirect.com/~ancansco/>
- Résine époxy, MIA-POXY-100, Gallon de 8 livres et durcisseur MIA-HARD-95, Hardener 95, Quart de 2 livres Fournisseur : Freeman Manufacturing and Supply Company, [www.freemansupply.com](http://www.freemansupply.com)
- Bleu de toluidine en poudre, contenant de 25 g. ICN N° 152649, Fischer N° SSP 9770574
- EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) en poudre, contenant de 500g, Fischer N° E478-500
- Balance électronique, précision de 0,1 g
- Plaque chauffante
- Thermomètre électronique avec câble de 1 mètre et sonde indépendante
- 2 chronomètres
- Lampe loupe montée sur un bras articulé
- Pincettes fines à bouts en céramique de la compagnie Canemco (Black Ceramic Tipped Tweezers) N° 200-27 pour la manipulation des otolithes

- Pinces métalliques fines pour la manipulation des enrobages
- Paire de ciseaux délicats à bouts pointus (coupe des gélules), Fischer N° 08-951-5
- Paire de ciseaux à bouts pointus, format moyen (coupe des équerres)
- Pinces longues de laboratoire, longueur 310 mm
- 1 plaque de verre de 9 pouces X 22 pouces
- 6 plaques de verre de 9 pouces X 11 pouces
- Papier abrasif 1200 grains, 3M Wetordry (disponible dans les magasins de pièces d'auto)
- Ruban à transfert d'adhésif, marque Scotch 3M # 465 (largeur ½ pouce)
- Spatules de métal et petits contenants de plastique pour peser les produits chimiques
- 10 petits bouchons pour servir de support aux otolithes
- 20 plats de pétri de 100 mm de diamètre
- 30 petits béchers de 10 ml
- Lames de microscope (celles dont l'extrémité est non dépolie conviennent)
- Cylindres gradués de 25 ml et de 100 ml
- 4 béchers de 500 ml
- Capsules de gélatine vides, diamètre 7 mm, longueur 22 mm. Taille # 00, Code : CT00-1000 (pharmacie Familiprix)
- Boîtes à compartiments de marque « Plano » pour le classement des otolithes montés
- Flacons avec bout fin genre compte-gouttes de 125 ml, Fischer N° 03-006
- Scalpel
- Aiguilles montées d'environ 40 mm
- Compte-gouttes jetables, Fischer N° 6219-0068
- Ruban adhésif gris (Duct tape)
- Bloc de bois dur
- Lunettes de sécurité

- Crayons Staedtler permanent Lumocolor noir « S » (pour écrire sur les lames de verre)
- Crayons Staedtler pigment liner 0,05 mm (pour écrire sur les rondelles servant d'étiquette et les équerres de plastique supportant les otolithes)
- Papier imperméable « Rite in the Rain »
- Poinçonneuse de diamètre correspondant au diamètre intérieur des gélules
- Verres de plastique jetables (la résine époxy peut faire fondre certain type de verre de plastique, faire un test préliminaire. Ceux vendus chez Dollarama conviennent)
- Cuillères de plastique jetables
- Bâtons à café
- Colle Krazy Glue tout usage
- Contenants de plastique récupéré « PETE 1 » pour fabriquer les petites équerres
- Ruban Scotch tape transparent 3M
- Papier essuie-tout brun et papier essuie-tout bleu d'atelier
- Gants jetables en latex ou en nitrile
- Éthanol 95%
- Acétone
- Eau de javel contenant au moins 5 % d'hypochlorite de sodium
- Eau déminéralisée

## **11- Notes sur la préparation des solutions**

Préparation de la solution d'Acide EDTA 5 % : 2,0 g de poudre dans 38 ml d'eau déminéralisée.

Préparation du bleu de toluidine 0,01% :

Étape 1 : mélanger 0,1 g de bleu de toluidine en poudre de marque ICN dans 50 ml d'eau déminéralisée, ce qui donne une solution de 0,2 %.

Étape 2 : Dans une autre bouteille, utiliser une partie de la solution ci-haut dans 19 parties d'eau déminéralisée. Par exemple, mélanger 5 ml de la solution préparée à l'étape 1 dans 95 ml d'eau déminéralisée.