NORME INTERNATIONALE

ISO 20227

Première édition
2017-10

Qualité de l'eau — Détermination des effets d'inhibition sur la croissance de la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza* par les eaux usées, les eaux naturelles et les produits chimiques — Méthode utilisant un bioessai miniaturisé indépendant d'une culture mère

Water quality — Determination of the growth inhibition effects of waste waters, natural waters and chemicals on the duckweed Spirodela polyrhiza *— Method using a stock culture independent microbiotest*

Numéro de référence
ISO 20227:2017(F)

© ISO 2017



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, 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

Avant-propos ... **iv**
Introduction ... **v**
1 Domaine d'application ... **1**
2 Références normatives ... **1**
3 Termes et définitions ... **1**
4 Principe ... **2**
5 Organismes d'essai ... **3**
6 Milieu de culture ... **3**
6.1 Préparation des solutions mères ... 4
6.2 Préparation du milieu de Steinberg modifié à la concentration finale ... 4
7 Appareillage ... **4**
8 Produits chimiques de référence ... **5**
9 Mode opératoire ... **5**
9.1 Germination des turions de ***Spirodela polyrhiza*** ... ***5***
9.2 Essais sur des effluents (et des eaux résiduaires) ... 6
9.2.1 Ajout d'un milieu de culture concentré à l'échantillon d'effluent ... 6
9.2.2 Préparation des dilutions d'effluent ... 6
9.2.3 Mode opératoire ... 7
9.3 Essais sur des composés chimiques ... 7
9.3.1 Essai préliminaire de détermination de l'ordre de grandeur ... 8
9.3.2 Essai définitif ... 8
9.4 Remplissage de la plaque d'essai avec les dilutions de produit toxique ... 9
9.4.1 Généralités ... 9
9.4.2 Mode opératoire ... 9
9.5 Transfert des turions ayant germé dans les puits d'essai ... 10
9.6 Photographie de la plaque multipuits au début de l'essai de toxicité ... 10
9.7 Incubation de la plaque multipuits ... 10
9.8 Photographie de la plaque multipuits à la fin de l'essai de toxicité ... 11
9.9 Mesurage de la surface des premières frondes ... 11
10 Traitement des données — Calcul de l'inhibition de la croissance ... **11**
11 Critère de validité ... **12**
12 Sensibilité de l'essai ... **12**
13 Essai avec les produits chimiques de référence ... **13**
14 Rapport d'essai ... **15**
Annexe A (informative) **Préparation d'une culture mère de *Spirodela polyrhiza* pour la production de turions** ... **16**
Annexe B (informative) **Sensibilité du bioessai miniaturisé avec *Spirodela polyrhiza*** ... **18**
Annexe C (informative) **Données de performance** ... **21**
Bibliographie ... **22**

© ISO 2017 – Tous droits réservés

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).

L'attention est attirée 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).

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 nature volontaire des normes, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes biologiques*.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

Introduction

Les lentilles d'eau sont des plantes aquatiques flottantes qui sont couramment utilisées en recherche écotoxicologique pour évaluer la toxicité des eaux résiduaires, des eaux naturelles et des produits chimiques (voir l'ISO 20079 et les Références [6] à [11]) et, plus particulièrement, des produits phytopharmaceutiques (voir Référence [12]).

Les lentilles d'eau sont des plantes à croissance rapide; un grand nombre d'entre elles ayant une répartition cosmopolite, elles sont donc bien adaptées pour servir de producteurs primaires en vue de l'évaluation des risques liés aux polluants en eau douce.

Contrairement aux végétaux terrestres, pour lesquels les essais biologiques peuvent débuter dès le stade de « repos végétatif » (graines), les essais de toxicité réalisés avec des lentilles d'eau nécessitent une mise en culture continue et la conservation de stocks vivants, avec les coûts biologiques, techniques et financiers intrinsèques.

Toutefois, quelques espèces de lentille d'eau produisent des bourgeons végétatifs dormants (turions) qui peuvent être stockés pendant de longues périodes et que l'on peut faire germer à la demande au moment de la réalisation de l'essai biologique.

L'une des lentilles d'eau produisant des turions est *Spirodela polyrhiza*, et cette espèce a finalement été sélectionnée pour un bioessai miniaturisé simple et pratique indépendant de la préparation de cultures mères et de la conservation de stocks vivants.

Spirodela polyrhiza s'est avérée être aussi sensible aux produits toxiques que lors d'essais biologiques conventionnels avec des lentilles d'eau.

Le mode opératoire du bioessai miniaturisé décrit dans le présent document implique une germination des turions de 3 jours, suivie d'un essai de toxicité de 3 jours sur une plaque multipuits, avec une détermination de l'inhibition de croissance des premières frondes par analyse d'image.

Le bioessai miniaturisé avec *Spirodela polyrhiza* est très simple et facile à réaliser:

a) l'analyse ne nécessite pas la préparation de cultures ni la conservation de stocks vivants des espèces soumises à essai et peut être réalisée «en tout temps et en tout lieu» en utilisant des turions stockés;

b) les turions stockés ont une durée de conservation de plusieurs mois avec un taux de germination élevé;

c) le bioessai miniaturisé nécessite un espace minimal de travail et d'incubation et un équipement minimal;

d) les mesurages de surface des premières frondes n'ont pas à être effectués immédiatement et peuvent être reportés à un moment approprié;

e) les mesurages de surface par analyse d'image sont très rapides et précis, et prennent moins de 1 h pour un essai complet.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

Qualité de l'eau — Détermination des effets d'inhibition sur la croissance de la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza* par les eaux usées, les eaux naturelles et les produits chimiques — Méthode utilisant un bioessai miniaturisé indépendant d'une culture mère

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur du présent document connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur du présent document d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est essentiel que les essais réalisés conformément au présent document soient exécutés par du personnel formé.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode permettant de déterminer l'inhibition de la croissance des premières frondes de *Spirodela polyrhiza* ayant germé à partir de turions, provoquée par des substances et des préparations contenues dans les eaux ou les eaux résiduaires, y compris les eaux résiduaires urbaines après traitement et les effluents industriels.

L'essai s'applique également aux produits chimiques purs et, en particulier, aux produits phytopharmaceutiques et aux pesticides.

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*

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
concentration efficace
EC_x
concentration de l'échantillon pour essai à laquelle un effet de x % est mesuré, par rapport au témoin

© ISO 2017 – Tous droits réservés

3.2
fronde
structure semblable à une feuille qui se développe à partir d'un turion ayant germé

3.3
croissance
augmentation de la biomasse au fil du temps résultant de la production de nouveaux tissus

Note 1 à l'article: Dans le présent essai, elle désigne l'augmentation de taille de la première fronde se développant à partir d'un turion ayant germé.

3.4
milieu de culture
combinaison d'eau de dilution et/ou de milieu nutritif utilisée lors de l'essai

Note 1 à l'article: Dans le présent essai, il désigne le milieu nutritif utilisé pour la germination des turions et la croissance des frondes.

3.5
inoculum
transfert d'un turion ayant germé, avec sa petite fronde, dans tous les puits d'essai au début de l'essai de toxicité

3.6
eau pure
eau déionisée ou distillée dont la conductivité est inférieure à 10 µS/cm

[SOURCE: ISO 19827:2016, 3.4]

3.7
racine
partie de la plante *Spirodela polyrhiza* qui présente une structure radiculaire et se développe sous une fronde

3.8
culture mère
culture monospécifique de lentille d'eau en vue de produire les turions

3.9
milieu d'essai
combinaison d'échantillon pour essai, d'eau de dilution et/ou de milieu nutritif utilisée lors de l'essai

[SOURCE: ISO 20079:2005, 3.23]

3.10
échantillon pour essai
portion discrète d'un échantillon (par exemple, eau prélevée à partir du milieu récepteur, eaux résiduaires, substances chimiques ou mélanges dissous, produits et composés) prétraitée selon les besoins du présent essai (par exemple dissolution, filtration, neutralisation)

3.11
turion
petit bourgeon végétatif qui se développe à partir d'une colonie de la lentille d'eau dans des conditions environnementales spécifiques

4 Principe

Les turions produits par mise en culture de *Spirodela polyrhiza*, ou prélevés dans les tubes à essai dans lesquels ils sont stockés (voir Annexe A), sont transférés dans une boîte de Petri contenant un milieu de culture, et mis à incuber pendant 3 jours à 25 °C avec un éclairage continu d'au moins 6 000 lx (correspondant approximativement à 85 µE m^{-2} s^{-1}).

© ISO 2017 – Tous droits réservés