



**Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la
croissance des algues d'eau douce avec
Scenedesmus subspicatus et *Selenastrum
capricornutum***

iTeh STANDARD PREVIEW

*Water quality — Fresh water algal growth inhibition test with Scenedesmus
subspicatus and Selenastrum capricornutum*

ISO 8692:1989

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d35aba9a-d01d-4e2c-b502-
ee7334adb47/iso-8692-1989](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d35aba9a-d01d-4e2c-b502-ee7334adb47/iso-8692-1989)



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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 8692 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d35aba9a-d01d-4e2c-b502-ee7334adb417/iso-8692-1989>

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1989

Droits de reproduction réservés. 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour la détermination des effets toxiques de substances chimiques sur la croissance d'algues planctoniques d'eau douce.

L'essai peut être effectué avec des substances facilement solubles dans l'eau qui ne sont pas significativement dégradées ou éliminées au cours de l'essai.

2 Principe

Plusieurs générations de cellules algales appartenant à la même espèce sont cultivées dans un milieu défini contenant une série de concentrations de la substance à expérimenter préparée en mélangeant des quantités appropriées de concentrés nutritifs, d'eau, de solutions mères de la substance à expérimenter, et un inoculum de cellules algales en phase exponentielle de croissance. Les solutions d'essai sont incubées pendant une période minimale de 72 h, pendant laquelle la concentration cellulaire de chacune d'entre elles est mesurée au moins toutes les 24 h.

L'inhibition est mesurée comme étant la diminution de la croissance ou du taux de croissance par rapport aux cultures témoins réalisées dans des conditions identiques.

3 Définitions et abréviations

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions et abréviations suivantes s'appliquent.

3.1 concentration cellulaire : Nombre de cellules par unité de volume.

3.2 croissance : Augmentation de la concentration cellulaire.

3.3 taux de croissance : Expression du taux d'augmentation de la concentration cellulaire dans le temps comme indiqué en 8.2.2.

3.4 solution d'essai : Mélange d'eau, de substances nutritives et de substance à expérimenter, dans lequel les cellules algales sont incubées.

3.5 solution témoin : Mélange d'eau, de substances nutritives et de cellules algales sans substance à expérimenter.

3.6 concentration moyenne réelle (CE₅₀) : Concentration en substance à expérimenter qui cause une diminution de 50 % de la croissance ou du taux de croissance par rapport aux solutions témoins.

3.7 concentration sans effet observée (CSEO) : Concentration de la substance à expérimenter la plus élevée pour laquelle il n'y a statistiquement aucune diminution significative de la croissance ou du taux de croissance par rapport aux solutions témoins.

4 Réactifs

4.1 Organismes d'essai

Utiliser comme algue planctonique d'eau douce, soit

a) *Scenedesmus subspicatus* Chodat (86.81 SAG)

soit

b) *Selenastrum capricornutum* Printz (ATCC 22662 ou CCAP 278/4).¹⁾

NOTE — Ces deux espèces sont des algues vertes planctoniques appartenant à l'ordre des *Chlorococcales* (*Chlorophytes*, *Chlorophycées*), qui sont généralement cultivées à l'état unicellulaire.

On peut se procurer les souches recommandées sous forme de cultures monospécifiques et non axéniques auprès de :

86.81 SAG : Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
University of Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-3400 Göttingen
République Fédérale d'Allemagne

1) Cette espèce est maintenant systématiquement dénommée *Raphidocelis subcapitata* nov. comb. [1].

ATCC 22662 : American Type Culture Collection
12301 Parklane Drive
Rockville, Maryland 20852, USA

CCAP 278/4 : Culture Centre of Algae and Protozoa
Freshwater Biological Association
The Ferry House
Ambleside
Cumbria LA22 0LP, UK
Algothèque du laboratoire de Cryptogamie
Muséum d'histoire naturelle
12, rue Buffon
F-75005 Paris, France

4.2 Eau

L'eau utilisée pour la préparation du milieu nutritif et les solutions de substance à expérimenter doit être désionisée ou d'une qualité équivalente. Veiller à éviter toute contamination de l'eau par des substances inorganiques ou organiques pendant la préparation et le stockage. Aucun matériel en cuivre ne doit être utilisé.

4.3 Substances nutritives

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

NOTE — Ces solutions seront éventuellement diluées (voir 6.1 et 6.4) pour obtenir les concentrations finales en substances nutritives des solutions d'essai.

Tableau 1

Substances nutritives	Concentration de la solution mère	Concentration finale de la solution d'essai
Solution mère 1 : macrosubstances nutritives		
NH ₄ Cl	1,5 g.l ⁻¹	15 mg.l ⁻¹
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g.l ⁻¹	12 mg.l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g.l ⁻¹	18 mg.l ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g.l ⁻¹	15 mg.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,16 g.l ⁻¹	1,6 mg.l ⁻¹
Solution mère 2 : Fe-EDTA		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	80 mg.l ⁻¹	80 µg.l ⁻¹
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg.l ⁻¹	100 µg.l ⁻¹
Solution mère 3 : éléments traces		
H ₃ BO ₃	185 mg.l ⁻¹	185 µg.l ⁻¹
MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg.l ⁻¹	415 µg.l ⁻¹
ZnCl ₂	3 mg.l ⁻¹	3 µg.l ⁻¹
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg.l ⁻¹	1,5 µg.l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg.l ⁻¹	0,01 µg.l ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg.l ⁻¹	7 µg.l ⁻¹
Solution mère 4 : NaHCO₃		
NaHCO ₃	50 g.l ⁻¹	50 mg.l ⁻¹

Tous les réactifs utilisés doivent être de qualité analytique.

Stériliser les solutions mères par filtration sur membrane (diamètre moyen des pores 0,2 µm) ou en autoclave (120 °C, 15 min). Conserver les solutions à l'obscurité à 4 °C.

La solution mère 4 (NaHCO₃) ne doit pas être stérilisée en autoclave, mais uniquement par filtration sur membrane.

5 Appareillage

Tout le matériel en contact avec le milieu d'essai doit être en verre ou en matière chimiquement inerte.

Appareillage courant de laboratoire, et

5.1 Armoire ou pièce à température contrôlée, pourvue d'une lampe fluorescente blanche assurant un éclairage continu convenant pour satisfaire aux exigences sur les conditions d'éclairage telles que spécifiées en 6.6.

5.2 Appareil, permettant de mesurer la concentration cellulaire algale, de préférence un compte-particules ou un microscope à chambre de comptage. L'état de la croissance des cultures d'algues peut également être déterminé par une méthode indirecte avec un spectromètre, un turbidimètre ou un fluorimètre de sensibilité suffisante, et s'il est établi une corrélation acceptable avec la concentration cellulaire. L'appareil utilisé doit pouvoir permettre de mesurer avec précision des concentrations cellulaires aussi faibles que 10⁴ cellules par millilitre.

5.3 Flacons de culture, par exemple fioles coniques de 250 ml avec bouchons perméables à l'air.

5.4 Appareillage, pour filtration sur membrane, utilisant des filtres de diamètre moyen de pore 0,2 µm.

5.5 Autoclave.

5.6 pH-mètre.

6 Mode opératoire

6.1 Préparation des concentrés nutritifs

Préparer le concentré nutritif comme suit (pour 1 000 ml) :

Ajouter à 100 ml de solution mère 1 (4.3) :

- 10 ml de solution mère 2 (4.3)
- 10 ml de solution mère 3 (4.3)
- 10 ml de solution mère 4 (4.3).

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

Préparer le concentré nutritif juste avant chaque essai. Avant l'utilisation, ce concentré doit atteindre l'état d'équilibre en restant à l'air pendant une nuit ou par un barbotage d'air filtré de 30 min. Après obtention de l'état d'équilibre, ajuster le pH à 8,3 ± 0,2, si nécessaire en utilisant des solutions diluées d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium (1 mol/l).

6.2 Préparation de l'inoculum

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

Mélanger un volume de concentré nutritif (6.1) avec huit volumes d'eau. Ajouter suffisamment de cellules provenant de la culture algale mère, afin qu'après avoir complété à dix volumes avec de l'eau, la concentration cellulaire soit de l'ordre de 10⁴ cellules par millilitre.

Maintenir la pré-culture dans les mêmes conditions que celles de l'essai (voir 6.6) pendant 3 jours, après lesquels elle devrait être en phase exponentielle de croissance et la concentration cellulaire devrait être suffisante pour que la pré-culture soit utilisée comme inoculum.

Mesurer la concentration cellulaire de la pré-culture immédiatement avant l'essai (voir 6.7) afin de calculer le volume d'inoculum nécessaire.

6.3 Choix des concentrations à expérimenter

Les concentrations de la substance à expérimenter doivent normalement suivre une progression géométrique, par exemple, 10; 3,2; 1,0; 0,32; . . . ; 0,01 mg.l⁻¹.

Si possible, les concentrations doivent être choisies pour permettre l'obtention de plusieurs (4 à 5) effets permettant une inhibition de la croissance comprise entre 10 % et 90 %.

NOTE — La gamme de concentrations acceptables est déterminée en réalisant un essai préliminaire de «recherche de la gamme» couvrant plusieurs ordres de grandeur de différence entre les concentrations d'essai. La répétition de chaque concentration d'essai n'est pas nécessaire lors de l'essai préliminaire.

6.4 Préparation des solutions mères de substance à expérimenter

Préparer une solution mère de la substance à expérimenter dans de l'eau dans laquelle la concentration en substance à expérimenter est au moins égale à deux fois la concentration d'essai la plus élevée. Diluer cette solution mère pour obtenir une série de solutions mères correspondant à la gamme de concentrations d'essai.

Normalement, l'essai est effectué sans ajustement du pH. Cependant, certaines substances peuvent avoir un effet toxique dû à une acidité ou à une alcalinité trop forte. Afin de déterminer la toxicité d'une substance autre que celle due au pH, ajuster le pH de la première solution mère (avant la dilution en série) à 7,0 en utilisant des solutions diluées d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium (1 mol/l).

NOTE — L'ajustement du pH ne doit provoquer aucune réaction chimique avec la substance à expérimenter (précipitation, complexation, par exemple) et ne devrait pas entraîner de modification significative de la concentration de la solution de la substance à expérimenter.

6.5 Préparation des solutions d'essai

Préparer les solutions d'essai en mélangeant les volumes appropriés des solutions mères de la substance à expérimenter, d'eau, de concentré nutritif (6.1) et d'inoculum (6.2) dans les récipients d'essai.

Le volume total doit être le même dans tous les récipients.

La quantité de concentré nutritif (6.1) ajoutée à chaque récipient doit être égale à un dixième du volume total.

La quantité d'inoculum (6.2) ajoutée à chaque récipient doit être suffisante pour que la concentration cellulaire initiale dans les solutions d'essai soit 10⁴ cellules par millilitre.

Dans certains récipients, n'ajouter que l'eau, le concentré nutritif et l'inoculum, sans substance à expérimenter. Ces récipients servent de récipients témoins.

Préparer trois récipients par concentration de substance à expérimenter, et six récipients témoins.

Mesurer le pH d'un échantillon des solutions d'essai à chaque concentration et témoin.

6.6 Incubation

Laisser incuber les récipients d'essai bouchés à 23 °C ± 2 °C sous lumière blanche continue. L'intensité lumineuse au niveau moyen des solutions d'essai doit être dans l'intervalle de 60 µE/m²/s à 120 µE/m²/s (35 × 10¹⁸ photons/m²/s à 70 × 10¹⁸ photons/m²/s) quand elle est mesurée dans le domaine de longueur d'onde de 400 nm à 700 nm à l'aide d'un récepteur approprié.

NOTE — 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 incidente et réfléchi sous tous les angles au-dessous et au-dessus 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 et donnent des résultats plus élevés pour une source lumineuse non ponctuelle du type de celle décrite ci-dessous.

L'intensité spécifiée ci-dessus peut être obtenue à l'aide de lampes fluorescentes de 4 W à 7,30 W du type lumière blanche universelle (naturelle) [par exemple, un étalon de couleur 2 spécifié (d'une température de couleur de 4300 K) selon la CEI 81] à une distance d'environ 0,35 m des milieux de culture algales.

Pour les instruments de mesure de la lumière étalonnés en lux, un intervalle équivalent de 6 000 lux à 10 000 lux est acceptable pour l'essai.

Maintenir les cellules d'algues en suspension en les secouant, en les agitant ou en les aérant par barbotage afin d'améliorer les échanges gazeux et de réduire la variation du pH dans les solutions d'essai.

6.7 Mesurages

Mesurer la concentration cellulaire dans chaque récipient (y compris les récipients témoins) au moins toutes les 24 h. Ces mesures doivent être effectuées sur de faibles volumes (5 ml par exemple), prélevés à l'aide d'une pipette sur chaque solution d'essai, et non réintroduits dans les récipients.

L'essai doit durer pendant une période minimale de 72 h.

Mesurer le pH d'un échantillon des solutions d'essai à chaque concentration (et du témoin) à la fin de l'essai.

7 Critères de validité

Considérer l'essai comme invalide si les conditions suivantes ne sont pas remplies :

- la concentration cellulaire des solutions témoins doit avoir été multipliée par un facteur supérieur à 16 en 72 h. Cette augmentation correspond à un taux de croissance (8.2) de 0,9 par jour. Dans des conditions normales d'expérimentation, des taux de croissance de 1,5 à 1,9 par jour peuvent être obtenus;
- le pH des solutions témoins ne doit pas avoir varié de plus de 1,5 unités pendant l'essai.

NOTE — Des variations du pH pendant l'essai peuvent influencer significativement sur des résultats et, en conséquence, une limite de 1,5 unités est fixée. Cependant, les variations du pH devraient toujours être aussi faibles que possible, par exemple en maintenant une agitation continue pendant l'essai.

8 Expression des résultats

8.1 Courbes de croissance

Présenter les mesures des concentrations cellulaires et des autres paramètres en corrélation avec les concentrations cellulaires, sous forme de tableau en fonction de la concentration de la substance à expérimenter et en fonction du temps.

Tracer une courbe de la croissance pour chacune des concentrations d'essai et des solutions témoins en portant le logarithme de la concentration cellulaire moyenne par rapport au temps.

8.2 Calcul du pourcentage d'inhibition

L'évaluation de l'inhibition de la croissance au cours de l'essai est basée sur l'un des deux paramètres suivants.

8.2.1 Aire située sous la courbe de croissance (biomasse intégrale)

Calculer l'aire, A , située sous la double courbe de croissance linéaire, pour chaque culture d'essai, au moyen de l'équation

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} (t_n - t_{n-1})$$

où

t_1 est le temps écoulé entre le début de l'essai et le premier mesurage;

t_n est le temps écoulé entre le début de l'essai et le n ème mesurage;

N_0 est la concentration cellulaire nominale initiale;

N_1 est la concentration cellulaire mesurée au temps t_1 ;

N_n est la concentration cellulaire mesurée au temps t_n .

Calculer les valeurs moyennes de A pour chaque concentration d'essai et chaque solution témoin. A partir de ces valeurs, calculer le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration d'essai, au moyen de l'équation

$$I_{Ai} = \frac{A_c - A_i}{A_c} \times 100$$

où

I_{Ai} est le pourcentage d'inhibition (aire) pour la concentration d'essai i ;

A_i est l'aire moyenne pour la concentration d'essai i ;

A_c est l'aire moyenne pour la culture témoin.

8.2.2 Taux de croissance

Calculer le taux de croissance, μ , pour chaque culture d'essai, au moyen de l'équation

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_0}{t_n}$$

où

t_n est le temps écoulé entre le début de l'essai et le dernier mesurage;

N_0 est la concentration cellulaire nominale initiale;

N_n est la concentration cellulaire finale mesurée.

Il est également possible de déterminer le taux de croissance à partir de la pente de la droite de régression obtenue en portant le logarithme de la concentration cellulaire en fonction du temps.

Calculer les valeurs moyennes de μ pour chaque concentration d'essai et les solutions témoins. A partir de ces valeurs, calculer le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration d'essai, au moyen de l'équation

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

où

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

μ_i est le taux de croissance moyen pour la concentration d'essai i ;

μ_c est le taux de croissance moyen des cultures témoins.

8.3 Détermination de la CE₅₀

Présenter les valeurs de I_{Ai} ou $I_{\mu i}$ sous forme de tableau en fonction des concentrations d'essai correspondantes et porter

ces valeurs sur un papier semi-logarithmique ou logarithmique-probit (concentrations d'essai sur l'échelle logarithmique). Tracer une droite approximative et lire sur le graphique la CE_{50} (concentration d'essai correspondant à une inhibition de 50 %).

Il est également possible de calculer la valeur de la CE_{50} par une méthode de régression, par exemple la méthode de probits.

8.4 Détermination du CSEO

Le CSEO est la concentration la plus élevée pour laquelle aucune inhibition significative de croissance n'est observée par rapport aux cultures témoins. Déterminer cette valeur par une méthode statistique appropriée (par exemple, analyse de la variance et test de Dunnett) en utilisant chaque valeur répétée de A ou de μ .

9 Présentation des résultats

Noter les valeurs de CE_{50} se rapportant à l'aire de la courbe de croissance (biomasse), CE_{b50} et celles se rapportant au taux de croissance CE_{t50} . Noter les valeurs de CSEO, respectivement, $CSEO_b$ pour les valeurs se rapportant à l'aire de la courbe de croissance, ou $CSEO_t$ pour les valeurs se rapportant au taux de croissance. Indiquer également clairement la durée de l'essai, par exemple CE_{b50} (0 à 72 h). Indiquer les valeurs de CE_{50} et CSEO à deux chiffres significatifs près, normalement en milligrammes par litre.

10 Interprétation des résultats

Les valeurs de CSEO et CE_{50} 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.

En interprétant les valeurs de CE_{50} et CSEO, il convient de tenir compte de la forme des courbes de croissance. Certaines caractéristiques de ces courbes (par exemple, départ tardif de la croissance; bonne croissance initiale, mais non soutenue par la suite) peuvent aider l'interprétation du mode d'action de la substance toxique.

11 Reproductibilité

Un essai interlaboratoire effectué par 16 laboratoires, basé sur l'essai décrit dans la présente Norme internationale a donné les résultats indiqués dans le tableau 2, pour le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$).

Tableau 2

Limite	Moyenne	Étendue	Écart-type
	(mg.l ⁻¹)		
CE_{b50} (0 à 72 h)	0,84	0,60 à 1,03	0,13
CE_{t0} (0 à 72 h)	0,53	0,20 à 0,75	0,20

12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit faire référence à la présente Norme internationale et doit comporter en particulier les informations suivantes :

- a) Substance à expérimenter : données d'identification chimique.
- b) Organismes d'essai : espèce, origine, numéro de référence de la souche, méthode de culture.
- c) Précisions relatives à l'essai :
 - date de début et durée;
 - concentrations expérimentées;
 - composition du milieu;
 - appareillage de culture et méthode d'incubation;
 - intensité et qualité de la lumière;
 - température;
 - pH des solutions d'essai au début et à la fin de l'essai;
 - méthode utilisée pour mesurer la concentration cellulaire.
- d) Résultats :
 - concentration cellulaire dans chaque récipient à chaque période de mesurage;
 - concentration cellulaire moyenne pour chaque concentration d'essai (et chaque solution témoin) à chaque période de mesurage;
 - courbes de croissance (logarithme de la concentration cellulaire en fonction du temps);
 - relation concentration/effet (pourcentage d'inhibition de la concentration en fonction de la concentration) sous forme de tableau ou de représentation graphique, par exemple droite des probits obtenue en portant le pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration;
 - valeurs de CE_{50} et méthode de détermination;
 - valeurs de CSEO et méthode de détermination;
 - autres effets observés.
- e) Autres faits méritant d'être précisés en ce qui concerne le mode opératoire suivi.

Annexe A (informative)

Bibliographie

- [1] NYGAARD Gunnar, KOMÁREK Jiří, KRISTIANSEN Jørgen et SKULBERG Olav M., Taxonomic designations of the bioassay, alga NIVA-CHL I («Selenastrum Capricornutum») and some related strains; *Opera Botanica* n° 90, (1986).
- [2] CEI 81, *Lampes tubulaires à fluorescence pour l'éclairage général.*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d35aba9a-d01d-4e2c-b502-ee7334adb47/iso-8692-1989>

CDU 556.114 : 582.26

Descripteurs : eau, qualité, essai, détermination, toxicité, algue.

Prix basé sur 6 pages
