
**Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la
croissance des algues d'eau douce avec
des algues vertes unicellulaires**

*Water quality — Freshwater algal growth inhibition test with unicellular
green algae*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 8692:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-
831e90a3963a/iso-8692-2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 8692:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004>

© ISO 2004

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	3
6 Appareillage	5
7 Mode opératoire	6
8 Critères de validité	8
9 Calculs	8
10 Expression des résultats	10
11 Interprétation des résultats	10
12 Fidélité	10
13 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Détection rapide de l'inhibition de la croissance algale par les eaux résiduares	12
Bibliographie	15

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée 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.

L'ISO 8692 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 8692:1989), qui a fait l'objet d'une révision technique.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004>

Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires

AVERTISSEMENT — Il est recommandé que les personnes utilisant la présente Norme internationale connaissent bien les techniques de laboratoires. La présente Norme internationale ne prétend pas traiter tous les éventuels problèmes de sécurité liés à son utilisation. La mise en œuvre de règles de sécurité et de protection de la santé ainsi que le respect de la législation nationale relèvent de la responsabilité de l'utilisateur.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination de l'inhibition de la croissance des algues vertes unicellulaires par des substances et des mélanges contenus dans l'eau ou par des eaux résiduaires. Cette méthode peut être utilisée avec des substances aisément solubles dans l'eau.

En apportant à cette méthode les modifications décrites dans l'ISO 14442 et l'ISO 5667-16, il est possible de vérifier les effets inhibiteurs des substances inorganiques et organiques faiblement solubles, des composés volatils, des métaux lourds et des eaux résiduaires.

L'Annexe A décrit un essai rapide de détection de l'inhibition de la croissance des algues par des eaux résiduaires.

[ISO 8692:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004>

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application 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 5667-16:1998, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*

ISO 14442:1999, *Qualité de l'eau — Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec matières peu solubles, composés volatils, métaux et eaux résiduaires*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

concentration cellulaire

x

nombre de cellules par unités de volume de milieu

NOTE La densité cellulaire est exprimée en cellules par millilitre.

3.2
taux de croissance spécifique

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

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

ou

x est la concentration cellulaire, exprimée en cellules par millilitre;

t est le temps, exprimé en jours

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

3.3
milieu de croissance

mélange d'eau et de substances nutritives, utilisé pour les pré-cultures et les solutions témoins, dans lequel les cellules algales sont incubées

3.4
échantillon pour essai

échantillon aqueux (par exemple eaux résiduaires), substance chimique ou mélange pour lequel sont déterminés les effets d'inhibition de la croissance des algues

3.5
milieu d'essai

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

3.6
lot d'essai

mélange d'eau, de substances nutritives et d'échantillon pour essai (milieu d'essai, 3.5), inoculé avec des algues

3.7
solution témoin

mélange d'eau, de substances nutritives (milieu de croissance, 3.3), sans échantillon pour essai, inoculé avec des algues

3.8
concentration efficace

CE_{rx}
concentration de l'échantillon pour essai qui entraîne une diminution de x % du taux de croissance spécifique par rapport aux solutions témoins

NOTE Pour désigner sans ambiguïté une valeur de la concentration efficace (CE) dérivant du taux de croissance, il est proposé d'utiliser le symbole CE_r .

4 Principe

Des souches d'algues monospécifiques sont mises en culture pendant plusieurs générations dans un milieu défini, contenant une gamme de concentrations de l'échantillon pour essai préparé en mélangeant des quantités appropriées de milieu de croissance, d'échantillon pour essai et un inoculum de cellules algales en phase exponentielle de croissance. Les lots d'essai sont incubées pendant une période de (72 ± 2) h, pendant laquelle la concentration cellulaire de chacune solution d'essai est mesurée au moins toutes les 24 h.

L'inhibition est quantifiée par la diminution du taux de croissance, par comparaison à des cultures témoins réalisées dans des conditions identiques.

5 Réactifs

5.1 Organisme d'essai: utiliser l'une des deux espèces suivantes d'algue planctonique d'eau douce:

- a) *Desmodesmus subspicatus*¹⁾ (86.81 SAG).
- b) *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak²⁾ (ATCC 22662, CCAP 278/4 ou 61.81 SAG).

NOTE 1 Ces deux espèces algales sont des algues vertes planctoniques appartenant à l'ordre des *Chlorococcales* (*Chlorophytes*, *Chlorophycées*), qui se trouvent généralement à l'état unicellulaire en culture.

On peut se procurer les souches recommandées sous forme de cultures monospécifiques et non axéniques auprès de ³⁾:

- SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
Université de Göttingen
Nikolausberger Weg 18
D-37073 Göttingen
Allemagne
- ATCC: American Type Culture Collection
12301 Parklane Drive [ISO 8692:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-851e90a3963a/iso-8692-2004)
Rockville, Maryland 20852
États-Unis
- CCAP: Culture Centre of Algae and Protozoa
Freshwater Biological Association
The Ferry House
Ambleside
Cumbria LA22 0LP
Royaume-Uni
Algothèque du laboratoire de cryptogamie
Muséum National d'Histoire Naturelle
12, rue Buffon
75005 Paris
France

1) Cette espèce était antérieurement connue sous la dénomination de *Scenedesmus subspicatus* Chodat.

2) Cette espèce était antérieurement connue sous la dénomination de *Selenastrum capricornutum* Prinz. La nouvelle dénomination est couramment citée par les collections de souches.

3) Les souches désignées par ces appellations commerciales sont des exemples de souches disponibles dans le commerce. Cette information est donnée pour aider les utilisateurs de la présente Norme internationale; cela ne signifie pas que l'ISO recommande l'utilisation de ces produits.

NOTE 2 Il est possible de conserver les cultures mères dans le milieu décrit en 5.3 et 7.1. Cependant, des repiquages fréquents sont nécessaires (une fois par semaine) pour empêcher toute perturbation de la croissance. La culture mère peut se conserver plus longtemps sur des milieux pour algues plus riches, tels que ceux recommandés par la collection de souches.

D'autres algues peuvent être conservées pendant plusieurs mois dans des grains d'alginate⁴⁾ sans perte de viabilité^[1]. Les algues peuvent être facilement retirées des grains d'alginate pour réaliser les essais de toxicité.

5.2 Eau, déionisée ou d'une pureté équivalente (conductivité < 10 µS/cm), pour la préparation du milieu de croissance et des solutions de substance à expérimenter.

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

5.3 Substances nutritives.

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

Ces solutions seront éventuellement diluées (voir 7.1 et 7.4) pour obtenir les concentrations finales en substances nutritives dans les solutions d'essai. Toutefois, les macro-nutriments peuvent, à l'inverse, être ajoutés directement dans l'eau.

Tous les produits chimiques utilisés doivent être des réactifs de qualité analytique.

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

La solution mère 4 ne doit pas être stérilisée en autoclave pour éviter toute perte par évaporation de NaHCO₃, mais uniquement par filtration sur membrane.

ISO 8692:2004
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004>

4) Les grains d'alginate fournis par MICROBIOTESTS Inc., Venecoweg 19, 9810 Nazareth, Belgique, tél. (32) 9 380 8545, fax (32) 9 380 8546, mél microbiotests@skynet.be, sont un exemple de produit disponible dans le commerce. Cette information est donnée pour aider les utilisateurs de la présente Norme internationale; cela ne signifie pas que l'ISO recommande l'utilisation de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'ils donnent des résultats équivalents.

Tableau 1 — Concentrations massiques de substances nutritives dans la solution d'essai

Solution mère	Substance nutritive	Concentration massique de la solution mère	Concentration massique finale dans la solution d'essai
Solution mère 1: macro-nutriments	NH ₄ Cl	1,5 g/l	15 mg/l
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 g/l	12 mg/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,8 g/l	18 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/l	15 mg/l
	KH ₂ PO ₄	0,16 g/l	1,6 mg/l
Solution mère 2: Fe-EDTA	FeCl ₃ ·6H ₂ O	64 mg/l	64 µg/l
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	100 mg/l	100 µg/l
Solution mère 3: éléments traces	H ₃ BO ₃ ^a	185 mg/l	185 µg/l
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	415 mg/l	415 µg/l
	ZnCl ₂	3 mg/l	3 µg/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,5 mg/l	1,5 µg/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,01 mg/l	0,01 µg/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	7 mg/l	7 µg/l
Solution mère 4: NaHCO ₃	NaHCO ₃	50 g/l	50 mg/l

a H₃BO₃ peut être dissous en ajoutant 0,1 N NaOH.

(standards.iteh.ai)

6 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 le matériel suivant.

6.1 Armoire ou pièce à température contrôlée, pourvue d'une lampe fluorescente blanche, fournissant un éclairage uniforme et continu, répondant aux exigences d'éclairage spécifiées pour l'essai en 7.6.

6.2 Appareil de mesure de la concentration cellulaire algale, de préférence un compte-particules ou un microscope à chambre de comptage. Les concentrations algales peuvent également être déterminées par une méthode indirecte avec, par exemple, un fluorimètre (par exemple fluorescence in vitro^[2] ou fluorescence in vivo induite par le DCMU⁵⁾ [3]) de sensibilité suffisante, et s'il est établi une corrélation acceptable avec la concentration cellulaire. L'appareil utilisé doit pouvoir permettre de mesurer des concentrations cellulaires aussi faibles que 10⁴ cellules/ml et de distinguer la croissance algale des effets perturbateurs, par exemple la présence de matières particulaires et la couleur de l'échantillon. Des spectromètres peuvent être assez sensibles pour mesurer 10⁴ cellules/ml à condition que puisse être utilisée une longueur de passage suffisante (jusqu'à 10 cm). Cependant, cette technique est particulièrement sensible aux interférences venant de matériaux en suspension et de substances colorées à faibles densités de cellules.

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

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

6.5 Autoclave.

6.6 pH-mètre.

5) DCMU = dichlorophényldiméthyle urée (No CAS 330-54-1).

7 Mode opératoire

7.1 Préparation du milieu de croissance

Préparer un milieu de croissance en ajoutant un volume approprié de solutions mères de substances nutritives (5.3) à de l'eau.

Ajouter à environ 500 ml d'eau:

- 10 ml de solution mère 1 (5.3);
- 1 ml de solution mère 2 (5.3);
- 1 ml de solution mère 3 (5.3);
- 1 ml de solution mère 4 (5.3).

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau.

En cas de passage nécessaire à l'autoclave, il convient d'ajouter la solution mère 4 après cette étape.

Avant l'utilisation, équilibrer en laissant à l'air pendant une nuit ou par un bullage avec de l'air filtré pendant 30 min. Après obtention de l'état d'équilibre, ajuster le pH à $8,1 \pm 0,2$, si nécessaire, en utilisant des solutions d'acide chlorhydrique (1 mol/l) ou d'hydroxyde de sodium (1 mol/l).

Le milieu de croissance est tamponné par du bicarbonate et du CO₂ atmosphérique. Différentes valeurs de pH peuvent être obtenues en modifiant la concentration de HCO₃ et/ou la concentration de CO₂ atmosphérique (cela exige l'utilisation de récipients clos) tel que spécifié dans l'ISO 14442. Si de telles modifications sont nécessaires pour réaliser un essai à une valeur de pH différente spécifique, il faut que cela soit expliqué et enregistré.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e19e490f-c46f-493c-8c62-831e90a3963a/iso-8692-2004>

7.2 Préparation de la préculture et de l'inoculum

Lancer une préculture deux à quatre jours avant le début de l'essai. Le milieu de croissance (7.1) est inoculé à une concentration cellulaire suffisamment basse (par exemple 5×10^3 cellules/ml à 10^4 cellules/ml pour une préculture de trois jours) de façon à maintenir la croissance en phase exponentielle jusqu'au début de l'essai. La préculture doit être incubée dans les mêmes conditions que l'essai (7.6).

Cette préculture en phase exponentielle de croissance est utilisée comme inoculum pour l'essai. Mesurer la concentration cellulaire de la préculture immédiatement avant l'utilisation, afin de calculer le volume d'inoculum nécessaire.

7.3 Choix des concentrations de la solution pour essai

Il convient d'exposer les algues à des concentrations de la solution pour essai en suivant une progression géométrique avec un facteur ne dépassant pas 3,2 (par exemple 1,0 mg/l, 1,8 mg/l, 3,2 mg/l, 5,6 mg/l et 10 mg/l).

Il convient de choisir les concentrations de manière à obtenir au moins un effet inhibiteur sur la croissance en deçà et au-dessus du paramètre CE_{rx} voulu. Il convient, en outre, d'inclure au moins deux niveaux d'inhibition entre 10 % et 90 % pour permettre l'obtention de données en vue de l'analyse de régression.

Il est possible de réaliser un essai limite avec une seule concentration pour démontrer l'absence de toxicité. Il convient de réaliser six réplicats pour cette concentration unique.

NOTE La gamme de concentrations appropriées est déterminée aisément en effectuant un essai préliminaire permettant de cibler la gamme et 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.

7.4 Préparation des solutions pour essai et des solutions mères

Au cas où la solution pour essai est aqueuse (par exemple eau résiduaire), il est recommandé d'envisager un prétraitement (filtration, neutralisation par exemple), suivant la nature de l'échantillon et l'objectif de l'essai. Ajouter à l'échantillon des solutions mères de substances nutritives (5.3), tel que décrit en 7.1.

Pour des échantillons pour essai non aqueux, il est en général nécessaire de préparer des solutions mères. Il est recommandé de choisir avec soin la méthode de préparation des solutions mères suivant les propriétés de l'échantillon. Les solutions mères sont normalement préparées en dissolvant l'échantillon pour essai dans le milieu de croissance. Lorsque l'échantillon pour essai ne se dissout pas aisément dans le milieu d'essai comme spécifié dans l'ISO 14442 et l'ISO 5667-16, il est nécessaire de procéder à des modifications.

L'essai doit normalement être effectué sans ajustement du pH du milieu après l'ajout de l'échantillon pour essai. Toutefois, certaines substances peuvent avoir un effet toxique dû à leur extrême acidité ou alcalinité. Pour évaluer la toxicité d'une substance indépendamment du pH, ajuster le pH de l'échantillon aqueux ou de la solution mère (avant préparation de la gamme de dilution) en fonction de celui du milieu de culture, en utilisant des solutions à 1 mol/l d'acide chlorhydrique ou à 1 mol/l d'hydroxyde de sodium (voir l'ISO 5667-16).

7.5 Préparation des lots d'essai et des témoins

Préparer les lots d'essai et les témoins en mélangeant les volumes appropriés d'échantillon pour essai ou de solutions mères de l'échantillon pour essai, de milieu de croissance et d'inoculum (7.2) dans les récipients d'essai. Le volume total, les concentrations de substances nutritives ajoutées au milieu de croissance et la densité de cellule doivent être les mêmes dans tous les récipients.

La concentration cellulaire initiale doit être suffisamment faible pour permettre l'obtention d'une croissance en phase exponentielle dans la culture témoin pendant toute la durée de l'essai, sans variation du pH supérieure à 1,5 unité de pH (voir Article 8). Par conséquent, il ne faut pas que les concentrations cellulaires initiales excèdent 10^4 cellules/ml.

ISO 8692:2004

Préparer au moins trois réplicats pour chaque concentration de substance à expérimenter. Prendre six autres flacons et n'y ajouter que le milieu de culture et l'inoculum sans échantillon pour essai. Ces récipients servent de témoins. Si cela est approprié, préparer une gamme distincte de concentrations de l'échantillon pour essai sans algues servant de valeur de base pour les déterminations de la concentration cellulaire.

Le nombre de réplicats par concentration peut être réduit pour des raisons statistiques (voir l'ISO/TS 20281) si l'on augmente le nombre de concentrations et si l'on réduit l'intervalle entre les concentrations.

Mesurer le pH d'un échantillon de chaque lot d'essai ainsi que celui des solutions témoins.

7.6 Incubation

Les récipients doivent être suffisamment couverts pour éviter toute contamination aérienne et pour réduire l'évaporation de l'eau, mais ils ne doivent pas être étanches à l'air de façon que le CO₂ puisse y pénétrer (une petite ouverture suffit). Incuber les récipients d'essai à $23 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ sous lumière blanche continue. L'intensité lumineuse au niveau moyen des milieux d'essai, mesurée à l'aide d'un récepteur approprié dans le domaine de longueur d'onde effective de la photosynthèse de 400 nm à 700 nm, doit être homogène à $\pm 10 \%$ et doit se situer dans l'intervalle de $60 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ à $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$.

Il est important de noter que la méthode de mesure, en particulier le type de récepteur (collecteur), influe sur la valeur mesurée. Les récepteurs sphériques (lesquels répondent à la lumière sous tous les angles au-dessus et au-dessous du plan de mesure) et les récepteurs hémisphériques (lesquels répondent à la lumière sous tous les angles au-dessus du plan de mesure) sont préférés aux récepteurs unidirectionnels. Ils donnent des résultats plus élevés pour une source lumineuse multipoint du type de celle décrite dans la Note.

NOTE L'intensité lumineuse spécifiée ci-dessus peut être obtenue à l'aide de quatre à six lampes fluorescentes du type lumière blanche universelle (naturelle) {par exemple, un étalon de couleur 2 spécifié (d'une température de couleur de 4 300 K) conformément à [4]}. La distance optimale des lampes est d'environ 0,35 m du milieu de culture algale.