
**Qualité de l'eau — Détermination de
l'effet toxique des constituants de l'eau et
des eaux résiduaires vis-à-vis des
lenticles d'eau (*Lemna minor*) — Essai
d'inhibition de la croissance des lenticles
d'eau**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Water quality — Determination of the toxic effect of water constituents
and waste water on duckweed (Lemna minor) — Duckweed growth
inhibition test*

[ISO 20079:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005>



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 20079:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005>

© ISO 2005

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
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	4
5 Interférences	4
6 Appareillage	4
7 Réactifs	5
8 Organismes d'essai	7
9 Cultures mères et précultures	7
10 Mode opératoire	8
11 Critères de validité	11
12 Expression des résultats	11
13 Estimation des valeurs de $CE(r)_x$ pour le nombre de frondes et pour le second paramètre observé	13
14 Report des résultats	13
15 Précision	13
16 Rapport d'essai	14
Annex A (informative) Préparation de milieux nutritifs	15
Annex B (informative) Mesurage de la dilution minimale sans effet (DMSE) des eaux résiduaires — Évaluation simplifiée pour l'analyse des eaux résiduaires	20
Annex C (informative) Fournisseurs de l'espèce <i>Lemna</i>	23
Bibliographie	24

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 20079 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 20079:2005
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005>

Introduction

La lentille d'eau *Lemna minor* est utilisée comme organisme modèle représentatif des plantes aquatiques supérieures. Les lentilles d'eau sont des angiospermes monocotylédones flottantes, autonomes et appartiennent aux *Arales* dans la sous-classe *Aridae*. Ce sont des plantes supérieures à croissance rapide dont la répartition s'étend des tropiques à la zone arctique. En tant que producteurs primaires, elles représentent une source de nourriture pour le gibier d'eau, les poissons et les petits animaux et servent de support physique à divers petits invertébrés.

Les lentilles d'eau peuvent être altérées par certains constituants présents dans les eaux et les effluents (voir Annexe B). L'inhibition de la croissance résultante est calculée à partir des paramètres observés (nombre de frondes, surface des frondes, chlorophylle et poids sec) par différentes méthodes définies de calcul.

Des valeurs de concentrations effectives (CE) sont déterminées pour permettre une évaluation des effets toxiques des constituants présents dans les eaux (par exemple produits chimiques, produits phytopharmaceutiques). L'évaluation pour au moins deux des paramètres observés se base sur les taux de croissance moyens spécifiques.

L'essai est conçu pour mesurer la réponse à des substances dissoutes dans les eaux. Ceci comprend la définition du niveau de dilution ou de la concentration de l'échantillon soumis à essai à laquelle un paramètre observé (critère d'effet) est inhibé par rapport à un témoin à un pourcentage défini.

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20079:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20079:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005>

Qualité de l'eau — Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) — Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau

AVERTISSEMENT — Il convient que les personnes utilisant la présente Norme internationale soient familiarisées avec les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale ne prétend pas couvrir tous les problèmes de sécurité potentiels liés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de mettre en place des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de s'assurer de la conformité avec toutes les dispositions réglementaires nationales.

IMPORTANT — Il est essentiel que les essais réalisés conformément à la présente Norme internationale soient exécutés par du personnel formé.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode permettant la détermination de l'inhibition de la croissance des lentilles d'eau (*Lemna minor*) provoquée par des substances et des préparations contenues dans les eaux, les eaux résiduaires urbaines après traitement et les effluents industriels.

2 Références normatives

ISO 20079:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/488b3432-8294-46e6-bbe5-780c0c7c3dbd/iso-20079-2005>

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, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*

ISO 10260, *Qualité de l'eau — Mesurage des paramètres biochimiques — Dosage spectrométrique de la chlorophylle a*

3 Termes et définitions

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

3.1

cultures axéniques

cultures monospécifiques d'organismes, sans champignons, algues ou autres espèces de macrophytes

3.2

paramètres de calcul

paramètres, dérivés des différents critères observés, permettant d'évaluer la toxicité par différentes méthodes de calcul

EXEMPLE En l'occurrence, les taux de croissance dérivés du nombre de frondes, de la surface des frondes, de la chlorophylle et du poids sec représentent des paramètres de calcul dans la présente Norme internationale.

- 3.3 chlorose**
dépigmentation (jaunissement des tissus des frondes)
- 3.4 colonie**
ensemble de frondes mères et filles, reliées entre elles, parfois désigné comme une plante
- 3.5 lot témoin**
milieu témoin, incluant les organismes utilisés pour l'essai
- 3.6 milieu témoin**
combinaison de l'eau de dilution et/ou du milieu nutritif utilisée pour l'essai
- 3.7 eau de dilution**
eau ajoutée à l'échantillon soumis à essai afin de préparer une série définie de dilutions
- 3.8 temps de doublement**
quotient du logarithme népérien de 2 ($\ln 2$) divisé par le taux de croissance moyen spécifique
- 3.9 concentration efficace**
concentration de l'échantillon soumis à essai (CE_x) à laquelle un effet de x % est mesuré par rapport au témoin
- NOTE** Afin d'indiquer sans ambiguïté une valeur de CE dérivée du taux de croissance, il est proposé d'utiliser le symbole « $CE(r)$ », suivi du paramètre observé utilisé, par exemple $CE(r)$ (nombre de frondes).
- 3.10 fronde**
structure individuelle sous forme de feuille dans une colonie de lentilles d'eau; la plus petite unité (individuelle) capable de se reproduire
- 3.11 surface des frondes**
surface totale de toutes les frondes directement visibles du dessus (à la verticale du récipient)
- 3.12 nombre de frondes**
toutes les frondes issues d'une fronde mère, directement visibles du dessus, sans grossissement
- 3.13 croissance**
augmentation de la biomasse au cours du temps résultant de la production de nouveaux tissus
- NOTE** Dans cet essai, elle fait référence à l'un des paramètres observés.
- 3.14 taux de croissance**
paramètre de calcul défini comme le quotient de la différence des logarithmes népériens d'un des paramètres observés et de la période de temps respective
- NOTE** Si la période correspond à la durée totale de l'essai, le terme est désigné sous le nom de taux de croissance moyen spécifique. Si elle correspond à la période entre deux mesurages au cours de l'essai, le terme est désigné sous le nom de taux de croissance séquentiel (voir 12.1.2).

3.15**inoculum**

nombre de frondes (colonies) ajoutées au lot d'essai au début de l'essai

3.16**nécrose**

mort localisée des tissus des frondes (c'est-à-dire apparition d'une coloration marron ou blanche)

3.17**milieu nutritif**

solution aqueuse contenant les nutriments et les micronutriments essentiels pour la croissance des lentilles d'eau

3.18**paramètres observés**

paramètres observés ou mesurés permettant de quantifier la biomasse, tels que le nombre de frondes, la surface des frondes, la chlorophylle, le poids sec, mesurés ou dénombrés une ou plusieurs fois

NOTE Ces paramètres (tels que le nombre de frondes, la surface des frondes ou la teneur en chlorophylle et le poids sec) sont pertinents pour l'évaluation de la croissance et de la vitalité des organismes d'essai.

3.19**préculture**

culture de lentilles d'eau utilisée pour l'acclimatation des plantes aux conditions d'essai et pour la croissance des plants qui seront utilisés dans l'inoculum

3.20**racine**

partie de la plante *Lemna* qui présente une structure racinaire

3.21**culture mère**

culture monospécifique de lentille d'eau, dans le but de conserver en laboratoire l'espèce définie *Lemna* d'origine et de fournir l'inoculum pour la préculture

NOTE Il est indispensable d'utiliser des souches définies et contrôlées, en raison des incertitudes liées à la taxonomie des espèces. La liste des adresses des fournisseurs est donnée à l'Annexe C.

3.22**lot d'essai**

milieu d'essai incluant les organismes utilisés pour l'essai

3.23**milieu d'essai**

combinaison de l'échantillon soumis à essai, de l'eau de dilution et/ou du milieu nutritif, utilisée pour l'essai

3.24**échantillon pour essai**

portion discrète d'un échantillon (par exemple, eau prélevée à partir du milieu récepteur, eaux usées, substances chimiques dissoutes ou préparations, produits et composés) ayant subi un prétraitement en fonction des besoins de cet essai (dissolution, filtrage, neutralisation, par exemple)

4 Principe

Les plantes de l'espèce *Lemna minor* sont cultivées en culture monospécifique à différentes concentrations de la substance soumise à essai pendant une période de sept jours. L'objectif de l'essai est de quantifier les effets des substances sur la croissance végétative pendant cette période par l'évaluation du nombre de frondes et de la biomasse (surface totale des frondes, poids sec ou chlorophylle). Afin de quantifier les effets des substances, le taux de croissance des solutions d'essai est comparé à celui des témoins et la concentration provoquant une inhibition de x % du taux de croissance est déterminée et exprimée en tant que $CE(r)_x$.

5 Interférences

Les substances non solubles, faiblement solubles ou volatiles, les substances bio- ou photodégradables, les substances réagissant avec l'eau de dilution ou avec le milieu nutritif ou dont l'état évolue au cours de l'essai peuvent fausser ou réduire la reproductibilité des résultats (voir l'ISO 5667-16). Il est nécessaire de prêter une attention particulière en cas d'accumulation de substances à la surface de l'eau, étant donné que ce phénomène peut augmenter les effets sur les lentilles d'eau.

6 Appareillage

Le dispositif expérimental détermine les besoins en matériel de laboratoire.

6.1 Récipients cylindriques, (bêchers en verre, cristallisoirs, boîtes de Petri).

Volume minimal de 150 ml (pour 2/3 du volume total, c'est-à-dire 100 ml de solution d'essai).

6.2 Couverts en verre uniformes.

Il est possible de prévoir des couvercles pour minimiser l'évaporation et la contamination accidentelle.

6.3 Installations à température et éclairage constants, chambre ou bain-marie à température contrôlée, incubateur ou chambre climatique.

6.4 Spectromètre pour surveiller la chlorophylle, 665 nm et 750 nm.

6.5 Luminomètre, à utiliser pour mesurer l'intensité lumineuse.

6.6 pH-mètre.

6.7 Pincettes.

6.8 Verrerie, pour la préparation des différentes gammes de concentrations et du milieu nutritif (flacons volumétriques, cylindres gradués, pipettes, boîtes de Petri).

6.9 Analyseur d'images, pour mesurer le nombre et la surface des frondes.

6.10 Autoclave.

6.11 Appareil de filtration, pour la filtration stérile.

7 Réactifs

N'utiliser que des réactifs de qualité analytique reconnue.

7.1 Eau de dilution, eau distillée ou déionisée ou eau de pureté équivalente avec une conductivité $\leq 10 \mu\text{S/cm}$.

7.2 Acide chlorhydrique, par exemple $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

7.3 Solution d'hydroxyde de sodium, par exemple $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

7.4 Glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$.

7.5 Milieu gélosé (agar-agar).

Voir Annexe A.

7.6 Milieu nutritif, milieu *STEINBERG modifié* (voir Tableau 1).

En règle générale, le milieu *STEINBERG modifié* doit être utilisé pour toute les applications du domaine d'application des lignes directrices, c'est-à-dire les constituants des eaux et des eaux résiduelles. Dans certains cas, l'utilisation des milieux décrits à l'Annexe A peut être adaptée, pour autant que les critères de validité sont remplis.

Tableau 1 — Milieu *STEINBERG* à pH stabilisé (modifié selon Altenburger)

Substance		Milieu nutritif	
Macroéléments	Masse molaire	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,37	100,00	0,41
Microéléments	Masse molaire	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{mol/l}$
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287,43	180,00	0,63
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241,92	44,00	0,18
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	197,84	180,00	0,91
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	270,21	760,00	2,81
EDTA disodique dihydraté	372,24	1 500,00	4,03

7.6.1 Concentrations et solutions mères (voir Tableaux 2 et 3).

Préparer le milieu nutritif à partir de solutions individuelles. Les concentrations requises pour la préculture et le milieu d'essai sont ensuite obtenues par dilution en cas de préparation d'un milieu dix fois concentré.

Tableau 2 — Solutions mères (macroéléments)

Macroéléments (solutions 50 fois concentrées)	g/l
<i>Solution mère 1:</i>	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
<i>Solution mère 2:</i>	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,00
<i>Solution mère 3:</i>	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75

Tableau 3 — Solutions mères (microéléments)

Microéléments (solutions 1 000 fois concentrées)	mg/l
<i>Solution mère 4:</i>	
H ₃ BO ₃	120,0
<i>Solution mère 5:</i>	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180,0
<i>Solution mère 6:</i>	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,0
<i>Solution mère 7:</i>	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,0
<i>Solution mère 8:</i>	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,00
EDTA disodique dihydraté	1 500,00

Il est possible de regrouper les solutions mères 2 et 3 et 4 à 7 (en prenant en considération les concentrations requises).

Afin de prolonger la durée de conservation, autoclaver les solutions mères à 121 °C pendant 20 min ou bien effectuer une filtration stérile (0,2 µm). Il est fortement conseillé d'effectuer une filtration stérile (0,2 µm) pour la solution mère 8.

7.6.2 Préparation de la concentration finale du milieu *STEINBERG modifié*

Ajouter 20 ml de chaque solution mère 1, 2 et 3 (voir Tableau 2) à environ 900 ml d'eau (7.1).

Ajouter 1,0 ml de chaque solution mère 4, 5, 6, 7 et 8 (voir Tableau 3) pour éviter la précipitation.

Il convient que le pH soit de $5,5 \pm 2$ [ajuster par ajout d'un volume le plus réduit possible d'une solution de NaOH (7.3) ou de HCl (7.2)].

Compléter avec de l'eau (7.1) jusqu'à 1 000 ml.