

Première édition
2017-06

Version corrigée
2018-02

**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

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 20227:2017](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53dd0665-0716-4b62-83a1-31e3143d9094/iso-20227-2017)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53dd0665-0716-4b62-83a1-31e3143d9094/iso-20227-2017>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en oeuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
CP 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
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	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 <i>Spirodela polyrhiza</i>	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 <i>Spirodela polyrhiza</i> pour la production de turions	16
Annexe B (informative) Sensibilité du bioessai miniaturisé avec <i>Spirodela polyrhiza</i>	18
Annexe C (informative) Données de performance	21
Bibliographie	22

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*.

La présente version corrigée de l'ISO 20227:2017 inclut les corrections suivantes:

- la date d'édition de la version française a été corrigée.

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 débiter 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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20227:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53dd0665-0716-4b62-83a1-31e3143d9094/iso-20227-2017>

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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/53dd0665-0716-4b62-83a1-31e3143d9094/iso-20227-2017>

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

**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 $\mu\text{S}/\text{cm}$

[SOURCE: ISO 19827:2016, 3.4]

**3.7
racine**

partie de la plante *Spirodela polyrhiza* qui présente une structure racinaire 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**

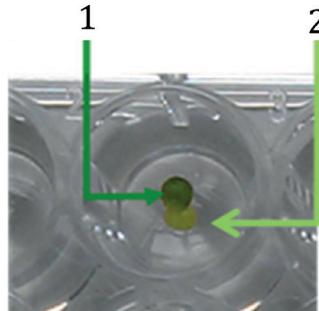
petit bourgeon végétatif qui se développe à partir d'une colonie de la lentille d'eau dans des conditions environnementales spécifiques

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 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Pendant cette période, les turions germent et produisent une (première) petite fronde (voir [Figure 1](#)).

Un turion ayant germé avec sa première fronde est ensuite prélevé dans la boîte de Petri et ensemencé dans chaque puits d'une plaque multipuits (6 × 8) contenant les dilutions de produit toxique et le témoin négatif (chacun d'eux étant préparé dans un milieu de culture).



Légende

- 1 turion
- 2 première fronde

Figure 1 — Agrandissement d'un turion ayant germé avec sa première fronde, dans un puits de plaque d'essai

À la fin des ensemencements, une photo de la plaque multipuits est prise (à $t = 0$ h) à l'aide d'un appareil photo numérique et transférée dans un fichier informatique.

La plaque multipuits est ensuite mise à incuber à (25 ± 1) °C pendant 3 jours avec un éclairage continu d'au moins 6 000 lx, puis une nouvelle photo est prise (à $t = 72$ h) et transférée dans un fichier informatique.

La surface de la première fronde dans chaque puits d'essai est mesurée à l'aide d'un programme d'analyse d'images, sur les deux photos de la plaque multipuits (c'est-à-dire prises à $t = 0$ h et à $t = 72$ h).

La croissance des premières frondes dans les témoins et dans les concentrations ou dilutions d'essai est calculée comme la différence entre les surfaces à $t = 72$ h et les surfaces à $t = 0$ h, puis l'inhibition de la croissance et les valeurs de CE_{50} or CE_x à 72 h sont déterminées.

5 Organismes d'essai

L'espèce utilisée pour l'essai décrit dans le présent document est la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid.

Les organismes d'essai sont obtenus par germination de turions (stockés).

Les turions peuvent être produits en laboratoire selon le mode opératoire décrit à l'[Annexe A](#).

Ils peuvent également être achetés dans le commerce¹⁾.

6 Milieu de culture

Le milieu de culture (3.4) utilisé pour la germination des turions et la croissance des lentilles d'eau pendant l'essai de toxicité est le milieu de Steinberg modifié qui est décrit et utilisé dans l'ISO 20079^[2] et dans les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques (Référence [8]).

1) Les turions fournis par MicroBioTests Inc. sont un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif de ce produit.

Ce milieu est également utilisé pour préparer les dilutions de produits toxiques.

Le milieu de culture est composé de macroéléments et de microéléments à partir desquels des solutions mères sont préparées conformément au [Tableau 1](#) et au [Tableau 2](#), respectivement.

6.1 Préparation des solutions mères

Préparer les huit solutions mères en ajoutant la masse prescrite de produits chimiques à 1 l d'eau pure ([3.6](#)).

Tableau 1 — Solutions mères de macroéléments

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

Tableau 2 — Solutions mères de microéléments

Microéléments (concentrés 1 000 fois)		mg/l
Solution mère 4	H ₃ BO ₃	120,00
Solution mère 5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	180,00
Solution mère 6	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	44,0
Solution mère 7	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,00
Solution mère 8	FeCl ₃ ·6H ₂ O	760,00
	Sel disodique d'EDTA dihydraté	1 500,00

Les solutions mères 2 et 3 peuvent être réunies, de même que les solutions mères 4 à 7 (en tenant compte des concentrations requises).

6.2 Préparation du milieu de Steinberg modifié à la concentration finale

Ajouter 20 ml de chacune des solutions mères 1, 2 et 3 à environ 900 ml d'eau pure ([3.6](#)) dans une fiole jaugée de 1 l.

Ajouter ensuite 1,0 ml de chacune des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8.

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau pure.

Le pH du milieu de culture doit être de 5,5 ± 0,2; il doit être ajusté avec du HCl ou du NaOH.

Une fois préparé, le milieu de culture a une durée de conservation relativement courte et il doit être utilisé dans les deux semaines qui suivent sa préparation.

7 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, les éléments suivants.

7.1 Enceinte ou local thermostaté, ou incubateur, avec un éclairage fluorescent blanc assurant un éclairage continu uniforme d'au moins 6 000 lx à la surface de la boîte de Petri utilisée pour la germination des turions et de la plaque multipuits.

- 7.2 Luxmètre**, pour le mesurage de l'intensité lumineuse à la surface de la boîte de Petri utilisée pour la germination des turions et de la plaque multipuits.
- 7.3 pH-mètre**, pour le contrôle et/ou l'ajustement du pH du milieu de culture.
- 7.4 Verrerie de laboratoire**, pour la préparation des concentrations d'essai (fioles jaugées, éprouvettes graduées, pipettes, tubes à essai).
- 7.5 Boîtes de Petri**, de 9 cm de diamètre, munies d'un couvercle, pour la germination des turions.
- 7.6 Micro-tamis**, à mailles de 100 µm, pour le rinçage des turions stockés.
- 7.7 Plaques multipuits**, comportant 6 × 8 puits, comme plaques d'essai.
- 7.8 Spatule en plastique**, pour le transfert des turions ayant germé dans les puits de la plaque multipuits.
- 7.9 Appareil photo numérique**, pour prendre une photographie de la plaque multipuits contenant les lentilles d'eau en cours de croissance.
- 7.10 Système d'analyse d'image**, pour le mesurage de la surface des premières frondes.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8 Produits chimiques de référence

- 8.1 3,5-dichlorophénol**, de qualité analytique, pureté > 99 %.
- 8.2 Chlorure de potassium, KCl**, de qualité analytique, pureté > 99 %.

9 Mode opératoire

9.1 Germination des turions de *Spirodela polyrhiza*

Lorsque des turions provenant d'une culture de *Spirodela polyrhiza* sont utilisés, placer les turions dans une boîte de Petri (7.5) et verser 30 ml de milieu de culture (3.4).

Lorsque des turions stockés sont utilisés, prélever un tube contenant des turions stockés et l'agiter légèrement pour remettre les turions en suspension.

Verser le contenu du tube sur le micro-tamis (7.6) et rincer avec de l'eau pure (3.6) pour éliminer le milieu de conservation.

Mettre 10 ml de milieu de culture (3.4) dans la boîte de Petri (7.5).

Renverser le micro-tamis et transférer tous les turions dans la boîte de Petri en versant 10 ml de milieu de culture sur la surface du micro-tamis.

Compléter le remplissage de la boîte de Petri en ajoutant 10 ml de milieu de culture.

Couvrir la boîte de Petri avec le couvercle transparent et la placer dans l'incubateur ou dans le local thermostaté (7.1).

Faire incuber la boîte de Petri pendant 3 jours (72 ± 1) h à (25 ± 1) °C, avec un éclairage continu (d'au moins 6 000 lx à la surface de la boîte de Petri).

NOTE La germination des turions et la croissance des premières frondes dépendent fortement des conditions de température et d'éclairement lumineux. Il est donc important de respecter aussi fidèlement que possible les valeurs prescrites de température et d'éclairement lumineux.

9.2 Essais sur des effluents (et des eaux résiduaires)

L'échantillonnage et la préparation des échantillons doivent être effectués conformément à l'ISO 5667-16.

9.2.1 Ajout d'un milieu de culture concentré à l'échantillon d'effluent

Transférer environ 80 ml d'effluent dans une fiole jaugée de 100 ml.

Ajouter 2 ml de chacune des solutions mères 1, 2 et 3, et 100 µl de chacune des solutions mères 4, 5, 6, 7 et 8 dans la fiole jaugée.

Compléter au trait de 100 ml avec l'effluent, boucher la fiole et l'agiter vigoureusement pour homogénéiser le contenu.

NOTE L'addition de 6,5 ml de milieu de culture (3.4) à 93,5 ml d'effluent dilue l'échantillon d'effluent d'environ 6 %. Cela signifie que la plus haute concentration d'effluent qui sera soumise à essai est d'environ 94 % par rapport à l'échantillon d'effluent initial.

9.2.2 Préparation des dilutions d'effluent

Un mode opératoire courant pour la préparation de la gamme de dilutions est décrit ci-après. Selon l'objectif de l'essai et les exigences statistiques concernant les résultats d'essai, d'autres schémas de dilution avec des concentrations en série géométrique ou logarithmique peut également être appropriés.

Une gamme de dilutions 1:1 est préparée à partir de l'effluent à 94 % (voir Figure 2).