
**Qualité de l'eau — Détermination de la
toxicité létale aiguë vis-à-vis de copépodes
marins (*Copepoda*, *Crustacea*)**

*Water quality — Determination of acute lethal toxicity to marine copepods
(Copepoda, Crustacea)*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14669:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aeb9ef26-146e-46f7-90fe-0d8d951af27b/iso-14669-1999>



Sommaire

1	Domaine d'application	1
2	Références normatives	1
3	Principe	1
4	Environnement de l'essai	2
5	Réactifs et matériaux	2
6	Appareillage	3
7	Échantillonnage, traitement et préparation des échantillons	3
8	Mode opératoire	4
9	Calcul et validité des résultats	6
10	Fidélité	6
11	Rapport d'essai	7
	Annexe A (informative) Exemple de détermination de la toxicité létale aiguë d'une substance chimique vis-à-vis d'un copépode marin	8
	Annexe B (informative) Méthodes de culture des copépodes marins <i>Acartia tonsa</i>, <i>Tisbe battagliai</i> et <i>Nitocra spinipes</i>	11
	Annexe C (informative) Données de fidélité	16
	Bibliographie	17

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14669:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ach9ef26-146e-46f7-90fe-0d8d951a27b/iso-14669-1999>

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 3.

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.

La Norme internationale ISO 14669 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Les annexes A à C de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 14669:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aeb9ef26-146e-46f7-90fe-0d8d951af27b/iso-14669-1999)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aeb9ef26-146e-46f7-90fe-0d8d951af27b/iso-14669-1999>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14669:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aeb9ef26-146e-46f7-90fe-0d8d951af27b/iso-14669-1999>

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité létale aiguë vis-à-vis de copépodes marins (Copepoda, Crustacea)

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis l'une quelconque de trois espèces spécifiées de copépodes marins (*Copepoda*, *Crustacea*)

- a) de substances chimiques solubles, ou pouvant être maintenues en suspension stable ou en dispersion stable dans les conditions de l'essai;
- b) d'effluents industriels et urbains, épurés ou non, s'il y a lieu, après décantation, filtration ou centrifugation;
- c) des eaux de mer ou d'estuaires.

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 5667-2, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

ISO 5667-16, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons.*

3 Principe

Les copépodes sont exposés à un échantillon de substance chimique, d'effluent ou d'eau, à différentes concentrations, dans de l'eau de mer. La mortalité des copépodes est enregistrée au bout de 24 h et de 48 h.

La concentration qui, en 48 h, provoque la mortalité de 50 % des copépodes exposés dans les conditions de l'essai définies dans la présente Norme internationale, est déterminée. Cette concentration, dite concentration létale médiane, est désignée par CL50 - 48 h.

NOTE Si possible, la concentration provoquant la mortalité de 50 % des copépodes en 24 h est également déterminée. Cette concentration est désignée par CL50 - 24 h. Dans certains cas, il peut s'avérer utile de prolonger la période d'exposition à 96 h et de déterminer la CL50 - 96 h.

Dans les cas où il est impossible de déterminer la CL50 - 48h, il est souhaitable d'indiquer la plus faible concentration d'essai provoquant la mortalité de la totalité des copépodes, ainsi que la plus forte concentration d'essai ne provoquant la mort d'aucun copépode, qui constituent des informations utiles.

L'essai est conduit en une ou deux étapes:

- un essai préliminaire, qui sert à déterminer la gamme des concentrations à soumettre à l'essai définitif et qui donne une indication approximative de la CL50 - 48 h (et, le cas échéant, de la CL50 - 24 h);
- un essai définitif, effectué lorsque la valeur approximative résultant de l'essai préliminaire est insuffisante, ce qui permet de calculer la CL50 - 48 h (et, le cas échéant, la CL50 - 24 h) et de déterminer les concentrations correspondant à une mortalité de 0 % et de 100 %.

Lorsque la méthode décrite dans la présente Norme internationale est appliquée aux substances chimiques, un essai aux limites peut être effectué à 100 mg/l, ou à une concentration inférieure correspondant à la concentration maximale à laquelle la substance reste soluble ou en suspension stable dans les conditions de l'essai.

4 Environnement de l'essai

Le mode opératoire décrit dans la présente Norme internationale doit être effectué à l'intérieur d'une pièce, d'un incubateur ou d'un bain-marie dont la température est maintenue à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et selon un cycle jour/nuit de 16 h/8 h. L'atmosphère doit être exempte de vapeurs ou de poussières toxiques vis-à-vis des copépodes.

5 Réactifs et matériaux

5.1 Organisme pour essai: l'une des espèces de copépodes marins suivantes:

a) *Acartia tonsa* Dana;

b) *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco;

c) *Nitocra spinipes* Boeck.

Se procurer les organismes pour essai à partir de cultures de laboratoire. Les méthodes de culture selon les différentes espèces sont indiquées à l'annexe B ainsi que des lignes directrices permettant leur identification. Après éclosion des œufs, le cycle de vie des copépodes est constitué des stades de nauplie, de copépodide et du stade adulte. L'âge et le stade de développement au début de l'essai devant figurer dans le rapport d'essai sont les suivants:

- *Acartia tonsa*: copépodides de grande taille (stade 5) ou adultes;
- *Tisbe battagliai*: copépodides âgés de 6 jours \pm 2 jours;
- *Nitocra spinipes*: adultes âgés de 3 semaines à 4 semaines.

5.2 Eau de dilution.

Comme eau de dilution, utiliser de l'eau de mer naturelle ou synthétique. Si de l'eau de mer naturelle est utilisée, elle doit être prélevée à la plus grande distance possible de sources de pollution connues et être filtrée afin d'éliminer les organismes indigènes. Si de l'eau de mer synthétique est utilisée, elle doit être préparée par dissolution, dans de l'eau distillée ou déionisée, de réactifs de qualité analytique reconnue, ou bien d'une formulation vendue dans le commerce. Cependant, les informations dont on dispose lorsque ces espèces de copépodes sont utilisées avec une eau de mer synthétique ne sont pas suffisantes pour permettre de recommander un exemple particulier.

La salinité de l'eau de dilution doit être comprise entre 29×10^{-3} et 36×10^{-3} . Le choix d'une salinité plus faible, mieux adaptée aux essais sur des eaux d'estuaire ou des eaux saumâtres, doit être justifié dans le rapport d'essai. Les *Nitocra spinipes* peuvent être utilisés à des salinités aussi faibles que 1×10^{-3} ; quant aux *Tisbe battagliai*, ils peuvent être utilisés à des salinités aussi faibles que 20×10^{-3} . Quelle que soit la salinité retenue, la culture des organismes pour essai impose qu'elle reste constante (à $\pm 3 \times 10^{-3}$ près) au moins pendant les 7 jours précédant l'essai. Avant d'être utilisée pour préparer les solutions d'essai, l'eau de dilution doit avoir une concentration en oxygène dissous supérieure à 80 % de la valeur de saturation dans l'air et un pH de $8,0 \pm 0,3$.

L'eau de dilution doit permettre la survie des copépodes pendant au moins 48 h, et doit généralement provenir de la même source que l'eau ayant permis la culture des organismes sur deux générations au moins.

5.3 Substance chimique toxique de référence, par exemple 3,5-dichlorophénol ou toute autre substance chimique appropriée (8.5), de qualité analytique reconnue.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Appareil de mesurage de l'oxygène dissous, de la salinité et du pH.

6.2 Stéréomicroscope à faible grossissement, muni de préférence d'un système d'illumination à fond noir.

6.3 Dispositif à ultrasons ou tout autre appareillage pour la préparation des solutions mères de substances faiblement solubles (7.2.1)

6.4 Récipients pour essais, en matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante (par exemple béciers en verre ou plaques à puits jetables en matière plastique rigide pour culture de tissus). Pour réduire au maximum l'évaporation des solutions d'essai, il est recommandé d'utiliser des couvercles ou des systèmes de fermeture non hermétiques. Des récipients adaptés à l'observation au microscope à faible grossissement peuvent être nécessaires pour l'observation des stades nauplie et copépode.

Avant d'être utilisés, les récipients pour essais doivent être soigneusement lavés, puis rincés d'abord à l'eau puis à l'eau de dilution (5.2).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

7 Échantillonnage, traitement et préparation des échantillons

7.1 Précautions particulières concernant le prélèvement et le transport des échantillons d'eaux ou d'effluents

Le prélèvement des échantillons d'eaux ou d'effluents doit être effectué selon la procédure générale définie dans l'ISO 5667-2. Les flacons doivent être remplis à ras bord pour ne plus contenir d'air.

La conservation et le stockage des échantillons d'eau ou d'effluents doivent être effectués conformément à l'ISO 5667-16, ce qui suit n'étant qu'un simple résumé. Il convient d'effectuer l'essai de toxicité aussi tôt que possible, de préférence dans les 12 h qui suivent le prélèvement. Si ce délai ne peut pas être respecté, refroidir l'échantillon (entre 0 °C et +4 °C) et réaliser l'essai dans les 48 h. Si l'essai ne peut pas être réalisé dans les 48 h, l'échantillon peut être congelé (au-dessous de -18 °C) pour être expérimenté dans les deux mois qui suivent le prélèvement.

7.2 Préparation des solutions de substances à expérimenter

7.2.1 Préparation des solutions mères

Préparer les solutions mères des substances à expérimenter par dilution ou dissolution dans un récipient en verre, d'une quantité connue de la substance dans un volume défini d'eau de dilution, d'eau déionisée ou d'eau distillée. Elles doivent être préparées extemporanément, à moins que la stabilité de la substance en solution soit reconnue, auquel cas la solution mère peut être préparée jusqu'à deux jours avant l'essai.

Pour faciliter la mise en solution ou la dispersion des substances peu solubles dans l'eau, il est possible d'utiliser, pour la préparation des solutions mères, des dispositifs à ultrasons ou d'autres dispositifs appropriés. Il est possible d'utiliser des solvants organiques peu toxiques vis-à-vis des copépodes (par exemple l'acétone), à condition que la concentration du solvant dans la solution d'essai finale soit inférieure ou égale à 0,1 ml/l et que deux séries d'essais témoins, l'une sans solvant et l'autre avec la concentration maximale en solvant, soient effectuées en parallèle à l'essai.

Il n'est pas possible de recommander un seul mode opératoire pour préparer des solutions mères à partir de substances peu solubles dans l'eau, en raison de la nature différente des substances soumises à l'essai.

7.2.2 Préparation des solutions d'essai

Préparer les solutions d'essai en ajoutant, en quantités définies, à l'eau de dilution (5.2) les solutions mères (7.2.1) ou l'effluent (7.1), afin d'obtenir les concentrations choisies (8.1, 8.2) pour l'essai.

Si les solutions mères sont préparées dans de l'eau déionisée ou distillée, toutes les solutions, y compris la solution témoin, doivent recevoir la même quantité d'eau distillée ou déionisée, et la salinité finale doit être comprise dans la gamme définie pour l'essai (5.2).

Il est recommandé que le volume de la solution d'essai préparée soit suffisant pour permettre la détermination, au début de l'essai (8.3), de la concentration en oxygène dissous et du pH, à partir du volume restant, une fois remplis les récipients pour essai.

8 Mode opératoire

8.1 Essai préliminaire

Cet essai permet d'obtenir une valeur approximative de la CL50 - 48 h et de sélectionner, le cas échéant, la gamme de concentrations à retenir pour l'essai définitif. Dans ce but, une large gamme de concentrations de la substance chimique, de l'effluent ou de l'échantillon d'eau (généralement choisies en progression géométrique) est soumise à l'essai. En général, un facteur de 10 ou 3,2 entre les concentrations et un minimum de cinq animaux par concentration, sans répétition, sont appropriés.

Un exemple est fourni à l'annexe A.

(standards.iteh.ai)

8.2 Essai définitif

Cet essai permet de déterminer les pourcentages de copépodes dont la mort est provoquée par les différentes concentrations, ainsi que les CL50 - 24 h et CL50 - 48 h. Choisir une gamme de concentrations en fonction des résultats de l'essai préliminaire (8.1), mais en choisissant un facteur plus faible entre les concentrations (égal en général à 1,8 ou 2). Il est souhaitable que les concentrations retenues permettent d'obtenir deux ou trois pourcentages de mortalité compris entre 10 % et 90 %.

Un exemple de choix d'une gamme de concentrations est donné à l'annexe A.

Pour chaque concentration et pour chaque témoin, utiliser un minimum de 20 copépodes (par exemple quatre répétitions, chacune contenant cinq copépodes). Pour faciliter le comptage des copépodes, il est recommandé d'utiliser des récipients séparés.

8.3 Mode opératoire général

Introduire des volumes égaux de solution d'essai (7.2.2) dans une série de récipients pour essais (6.4). Dans chaque récipient, le volume doit être tel que, suivant le nombre requis de copépodes (8.1, 8.2), la densité des copépodes ne dépasse pas 1 pour 0,5 ml de solution. Dans le cas d'*Acartia tonsa*, la densité maximale recommandée est de 1 copépode pour 5 ml de solution. Pour chaque série d'essais, préparer des récipients témoins contenant chacun un volume d'eau de dilution (5.2) égal au volume des solutions d'essai. Si un solvant est utilisé pour solubiliser ou disperser la substance, préparer une seconde série de récipients témoins avec l'eau de dilution (5.2) contenant le solvant à la concentration maximale utilisée.

Avant le début de l'essai, déterminer, au minimum, la concentration en oxygène dissous et le pH de l'eau de dilution (ou de la solution témoin), ainsi que le pH des solutions d'essai correspondant aux concentrations la plus faible et la plus forte soumises à l'essai.

Introduire le nombre requis de copépodes dans chaque récipient pour essai. Il est conseillé d'utiliser une pipette de diamètre suffisamment large pour transvaser les copépodes dans les solutions d'essai, afin de ne pas endommager les organismes. Veiller à transvaser aussi peu d'eau que possible dans les solutions d'essai.

Les copépodes ne doivent pas être nourris pendant l'essai.

Au cours de l'essai, maintenir les récipients à une température de $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ et sous un cycle jour/nuit de 16 h/8 h.

Au bout de 24 h et 48 h, compter le nombre de copépodes ayant survécu dans chaque récipient. Pour faciliter le comptage, il est conseillé d'utiliser un microscope à faible grossissement (6.2). Les animaux qui ne nagent pas ou dont l'appendice est immobile pendant une période d'observation de 10 s sont considérés comme morts. Noter tout aspect ou comportement anormal des copépodes dans les concentrations d'essai, par rapport aux animaux témoins.

Après avoir dénombré les copépodes vivants après 48 h, mesurer la concentration en oxygène dissous et le pH de la solution dans 1 récipient d'essai au moins par concentration et par témoin (si nécessaire, verser dans un récipient le contenu des récipients correspondant à cette concentration, en prenant les précautions nécessaires pour ne pas modifier la teneur en oxygène dissous).

8.4 Essai aux limites

L'essai aux limites (voir l'article 3) est effectué à l'aide de vingt copépodes, à une concentration unique égale à 100 mg/l, ou à une concentration plus faible correspondant à la valeur maximale à laquelle la substance reste soluble ou en dispersion stable dans les conditions de l'essai.

8.5 Contrôle de la sensibilité des copépodes et de la conformité d'application du mode opératoire

Déterminer régulièrement la CL50 - 48 h (9.1) d'une substance chimique de référence appropriée afin de vérifier la sensibilité des copépodes représentatifs des animaux utilisés dans le cadre d'essais sur d'autres échantillons. Il est recommandé d'utiliser comme substance chimique toxique de référence du 3,5-dichlorophénol (5.3), mais il est également possible d'utiliser d'autres substances chimiques (par exemple du dichromate de potassium) à condition de disposer d'une base de données suffisante retraçant l'expérience que l'on a de cette substance. Consigner la valeur la plus récente de la CL50 - 48 h dans le rapport d'essai (en gardant à l'esprit que cette valeur représente uniquement la toxicité de ce composé et qu'elle n'est pas représentative de la sensibilité de l'espèce copépode vis-à-vis d'autres substances).

Si la CL50 - 48 h de la substance de référence n'est pas comprise dans la gamme donnée dans le Tableau 1, vérifier la stricte application du mode opératoire, les conditions d'élevage des copépodes et, s'il y a lieu, utiliser une nouvelle culture de copépodes.

Tableau 1 — Sensibilité attendue des copépodes au 3,5-dichlorophénol

Espèces	3,5-dichlorophénol mg/l	
	CL50 - 48 h	Concentration nécessaire à une mortalité de 20 % à 80 %
<i>Acartia tonsa</i>	0,5 à 1,5	1,0
<i>Tisbe battagliai</i>	1,1 à 3,5	2,3
<i>Nitocra spinipes</i>	1,9 à 5,7	3,8

Un autre mode opératoire, approprié à la vérification de la sensibilité des copépodes à des intervalles plus fréquents, consiste à déterminer la mortalité après 48 h pour une seule concentration de la substance chimique de référence. Si la mortalité est comprise entre 20 % et 80 % à la concentration donnée dans le Tableau 1, la sensibilité des copépodes est acceptable. En revanche, si la mortalité n'est pas comprise dans ces limites, appliquer la procédure de vérification complète décrite ci-dessus.

La CL50 des substances chimiques peut varier en fonction de la salinité du milieu. Les valeurs du Tableau 1 ne valent que pour le niveau de salinité recommandé de 29×10^{-3} à 36×10^{-3} .

9 Calcul et validité des résultats

9.1 Calcul de la CL50

Pour chaque concentration, recueillir les données des essais répétés et calculer le pourcentage de mortalité après 24 h et 48 h, par rapport au nombre total de copépodes utilisés. Déterminer la CL50 - 48 h (et, le cas échéant, la CL50 - 24 h) à l'aide d'une méthode statistique appropriée (analyse Probit, moyennes mobiles, méthodes binomiales, ou estimation graphique sur un diagramme gaussien-logarithmique).

Lorsque la méthode décrite dans la présente Norme internationale est appliquée aux substances chimiques et que des analyses de chaque concentration, effectuées au début et au cours de l'essai, montrent que l'écart-type relatif des concentrations individuelles mesurées n'est pas supérieur à 20 %, utiliser ces valeurs mesurées pour calculer les CL50 - 48 h et CL50 - 24 h. Si l'écart-type des concentrations mesurées est supérieur à 20 % ou si les concentrations mesurées diminuent de plus de 20 % au cours de l'essai, il est toujours possible de calculer la CL50 sur la base de la moyenne des concentrations mesurées, mais en utilisant les données obtenues avec précaution.

Dans le cas où aucune estimation raisonnable de la CL50 - 48 h n'est possible, en rechercher les causes et, le cas échéant, répéter l'essai. Lorsque les données sont insuffisantes pour calculer la CL50 - 48 h (ou lorsque ce calcul n'est pas demandé), indiquer la concentration minimale correspondant à une mortalité de 100 %, ainsi que la concentration maximale correspondant à une mortalité de 0 %.

9.2 Validité des résultats

Considérer les résultats comme valides si les conditions suivantes sont satisfaites:

- a) la concentration en oxygène dissous à la fin de l'essai (mesurée conformément à 8.3) est supérieure ou égale à 4 mg/l;
- b) le pourcentage de mortalité observé dans les récipients témoins est inférieur ou égal à 10 %;
- c) la toxicité de la substance chimique de référence est comprise dans la gamme spécifiée en 8.5 de la présente Norme internationale.

9.3 Expression des résultats

Exprimer les CL50 - 48 h et CL50 - 24 h et les limites correspondant à une mortalité de 0 % et de 100 %:

- en pourcentage ou, dans le cas des effluents ou des eaux, en millilitres par litre;
- en milligrammes par litre ou, dans le cas des substances chimiques, en microgrammes par litre.

10 Fidélité

Les résultats d'essais interlaboratoires sont donnés à l'annexe C.

11 Rapport d'essai

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

- a) toutes les données nécessaires à l'identification de l'échantillon ou de la substance expérimenté(e);
- b) les méthodes de préparation des échantillons:
 - 1) dans le cas des effluents et des eaux, le mode et la durée de conservation des échantillons et, si nécessaire, les conditions dans lesquelles ont été effectuées la décantation ou la filtration de l'échantillon et la décongélation,
 - 2) dans le cas des substances chimiques, la méthode de préparation des solutions mères et des solutions d'essai;
- c) toutes les informations biologiques, chimiques et physiques relatives à l'essai et non spécifiées dans la présente Norme internationale, y compris l'espèce, l'origine, l'âge et le stade de développement des copépodes, les conditions de culture, ainsi que l'origine et les caractéristiques de l'eau de dilution;
- d) les résultats de l'essai définitif sous forme de CL50 - 24 h et CL50 - 48 h, la méthode de calcul et, selon les cas, les limites de confiance à 95 %; si l'analyse chimique d'une substance a été effectuée, la méthode employée et les résultats;
- e) la concentration minimale correspondant à une mortalité de 100 % et la concentration maximale correspondant à une mortalité de 0 %, en 24 h et 48 h;
- f) tout comportement ou aspect anormal des copépodes dans les conditions de l'essai;
- g) tout détail opératoire non spécifié dans la présente Norme internationale et les incidents susceptibles d'avoir influé sur les résultats.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 14669:1999
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aeb9ef26-146e-46f7-90fe-0d8d951af27b/iso-14669-1999>