
**Qualité de l'eau — Détermination de la
toxicité chronique vis-à-vis de
*Ceriodaphnia dubia***

Water quality — Determination of chronic toxicity to Ceriodaphnia dubia

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20665:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008>



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 20665:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2008

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	2
4 Principe	2
5 Environnement de l'essai	3
6 Réactifs	3
7 Appareillage	6
8 Échantillonnage et échantillons	6
9 Mode opératoire	7
10 Expression des résultats	10
11 Critères de validité	11
12 Fidélité	12
13 Rapport d'essai	12
Annexe A (normative) Préparation du milieu ELENDT M4	14
Annexe B (normative) Préparation du milieu «eau de dureté moyenne»	16
Annexe C (informative) Préparation du milieu de LC OLIGO	17
Annexe D (normative) Mode opératoire pour la préparation à base de levures/Cerophyll/granulés pour truite	19
Annexe E (informative) Feuille de collecte de données	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 (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 20665 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 20665:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008>

Introduction

La mise en évidence d'effets néfastes pour la qualité de l'eau passe, depuis plusieurs années, par la réalisation d'essais biologiques. Les cladocères, *Ceriodaphnia dubia*, sont reconnus comme étant représentatifs du zooplancton largement utilisé lors des essais de toxicité aquatique.

La brièveté de l'essai de toxicité chronique, (7 ± 1) jours, et les faibles volumes utilisés sont des atouts majeurs pour l'obtention de résultats appropriés sur des échantillons qui sont susceptibles de subir des modifications pendant la période de conservation.

Il convient que l'utilisateur soit conscient du fait que des problèmes particuliers peuvent nécessiter la spécification de conditions marginales supplémentaires.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 20665:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20665:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008>

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia*

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale 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 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 absolument essentiel que les essais conduits conformément à la présente Norme internationale soient effectués par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera, Crustacea), basée sur une inhibition de la reproduction après (7 ± 1) jours.

Cette méthode est applicable:

- aux substances chimiques solubles ou pouvant être maintenues en suspension ou en dispersion stables dans les conditions de l'essai;
- aux effluents industriels ou aux eaux usées, le cas échéant, après décantation, filtration ou centrifugation;
- aux eaux douces;
- aux extraits aqueux.

La présente Norme internationale n'est pas applicable à la réalisation d'essais sur des échantillons aqueux provenant d'un milieu marin ou estuarien.

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 5814, *Qualité de l'eau — Dosage de l'oxygène dissous — Méthode électrochimique à la sonde*

ISO 6059, *Qualité de l'eau — Dosage de la somme du calcium et du magnésium — Méthode titrimétrique à l'EDTA*

ISO 10523, *Qualité de l'eau — Détermination du pH*

ISO/TS 20281, *Qualité de l'eau — Lignes directrices relatives à l'interprétation statistique de données écotoxicologiques*

3 Termes et définitions

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

3.1 portée
groupe ou cohorte de nouveau-nés, composé de deux nouveau-nés (ou plus) dans un récipient d'essai pendant un jour donné de la période d'essai engendrés par la femelle adulte entre deux périodes de mue (c'est-à-dire avant que la carapace ne soit rejetée par ladite femelle pendant la mue)

3.2 organisme mature
daphnie femelle adulte, saine qui produit et engendre de multiples portées de nouveau-nés vivants

3.3 lot témoin
série de répliques contenant la **solution témoin** (3.4)

NOTE Dans la présente Norme internationale, 10 répliques constituent le lot témoin.

3.4 solution témoin
mélange de milieu d'essai et de nourriture sans l'échantillon soumis à essai

3.5 concentration effective produisant x % d'inhibition de la reproduction
 CE_x
concentration estimée d'un échantillon pour essai produisant x % d'inhibition de la reproduction (3.7) par rapport au **lot témoin** (3.3), ce qui représente un point de la concentration de l'échantillon pour essai qui selon les estimations provoque un pourcentage donné de réduction d'une fonction biologique de caractère quantitatif

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9358efe2-57f4-4321-b6ea-1a8d4be923e0/iso-20665-2008>

3.6 nouveau-né
nouveau-né ou individu récemment éclos

NOTE Dans la présente Norme internationale, un nouveau-né est une daphnie de premier stade, âgée de moins de 24 h.

3.7 inhibition de la reproduction
comparaison portant sur le nombre de jeunes vivants engendrés par l'ensemble des adultes à la fin de l'essai entre le **lot d'essai** (3.8) et le **lot témoin** (3.3)

3.8 lot d'essai
série de répliques contenant la même **solution d'essai** (3.9)

NOTE Dans la présente Norme internationale, 10 répliques constituent un lot d'essai.

3.9 solution d'essai
mélange constitué du milieu d'essai, de nourriture et de l'échantillon soumis à essai

4 Principe

De jeunes *Ceriodaphnia dubia*, âgées de moins de 24 h au début de l'essai sont exposées individuellement, à une gamme de concentrations de l'échantillon soumis à essai pendant une période de (7 ± 1) jours. En général, l'essai se termine après 7 jours une fois que 60 % des organismes témoins ont engendré leur

troisième portée. La mortalité des femelles adultes et leur reproduction sont contrôlées pendant toute la durée d'exposition. Tout autre paramètre biologique pertinent peut également être étudié.

Les données obtenues permettent, en utilisant un modèle approprié, de calculer la concentration qui provoque x % d'inhibition de la reproduction (CE_x), par exemple CE_{10} , CE_{20} ou CE_{50} .

5 Environnement de l'essai

Réaliser l'essai dans une enceinte ou un local thermostaté permettant d'obtenir (25 ± 2) °C dans les récipients d'essai. S'assurer qu'au cours d'un même essai la température ne varie pas plus de 2 °C.

Régler le cycle jour/nuit (photopériode) sur 16 h de jour et 8 h d'obscurité. Il est recommandé d'avoir un éclairage (7.8) d'une intensité comprise dans une gamme de 100 lx à 600 lx au niveau de l'interface air/eau dans les récipients d'essai (7.2). Ne pas agiter ni aérer les récipients d'essai.

Maintenir l'atmosphère exempte de vapeurs ou poussières toxiques. L'emploi de solutions témoins permet de confirmer que l'essai se déroule bien dans une atmosphère exempte de vapeurs ou poussières toxiques.

6 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, sauf spécification contraire.

6.1 Organismes pour essai

Les *Ceriodaphnia dubia* nouveau-nés sont obtenues par parthénogenèse à partir de femelles adultes, sur au moins trois générations dans les conditions de température, de photopériode et de nourriture identiques à celles de l'essai.

Les *Ceriodaphnia dubia* utilisées pour l'essai doivent être âgées de moins de 24 h et doivent être issues d'une portée comprenant au moins huit animaux nouvellement nés.

La veille de l'essai, isoler à partir de l'élevage une douzaine d'adultes (ou plus) âgés de plus de 6 jours et de moins de 14 jours. Isoler chacun dans un récipient distinct contenant de la nourriture (6.4.1 ou 6.4.2) et du milieu d'essai (6.3.2 ou 6.3.3). Avant l'essai, retirer les adultes des récipients et dénombrer la progéniture. Éliminer tous les récipients contenant moins de huit jeunes vivants.

Les *Ceriodaphnia dubia* peuvent aussi provenir de l'éclosion d'éphippies achetées auprès d'une société spécialisée¹⁾. Ces organismes peuvent être utilisés directement comme organismes pour essai.

6.2 Eau pure, eau de conductivité inférieure à 10 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$).

6.3 Milieu d'essai

6.3.1 Généralités

Deux milieux d'essai sont recommandés: ELENDR M4 (6.3.2) ou une eau de dureté moyenne (6.3.3). Il est possible d'utiliser d'autres milieux d'essai à condition que les critères de validité (Article 11) soient satisfaits.

1) Les éphippies fournies par MicroBiotests, Mariakerke (Gent), Belgique sont un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits de ce fournisseur.

2) 1 mS/m.

Dans ce dernier cas, fournir la référence d'une publication ou, pour des eaux naturelles (dans le cas d'essai sur effluents), la date de prélèvement, le type de conservation, le mode de manipulation, les ajouts effectués et les caractéristiques physico-chimiques concernant les principaux ions [Na(I), K(I), Ca(II), Mg(II), carbonates, chlorure, sulfate] ainsi que le pH et le carbone organique dissous (COD).

6.3.2 Option: Milieu ELENDD M4

Préparer le milieu d'essai ELENDD M4 conformément à l'Annexe A. Le milieu d'essai, ainsi préparé, doit avoir un pH de $8,0 \pm 0,3$ (mesuré comme spécifié dans l'ISO 10523) et une dureté totale de (250 ± 20) mg/l (exprimée en CaCO_3 et mesurée comme spécifié dans l'ISO 6059). Aérer le milieu d'essai jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la valeur de saturation dans l'air et jusqu'à stabilisation du pH. Si nécessaire, ajuster le pH à $8,0 \pm 0,3$ à l'aide d'une solution diluée d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique.

NOTE Étant donné la valeur élevée de la dureté du milieu d'essai et la présence d'EDTA dans ce milieu, la biodisponibilité des ions métalliques bivalents peut être réduite, entraînant de ce fait une diminution de la toxicité apparente de ces ions.

6.3.3 Option: Milieu «eau de dureté moyenne»

Préparer l'eau de dureté moyenne conformément à l'Annexe B. Le milieu d'essai, ainsi préparé, doit avoir un pH compris entre 7,4 et 7,8 (mesuré comme spécifié dans l'ISO 10523) et une dureté totale de (90 ± 10) mg/l (exprimée en CaCO_3 et mesurée comme spécifié dans l'ISO 6059).

6.4 Nourriture

6.4.1 Option 1: Alimentation à base de nourriture pour poissons et de deux espèces d'algues

La nourriture est composée de nourriture pour poissons et des algues *Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata*³⁾ (dénommées auparavant *Selenastrum capricornutum* et *Raphidocelis subcapitata*) (voir NF T90-376^[1] et Référence [2]).

Préparer une suspension de nourriture pour poissons⁴⁾ à 5 g/l dans le milieu d'essai (6.3.2), homogénéisée au broyeur ou avec tout autre moyen permettant l'obtention de particules de quelques micromètres. Préparer cette suspension chaque jour pour nourrir les élevages, ou durant les essais.

Cultiver les algues séparément dans tout milieu approprié (par exemple LC OLIGO, Annexe C). Les utiliser lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance et qu'elle a atteint une densité supérieure à 5×10^6 cellules par millilitre. Ces cultures peuvent être conservées à (4 ± 3) °C à l'abri de la lumière, pendant une durée maximale de 10 jours.

Il convient d'ajouter les constituants suivants à chaque solution d'essai (9.3) avant l'introduction des organismes:

- a) 12×10^6 cellules par litre de *Chlorella vulgaris*;
- b) 6×10^6 cellules par litre de *Pseudokirchneriella subcapitata*;
- c) 500 µl par litre de la suspension de nourriture pour poissons.

3) Les algues fournies par Freshwater Biological Association, Ambleside, Royaume-Uni, sont un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits de ce fournisseur.

4) «Sera micron» est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Dans tous les cas, la quantité de nourriture ne doit pas constituer plus de 10 % du volume final de chaque récipient (9.3).

L'utilisation des algues *Chlorella vulgaris* et/ou *Pseudokirchneriella subcapitata* immobilisées dans une matrice inerte (gélose), sous la forme de billes d'algues⁵⁾ est possible. Dans ce cas, après dissolution de la matrice, centrifuger les algues, éliminer le surnageant et remettre les algues en suspension par agitation dans du milieu d'essai (6.3.2 ou 6.3.3). Recommencer cette opération une seconde fois. La concentration algale dans le milieu d'essai doit être la même que celle décrite ci-dessus.

6.4.2 Option 2: Alimentation à base de levures/Cerophyll⁶⁾/granulés pour truite et d'une seule algue

Une seconde combinaison d'aliments basée sur la méthode d'essai US EPA méthode 1002.0 (Référence [11], p. 141) et les méthodes d'essai Environment Canada, (Référence [5]) est recommandée (voir aussi Références [3] et [4]). Une alimentation quotidienne à base de levures/Cerophyll/granulés pour truite et une seule espèce d'algue est nécessaire pour l'élevage de *Ceriodaphnia* et les essais auxquels celles-ci sont soumises. L'espèce algale la plus communément utilisée est *Pseudokirchneriella subcapitata*.

La formule utilisée pour la préparation à base de levures/Cerophyll/granulés pour truite est donnée dans l'Annexe D. Si l'on choisit l'alimentation levures/Cerophyll/granulés pour truite et une seule algue, il convient de fournir la nourriture aux élevages de masse selon les quantités suivantes:

- 7 ml d'algues concentrées par litre de culture;
- 7 ml de levures/Cerophyll/granulés pour truite concentrés par litre de culture.

Il convient d'alimenter les cultures individuelles selon les quantités suivantes:

- 0,1 ml d'algues concentrées pour 15 ml de culture;
- 0,1 ml de levures/Cerophyll/granulés pour truite concentrés pour 15 ml de culture.

Il convient d'ajouter la nourriture au milieu de culture frais immédiatement avant ou après l'introduction des organismes.

Bien mélanger le concentré algal et la préparation de levures/Cerophyll/granulés pour truite en l'agitant avant la distribution. Si la préparation de levures/Cerophyll/granulés pour truite est conservée à l'état congelé, conserver des aliquotes décongelées à (4 ± 3) °C. Éliminer les portions inutilisées de la préparation de levures/Cerophyll/granulés pour truite non congelées ou décongelées après deux semaines. Conserver les volumes inutilisés de concentré algal à (4 ± 3) °C à l'abri de la lumière, puis les éliminer au bout de 10 jours.

6.5 Substance de référence

Le pentachlorophénate de sodium (C_6Cl_5ONa), le sulfate de cuivre pentahydraté ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), le chlorure de sodium (NaCl) ou le sulfate de zinc ($ZnSO_4$) sont acceptables.

ATTENTION — En cas d'utilisation du pentachlorophénate de sodium en tant que toxique de référence, il convient de consulter sa fiche de données de sécurité avant tout usage par le personnel du laboratoire, en raison de la nature dangereuse de cette substance.

5) Les billes d'algues fournies par Microbiotest, Deinze, Belgique sont un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits de ce fournisseur.

6) Cereal Grass Media — Cerophyll est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

7 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et en particulier ce qui suit:

7.1 Local, enceinte ou bain-marie thermostaté.

7.2 Récipients d'essai, en matériau chimiquement inerte.

En cas d'utilisation de récipients fermés, s'assurer que la capacité est suffisante pour que le rapport phase gazeuse/phase aqueuse soit de 1:1.

Avant utilisation, rincer les récipients avec le milieu d'essai (6.3.2 ou 6.3.3) ou avec de l'eau pure (6.2).

7.3 Dispositif permettant de mesurer la concentration algale, par exemple microscope équipé d'un hématimètre ou d'un compteur de particules. Des méthodes indirectes (par exemple spectrophotomètre, turbidimètre, fluorimètre) peuvent être utilisées si une corrélation acceptable avec la concentration cellulaire peut être établie.

7.4 Pipette de prélèvement de *Ceriodaphnia dubia*, de diamètre suffisant pour capturer les animaux tout en permettant de ne prélever qu'un faible volume de milieu.

7.5 Loupe binoculaire, grossissant 8 fois (ou plus) et, si possible, permettant d'obtenir un grossissement continu.

7.6 Système d'analyse d'image, pour compter et mesurer les cériodaphnies.

7.7 Dispositif de filtration sur membranes, avec filtres de 0,45 µm, 0,22 µm.

7.8 Éclairage⁷⁾, capable de fournir une intensité lumineuse comprise dans une gamme de 100 lx à 600 lx au niveau de l'interface air/eau dans les récipients d'essai (7.2).

7.9 Flacons de collecte d'échantillons, conformes à l'ISO 5667-16:1998, 3.2.

7.10 Tamis, de dimension nominale d'ouverture <100 µm.

8 Échantillonnage et échantillons

Procéder à l'échantillonnage, au transport et à la conservation des échantillons conformément aux modes opératoires généraux spécifiés dans l'ISO 5667-16.

Recueillir les échantillons dans des flacons en matériaux chimiquement inertes (7.9).

Procéder à l'essai de toxicité dès que possible, idéalement dans les 12 h suivant la collecte des échantillons. Si cet intervalle de temps ne peut pas être respecté, refroidir l'échantillon entre 0 °C et 4 °C et soumettre l'échantillon à l'essai dans les 24 h. S'il n'est pas possible de réaliser l'essai dans les 72 h, l'échantillon peut être congelé et maintenu à une température inférieure à -18 °C, en vue d'effectuer l'essai dans les 2 mois après le prélèvement à condition de s'assurer que ses caractéristiques ne sont pas altérées par la congélation. Au moment de l'essai, homogénéiser l'échantillon à analyser par agitation manuelle et, si nécessaire, laisser décanter pendant 2 h dans un récipient; prélever (à la pipette) la quantité requise de surnageant en maintenant l'extrémité de la pipette au centre de la section de l'éprouvette et à mi-distance entre la surface du précipité et la surface du liquide.

7) Grolux est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.