
**Qualité de l'eau — Détermination de la
toxicité chronique vis-à-vis de
Brachionus calyciflorus en 48 h**

Water quality — Determination of the chronic toxicity to Brachionus calyciflorus in 48 h

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 20666:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-f3d9fb7908b0/iso-20666-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-f3d9fb7908b0/iso-20666-2008>



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 20666:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-f3d9fb7908b0/iso-20666-2008>



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, organismes pour essai et milieux	3
7 Appareillage	4
8 Traitement et préparation des échantillons	5
9 Mode opératoire	6
10 Expression des résultats	9
11 Critères de validité	10
12 Rapport d'essai	10
Annexe A (informative) Préparation du milieu LC OLIGO	12
Annexe B (informative) Données relatives à la fidélité	14
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 20666 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 20666:2008
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-f3d9fb7908b0/iso-20666-2008>

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 rotifères, et en particulier l'espèce *Brachionus calyciflorus*, sont intéressants du point de vue écotoxicologique car ils présentent l'avantage de se reproduire par parthénogenèse et de posséder un très court temps de génération: une seule mère maintenue dans des conditions favorables pendant 48 h produit plusieurs pontes. *Brachionus calyciflorus* est un organisme du zooplancton qui vit dans les eaux douces. Ces animaux sont des consommateurs primaires et servent de proie à un grand nombre d'invertébrés et de larves de poisson.

L'essai spécifié dans la présente Norme internationale se déroule sur 48 h et porte donc sur au moins trois pontes d'un seul organisme mature (voir Référence [11]).

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 20666:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-f3d9fb7908b0/iso-20666-2008>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20666:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-f3d9fb7908b0/iso-20666-2008>

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Brachionus calyciflorus* en 48 h

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 du rotifère *Brachionus calyciflorus*, basée sur l'inhibition de la croissance de la population en 48 h.

Cette méthode est applicable:

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

La présente Norme internationale n'est applicable ni aux essais de produits chimiques instables dans l'eau (hydrolysables, susceptibles d'absorber, etc.), sauf si l'on mesure la concentration d'exposition, ni aux essais effectués sur des échantillons aquatiques 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 10523, *Qualité de l'eau — Détermination du pH*

3 Termes et définitions

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

3.1

lot témoin

série de répliques contenant la **solution témoin** (3.2)

[ISO 20665:2008]

NOTE Dans la présente Norme internationale, 8 répliques constituent le lot témoin.

3.2

solution témoin

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

[ISO 20665:2008]

3.3

concentration effective produisant x % d'inhibition de croissance de la population

CE_x

concentration estimée de l'échantillon produisant une augmentation à x % de l'**inhibition de croissance de la population** (3.4) par rapport au **lot témoin** (3.1)

3.4

inhibition de croissance de la population

comparaison du nombre total de femelles (jeunes et mères) à la fin de l'essai, entre le **lot d'essai** (3.5) et le **lot témoin** (3.1)

3.5

lot d'essai

série de répliques contenant la même **solution d'essai** (3.6)

ISO 20666:2008

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-1d91b790880/iso-20666-2008>

[ISO 20665:2008]

NOTE Dans la présente Norme internationale, 8 répliques constituent un lot d'essai.

3.6

solution d'essai

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

[ISO 20665:2008]

4 Principe

Des femelles *Brachionus calyciflorus*, âgées de moins de 2 h au début de l'essai, sont exposées individuellement à une gamme de concentrations de l'échantillon soumis à essai pendant une période de 48 h. L'essai porte sur la croissance de la population de rotifères planctoniques par reproduction parthénogénétique. À la fin de l'essai, le nombre de rotifères femelles est déterminé et, par comparaison avec le témoin, les pourcentages d'inhibition de croissance de la population sont déterminés pour chaque concentration.

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

5 Environnement de l'essai

Réaliser l'essai à l'abri de la lumière dans une enceinte ou un local thermostaté de manière à obtenir une température de (25 ± 1) °C dans les récipients pour essai.

Maintenir l'atmosphère exempte de vapeurs ou poussières toxiques. Cela est vérifié par la production de solutions témoins.

6 Réactifs, organismes pour essai et milieux

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

6.1 Organismes pour essai

Les femelles de l'espèce *Brachionus calyciflorus* (Monogonota, Rotifera) sont obtenues à partir d'un élevage de laboratoire (voir Références [3], [12], [13]) ou provenant de sporocystes disponibles sur le marché¹⁾. Il convient de procéder à une vérification de la sensibilité des organismes à l'aide de sulfate de cuivre pentahydraté ou de pentachlorophénolate de sodium (NaPCP) (voir 6.5).

Dans le cas où l'on utilise des sporocystes, employer la première génération de *Brachionus calyciflorus*, obtenue en faisant éclore des sporocystes dans les conditions suivantes.

Transférer les sporocystes dans un récipient contenant le milieu d'essai (6.3), par exemple 15 mg de sporocystes dans environ 10 ml de milieu d'essai. Incuber le récipient à (25 ± 1) °C pendant une durée de 18 h à 24 h, dans des conditions d'éclairage continu d'intensité comprise entre 1 000 lx et 4 000 lx (7.7).

Un apport de nourriture n'est pas nécessaire à l'éclosion des sporocystes. Cependant, il est possible d'augmenter le taux de multiplication des rotifères en ajoutant des algues, juste après l'éclosion des premiers nouveau-nés, en quantité identique à celle indiquée en 6.4. Comme alternative, il est possible d'ajouter 100 µg/l de nourriture inerte ROTIRICH¹⁾ comme supplément alimentaire pour élevage (Référence [18]).

Dans la mesure où les animaux utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 2 h, il convient de surveiller l'éclosion à partir de 17 h d'incubation, puis toutes les demi-heures.

L'essai est démarré lorsque le nombre de jeunes rotifères est jugé suffisant pour effectuer un essai complet.

EXEMPLE Pour un essai avec cinq concentrations et un témoin (soit 48 rotifères), cette condition est généralement remplie environ 1 h après que la première éclosion a été observée. Le temps de reproduction est relativement stable au sein d'un même laboratoire, ce qui permet une planification de la reproduction de façon à disposer d'un nombre suffisant de jeunes durant les heures de travail.

6.2 Eau pure, de conductivité inférieure à 10 µS/cm²).

6.3 Milieu d'essai, préparé par dissolution des substances minérales suivantes dans 1 l d'eau pure (6.2):

NaHCO ₃	96 mg
CaSO ₄ · 2H ₂ O	60 mg
MgSO ₄	60 mg
KCl	4 mg

1) Des sporocystes rotifères déshydratés et du ROTIRICH sont des exemples de produits appropriés disponibles 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 ainsi désignés.

2) 1 mS/m.

Ce milieu d'essai correspond à une eau synthétique moyennement dure, c'est-à-dire à 80 mg CaCO₃ par litre à 100 mg CaCO₃ par litre (voir Référence [14]). Ainsi préparé, le milieu a un pH de $7,6 \pm 0,3$.

Conserver cette solution à l'abri de la lumière à température ambiante et l'utiliser dans les 7 jours suivant sa préparation.

Aérer le milieu d'essai jusqu'à ce que sa 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 $7,6 \pm 0,3$ à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique. La concentration de la base ou de l'acide requis doit être choisie de manière que le volume à ajouter soit aussi faible que possible. Amener la température du milieu d'essai à (25 ± 1) °C avant utilisation.

6.4 Nourriture, composée d'algues *Chlorella vulgaris*.

Les algues sont cultivées dans tout milieu approprié (par exemple LC OLIGO, voir Annexe A). Elles sont utilisées lorsque la culture est en phase exponentielle de croissance. La concentration algale lors de l'essai doit être comprise entre 2×10^6 et 3×10^6 cellules par millilitre. Pour cela, ajuster préalablement la concentration en centrifugeant la culture (par exemple durant 20 min à $20\,000\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$) et remettre en suspension les algues en agitant avec un volume suffisant de milieu d'essai (6.3) pour obtenir une suspension d'environ 2×10^7 cellules par millilitre à 3×10^7 cellules par millilitre. Cette concentration permet d'apporter de 2×10^6 cellules à 3×10^6 cellules en utilisant un volume de 0,1 ml.

La culture d'algues peut être conservée à (4 ± 3) °C à l'abri de la lumière, pendant une durée maximale de 10 jours.

La nourriture peut aussi être composée d'algues *Pseudokirchneriella subcapitata*³⁾ (anciennement dénommées *Selenastrum capricornutum* ou *Raphidocelis subcapitata*). La concentration algale lors de l'essai doit être comprise entre 1×10^6 cellules par millilitre et $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre.

L'utilisation d'algues immobilisées dans une matrice inerte (gélose), sous forme de billes d'algues⁴⁾ est possible. Dans ce cas, après dissolution de la matrice, centrifuger les algues, éliminer le surnageant et remettre les algues en suspension en les agitant dans le milieu d'essai (6.3). Recommencer cette opération une seconde fois. La concentration algale dans le milieu d'essai doit se situer dans la fourchette spécifiée ci-dessus.

6.5 Substance de référence

Le NaPCP (C₆Cl₅ONa) et/ou le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄ · 5H₂O) peuvent être utilisés.

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.

7 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et en particulier ce qui suit.

7.1 Enceinte ou local thermostaté.

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) Les billes d'algues 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.

7.2 Récipients pour essai; microplaques à usage unique, fabriquées en un matériau chimiquement inerte, comprenant des puits de contenance supérieure ou égale à 1 ml, permettant d'obtenir une hauteur d'eau si possible inférieure à la profondeur de champ de la loupe (7.5). Par exemple, des microplaques de 24 (4 × 6) puits ayant un diamètre de puits d'environ 16 mm sont appropriées. Ne pas utiliser de microplaques à fond rond. Comme alternative, utiliser des récipients uniques et fermés.

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 (spectrophotomètre, turbidimètre, fluorimètre, par exemple) peuvent être utilisées si une corrélation acceptable avec la concentration cellulaire peut être établie.

7.4 Pipette de prélèvement des rotifères, de diamètre suffisant pour capturer les animaux tout en permettant de ne prélever qu'un faible volume de milieu. Par exemple, des mini-pipettes capillaires de 1 ml à usage unique conviennent.

7.5 Loupe binoculaire, grossissant au moins 8 fois et, si possible, permettant d'obtenir un grossissement continu.

7.6 Système d'analyse de l'image, pour compter et mesurer les *Brachionus calyciflorus*.

7.7 Éclairage, capable de fournir une intensité lumineuse comprise dans une gamme de 1 000 lx à 4 000 lx dans les récipients d'essai (7.2).

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

7.9 Tamis, de dimension nominale d'ouverture < 50 µm (une toile à bluter ayant une dimension nominale d'ouverture de 10 µm ou de 20 µm est appropriée).

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8 Traitement et préparation des échantillons

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c2cc1c1f-cb43-4403-99c2-3d9f7208b04a/iso-20666-2008)

8.1 Précautions particulières pour l'échantillonnage, le transport, la conservation et le traitement d'échantillons d'eaux, d'effluents, ou d'extraits aqueux soumis à essai

Il convient d'effectuer l'échantillonnage, le transport et 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 (7.8).

Procéder à l'essai de toxicité dès que possible, idéalement dans les 12 h suivant le recueil 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 recueil, 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, mettre à 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 des substances formant le précipité et la surface du liquide.

Dans le cas où l'échantillon brut ou le surnageant de décantation est susceptible de perturber l'essai (matières en suspension résiduelles, protozoaires, micro-organismes, etc.), filtrer ou centrifuger l'échantillon brut ou décanter. Cependant, il convient d'éviter cette manipulation de l'échantillon sauf nécessité absolue car elle est susceptible de modifier les caractéristiques physico-chimiques et éventuellement d'éliminer certaines matières toxiques de l'échantillon.

L'échantillon obtenu par l'une ou l'autre de ces méthodes est l'échantillon soumis à essai.

Mesurer le pH (comme spécifié dans l'ISO 10523) et de la concentration en oxygène dissous (comme spécifié dans l'ISO 5814) et enregistrer ces valeurs dans le rapport d'essai (Article 12).