
**Qualité de l'eau — Détermination de
la toxicité des sédiments d'eau douce
envers *Heterocypris incongruens*
(Crustacea, Ostracoda)**

*Water quality — Determination of fresh water sediment toxicity to
Heterocypris incongruens (Crustacea, Ostracoda)*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 14371:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14371:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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	1
5 Environnement d'essai	2
6 Réactifs, organismes d'essai et milieux d'essai	2
7 Appareillage et matériel	3
8 Précautions spéciales relatives à l'échantillonnage, au transport, au stockage et au traitement des échantillons de sédiment	4
9 Mode opératoire	4
9.1 Éclosion des cystes	4
9.2 Première alimentation des ostracodes nouveau-nés	4
9.3 Mesurage de la longueur des nouveau-nés	5
9.4 Ajout de sédiment et de nourriture algale dans le récipient d'essai	5
9.5 Transfert des ostracodes nouveau-nés dans les récipients d'essai	6
9.6 Incubation du système d'essai	6
9.7 Mesurages	6
10 Essai de référence	9
11 Essais sur des produits chimiques purs ou des préparations	10
12 Critères de validité	10
13 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Culture d'<i>Heterocypris incongruens</i> pour la production de cystes	12
Annexe B (informative) Données de fidélité	14
Bibliographie	16

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 14371 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 14371:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012>

Introduction

Pendant plusieurs années, l'évaluation des effets néfastes sur la qualité de l'eau dépendait de la performance des essais biologiques. D'un point de vue historique, les essais de toxicité visaient principalement à évaluer l'impact des polluants présents dans la colonne d'eau des écosystèmes aquatiques, sans tenir compte du danger que représentent les substances toxiques présentes et qui s'accumulent dans les sédiments.

Des «essais par contact direct», dans lesquels les organismes d'essai sont exposés aux sédiments bruts, ont été progressivement développés avec des espèces endobenthiques, notamment les larves de chironome [*Chironomus riparius* ou *Chironomus dilutus* (anciennement *C. tentans*)] ou les crustacés amphipodes épibenthiques (*Hyalella azteca*).

L'essai spécifié dans la présente Norme internationale est un essai par contact direct permettant de déterminer le pourcentage de mortalité et/ou d'inhibition de la croissance sur l'ostracode d'eau douce *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) après 6 jours d'exposition à des sédiments bruts (voir Références [1], [2]).

H. incongruens est une espèce d'ostracode ubiquiste qui est, à ce jour, couramment utilisée non seulement pour les essais de toxicité des sédiments bruts, mais également, par extension, des boues et des sols (voir Références [3]-[21]).

La sensibilité de l'essai par contact direct avec *H. incongruens* est assez similaire à celle des crustacés amphipodes *Hyalella azteca* et à celle des larves de chironome *Chironomus riparius* (voir Références [22]-[25]).

Les essais sont effectués avec des nouveau-nés obtenus par éclosion d'œufs quiescents (cystes), ce qui permet de ne pas avoir besoin de cultiver ou de conserver des souches d'organismes d'essai.

Les nouveau-nés d'*H. incongruens* (150 µm à 200 µm) étant significativement de plus petite taille que ceux d'*Hyalella azteca* et de *Chironomus riparius*, les essais peuvent être effectués dans des récipients d'essai beaucoup plus petits et nécessitent moins de place sur la paillasse et dans l'incubateur.

Les effets sont évalués après une période d'exposition (6 jours) plus courte que celle des essais utilisant les crustacés amphipodes (10 jours à 28 jours) et les larves de chironome (10 jours à 28 jours).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 14371:2012

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012>

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce envers *Heterocypris incongruens* (*Crustacea, Ostracoda*)

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 réalisés conformément à la présente Norme internationale soient exécutés par un personnel ayant reçu une formation adéquate.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination des effets létaux et sublétaux de sédiments contaminés sur le crustacé ostracode *Heterocypris incongruens* après 6 jours d'exposition.

La méthode est applicable non seulement aux sédiments d'eau douce mais également, par extension, aux déchets solides et aux sols après ajout d'eau (non contaminée).

La méthode peut également être appliquée aux produits chimiques ou aux préparations qui sont introduits dans un sédiment de référence. (standards.iteh.ai)

La présente Norme internationale n'est pas applicable aux essais sur les sédiments estuariens ou marins.

2 Références normatives

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012>

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 5667-15:2009, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 15: Lignes directrices pour la conservation et le traitement des échantillons de boues et de sédiments*

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.

3.1

nouveau-né

individu nouvellement éclos

3.2

première alimentation

alimentation des nouveau-nés (3.1) avec une petite quantité d'algues séchées (*Spiruline*) avant l'essai

4 Principe

Les larves d'*Heterocypris incongruens* fraîchement écloses sont exposées à l'échantillon de sédiment à analyser et le pourcentage de mortalité des organismes d'essai est déterminé après 6 jours d'exposition.

Si le pourcentage de mortalité est faible (par exemple <30 %), l'inhibition de la croissance des organismes dans l'échantillon de sédiment est déterminée par rapport à celle obtenue avec le sédiment de contrôle, comme critère d'effet subléthal.

5 Environnement d'essai

L'essai doit être effectué à l'abri de la lumière, dans une pièce ou un incubateur thermostaté à (25 ± 1) °C dans les récipients d'essai.

L'atmosphère doit être exempte de poussières ou de vapeurs toxiques. L'utilisation de solutions de contrôle permet aussi de vérifier que l'essai se déroule dans une atmosphère dépourvue de poussières et de vapeurs toxiques.

6 Réactifs, organismes d'essai et milieux d'essai

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

6.1 Organismes d'essai

Les organismes d'essai sont des nouveau-nés d'ostracodes d'eau douce *Heterocypris incongruens* obtenus par éclosion d'œufs quiescents (cystes) de ce crustacé.

Les cystes d'*H. incongruens* proviennent des cultures de laboratoire décrites dans l'Annexe A. Ils peuvent également être achetés auprès d'un organisme spécialisé¹⁾.

6.2 Eau pure, ayant une conductivité inférieure à 10 µS/cm.

6.3 Milieu d'essai, préparé en dissolvant les 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

ISO 14371:2012
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a3091780-a1f6-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012>

Ce milieu d'essai correspond à une eau synthétique de dureté modérée, c'est-à-dire contenant du CaCO₃ à des concentrations de 80 mg/l à 100 mg/l (voir Référence [26]). Ainsi préparé, le milieu a un pH de $7,6 \pm 0,3$.

Le milieu d'essai peut être utilisé pendant deux semaines lorsqu'il est conservé au réfrigérateur (entre 4 °C et 7 °C) et à l'abri de la lumière.

Aérer le milieu d'essai jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous atteigne la valeur de saturation de l'air et jusqu'à ce que le pH soit stable. Si nécessaire, ajuster le pH à $7,6 \pm 0,3$ en utilisant une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique. La concentration de l'acide ou de la base requis doit être choisie de façon que le volume à mélanger soit le plus faible possible. Avant utilisation, porter la température du milieu d'essai à (25 ± 1) °C.

6.4 Nourriture algale

6.4.1 Suspension de *Spiruline*. Suspension de poudre de l'algue bleue-verte *Spirulina platensis* préparée en mélangeant 150 mg en masse sèche de *Spiruline* dans 10 ml d'eau pure (6.2). La poudre de *Spiruline* est disponible dans les magasins diététiques.

1) MicroBioTests Inc., Mariakerke (Gent), Belgique, est un exemple de fournisseur de cystes d'*Heterocypris incongruens* appropriés. 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 du fournisseur ainsi désigné.

6.4.2 Algues vertes. Suspension de 25 ml d'algues vertes (par exemple *Scenedesmus* spp.) à une concentration d'environ $1,5 \times 10^7$ cellules/ml, préparée avec le milieu d'essai (6.3).

Les algues peuvent également être incorporées dans des billes d'alginate, qui peuvent être conservées durant de longues périodes au réfrigérateur, et «libérées» au moment de l'utilisation (voir l'ISO 8692:—^[31], Annexes B et C).

6.5 Solution de Lugol, pour immobiliser et fixer les organismes d'essai à la fin de l'essai.

La solution de Lugol est préparée en mélangeant 5 g d'iode (I_2) et 10 g d'iodure de potassium (KI) avec 85 ml d'eau pure (6.2).

6.6 Sédiment de contrôle. Un sable de rivière ou un sable marin commercial (non toxique et non calcaire), lavé à l'eau, tamisé pour éliminer les saletés et les débris et séché à l'air, est un sédiment de contrôle approprié²⁾ à condition qu'il fasse partie de la catégorie des sables dits «de taille moyenne», c'est-à-dire ayant une granulométrie 0/2 (soit une taille des particules comprise entre 0 mm et 2 mm).

Au moment des essais, le sédiment de contrôle doit d'abord être «saturé en eau» en procédant de la manière suivante.

Remplir un petit bécher en verre avec le sédiment de contrôle et verser le milieu d'essai (6.3) par-dessus jusqu'à ce que le sédiment soit complètement mouillé. Pendant cette opération, le sédiment doit être agité avec une spatule pour garantir une saturation en eau complète. Le surnageant du milieu d'essai doit être éliminé.

6.7 Substance de référence. Le sulfate de cuivre ($CuSO_4, 5H_2O$) est la substance chimique de référence recommandée.

7 Appareillage et matériel

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

7.1 Pièce ou chambre thermostatée.

7.2 Boîtes de Petri, de 5 cm de diamètre, en verre ou en plastique inerte pour faire éclore les cystes et transférer les organismes d'essai.

7.3 Récipients d'essai. Microplaques à usage unique en matériau chimiquement inerte, équipées de puits d'une contenance d'au moins 10 ml. Des microplaques à six (2×3) puits d'un diamètre de puits d'environ 35 mm sont appropriées.

7.4 Micropipette, en verre pour prélever les organismes d'essai, d'un diamètre intérieur d'environ 1 mm à l'extrémité, pour capturer les animaux tout en prélevant seulement un faible volume de milieu.

Les micropipettes équipées d'une poire à l'extrémité sont parfaitement appropriées pour réaliser les opérations.

7.5 Micropipettes «à large ouverture», en plastique inerte et à large ouverture, pour transférer les suspensions de sédiments.

7.6 Cuillère spatule, en acier inoxydable ou en plastique inerte, d'une contenance de 500 μ l ou 1 000 μ l.

7.7 Spatule plate, en acier inoxydable ou en plastique inerte.

7.8 Microtamis, d'une taille de mailles de 100 μ m.

2) Le sable de rivière ou le sable marin peut être obtenu, dans chaque pays, auprès des magasins d'aquariophilie.

7.9 Stéréo-microscope à éclairage incident (épiscopique), avec un grossissement d'au moins 8 fois et, si possible, un grossissement continu.

7.10 Oculaire étalonné pour stéréo-microscope, pour mesurer la longueur des organismes d'essai.

7.11 Source de lumière, produisant une intensité de lumière dans la boîte de Petri (7.2) de 3 000 lx à 4 000 lx.

7.12 Récipients de collecte des échantillons, conformes à l'ISO 5667-15:2009, Article 7.

8 Précautions spéciales relatives à l'échantillonnage, au transport, au stockage et au traitement des échantillons de sédiment

Effectuer l'échantillonnage, le transport et le stockage des échantillons conformément aux modes opératoires généraux spécifiés dans l'ISO 5667-16.

Les récipients contenant les échantillons de sédiment doivent être conservés à (4 ± 2) °C et à l'abri de la lumière, sans espace de tête au-dessus du sédiment, et les essais doivent être réalisés dès que possible après le prélèvement. Il convient d'effectuer les essais de toxicité dans les deux semaines suivant l'échantillonnage, et de préférence dans la semaine. Dans tous les cas, les essais doivent commencer au plus tard dans les six semaines suivant le prélèvement des échantillons.

NOTE Des études scientifiques indiquent que la toxicité des sédiments conservés à 4 °C ne changeait pas après plusieurs mois de stockage mais que, dans d'autres cas, des changements de toxicité étaient observés dans les jours ou les semaines qui suivaient.

Avant la réalisation de l'essai, les échantillons doivent être homogénéisés en les brassant avec une cuillère ou une spatule dans un récipient en acier inoxydable ou en plastique inerte. Il convient de retirer à la main les débris ou les macro-organismes indigènes de grande taille.

9 Mode opératoire

9.1 Éclosion des cystes

L'éclosion des cystes d'*Heterocypris incongruens* doit se faire comme suit.

Verser 8 ml de milieu d'essai (6.3) dans une petite boîte de Petri (7.2) et ajouter une quantité suffisante de cystes d'ostracodes (6.1) pour effectuer un essai complet³⁾.

Couvrir la boîte de Petri avec un couvercle et la mettre à incuber pendant 48 h à (25 ± 1) °C sous éclairage continu (7.11).

9.2 Première alimentation des ostracodes nouveau-nés

Les nouveau-nés doivent être nourris dans les quelques heures qui suivent immédiatement leur éclosion (c'est-à-dire après 48 h d'incubation des cystes).

Prendre le récipient contenant la suspension de *Spiruline* (6.4.1) et homogénéiser son contenu en l'agitant à la main. Ajouter 1 ml de suspension de *Spiruline* dans la boîte de Petri destinée à l'éclosion et agiter doucement la boîte pour répartir la suspension de nourriture de façon homogène.

Remettre la boîte de Petri dans l'incubateur pendant 4 h.

3) La quantité dépend du taux d'éclosion des cystes. Il convient qu'elle soit suffisante pour fournir suffisamment de nauplii pour effectuer un essai de toxicité complet (c'est-à-dire >120 nauplii). Une quantité de 10 mg en masse sèche de cystes d'ostracodes est normalement suffisante.

9.3 Mesurage de la longueur des nouveau-nés

À l'aide d'une micropipette en verre, prélever 10 ostracodes de la boîte de Petri destinée à l'éclosion, en veillant à aspirer le moins possible de milieu d'essai (6.3) et disposer les organismes au centre d'une lame de verre.

Placer la lame sur la platine du stéréo-microscope et cibler la zone contenant les ostracodes. Verser une goutte de solution de Lugol (6.5) sur les organismes et attendre quelques minutes jusqu'à ce que les nouveau-nés soient complètement immobiles. Mesurer la longueur des ostracodes à l'aide de l'oculaire étalonné et noter les résultats sur le modèle de tableau de données 1 (voir Tableau 1). Calculer et noter la longueur moyenne, $L_{\text{début}}$, des nouveau-nés sur le modèle.

NOTE La taille des ostracodes nouveau-nés varie de 150 μm à 250 μm .

Tableau 1 — Modèle de tableau de données 1: Longueur des ostracodes nouveau-nés

Ostracodes nouveau-nés	Longueur μm
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
Longueur moyenne, $L_{\text{début}}$	

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3091780-a1f5-4cde-b306-90219cae2259/iso-14371-2012>

9.4 Ajout de sédiment et de nourriture algale dans le récipient d'essai

Effectuer l'essai par contact direct sur le sédiment brut sur six réplicats, parallèlement à un sédiment de contrôle (6.6) sur six réplicats également. En cas d'utilisation de microplaques à six puits (7.3), l'essai nécessite deux plaques de ce type.

Dans chaque microplaque, ensemercer trois puits avec le sédiment brut et les trois autres puits avec le sédiment de contrôle. En variante, les six puits de la première microplaque peuvent être remplis avec le sédiment brut, et ceux de la deuxième plaque avec le sédiment de contrôle.

Verser 2 ml de milieu d'essai (6.3) dans tous les puits des deux microplaques.

Remplir le godet de la cuillère spatule (7.6) avec le sédiment d'essai et éliminer l'excédent de sédiment avec la spatule plate (7.7) de façon à obtenir un volume de sédiment de 500 μl ou 1 000 μl dans la cuillère (selon le type de spatule).

Transférer le sédiment dans les six puits des deux microplaques, en utilisant l'extrémité de la spatule plate, pour vider entièrement le godet de la cuillère spatule. Chaque puits doit recevoir 1 000 μl de sédiment (c'est-à-dire deux cuillères de 500 μl si on utilise une cuillère spatule de 500 μl de contenance).

Procéder de façon similaire avec le sédiment de contrôle (6.6), en remplissant les six puits restants des microplaques avec 1 000 μl de sédiment de contrôle.

En maintenant les microplaques à l'horizontale, les agiter doucement pour répartir de façon homogène le sédiment au fond des puits.