

---

---

**Qualité de l'eau — Détermination de  
la toxicité des sédiments d'eau douce  
vis-à-vis de *Hyalella azteca***

*Water quality — Determination of toxicity of fresh water sediments  
using Hyalella azteca*

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 16303:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013>



**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 16303:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2013

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

	Page
<b>Avant-propos</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>vi</b>
<b>1 Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4 Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5 Environnement d'essai</b> .....	<b>3</b>
5.1 Installation d'essai.....	3
5.2 Éclairage.....	3
<b>6 Réactifs, organismes et matériaux d'essai</b> .....	<b>3</b>
6.1 Organisme d'essai.....	3
6.2 Sédiment témoin.....	4
6.3 Colonne d'eau.....	5
6.4 Alimentation des organismes.....	6
6.5 Substance de référence.....	7
<b>7 Matériel</b> .....	<b>7</b>
<b>8 Traitement et préparation des échantillons</b> .....	<b>8</b>
8.1 Généralités.....	8
8.2 Sédiment d'essai.....	8
8.3 Préparation des échantillons de sédiments.....	8
<b>9 Mode opératoire</b> .....	<b>9</b>
9.1 Préparation des récipients d'essai.....	9
9.2 Introduction des organismes.....	10
9.3 Conditions d'essai.....	10
9.4 Renouvellement de la colonne d'eau.....	11
9.5 Mesurages et observations d'essai.....	11
<b>10 Expression des résultats</b> .....	<b>12</b>
10.1 Survie.....	12
10.2 Croissance.....	12
10.3 Validité de l'essai.....	12
<b>11 Analyse et interprétation des résultats</b> .....	<b>12</b>
11.1 Analyse des données.....	12
11.2 Facteurs autres que les contaminants.....	13
<b>12 Substance de référence</b> .....	<b>13</b>
12.1 Essai uniquement en milieu aqueux.....	13
12.2 Essai sur sédiment entier.....	14
<b>13 Rapport d'essai</b> .....	<b>14</b>
<b>Annexe A (informative) Description d'<i>Hyaella azteca</i></b> .....	<b>16</b>
<b>Annexe B (informative) Élevage de <i>Hyaella azteca</i></b> .....	<b>19</b>
<b>Annexe C (informative) Sources d'<i>Hyaella azteca</i></b> .....	<b>21</b>
<b>Annexe D (normative) Préparation de l'aliment LCT</b> .....	<b>23</b>
<b>Annexe E (informative) Essai de reproduction dans les sédiments d'une durée de 42 jours</b> .....	<b>25</b>
<b>Annexe F (informative) Essai de survie et de croissance en colonne d'eau d'une durée de 14 jours</b> .....	<b>26</b>
<b>Annexe G (informative) Données de performance</b> .....	<b>27</b>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 16303:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013>

## 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 procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/CEI, 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/CEI, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

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. 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 sur la liste ISO des déclarations de brevets reçues (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les éventuelles appellations commerciales utilisées dans le présent document sont données pour information à l'intention des utilisateurs et ne constituent pas une approbation ou une recommandation.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, aussi bien que pour des informations au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC) voir le lien suivant: Avant-propos — Informations supplémentaires. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013>

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

## Introduction

Dans l'environnement aquatique, le sédiment sert de réservoir pour les contaminants agricoles, industriels et municipaux. Un sédiment contaminé affecte directement les organismes benthiques et agit comme une source de contamination pour la colonne d'eau, impactant souvent de manière négative les organismes pélagiques. Les essais de toxicité sur sédiments sont généralement utilisés pour déterminer et contrôler les effets toxiques de substances distinctes ou de mélanges complexes pouvant s'avérer nocifs pour la santé des populations indigènes dans les environnements aquatiques et benthiques. La présente méthode décrit des modes opératoires pour réaliser des essais d'une durée de 14 jours et/ou 28 jours destinés à évaluer la toxicité des sédiments vis-à-vis de l'amphipode d'eau douce, *Hyalella azteca*. Pour ces essais, les critères d'effets biologiques comprennent la mortalité et la croissance.

## iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 16303:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013>

# Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de *Hyalella azteca*

**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 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 du personnel ayant reçu une formation adéquate.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale définit une méthode de détermination de la toxicité d'un sédiment entier vis-à-vis de jeunes amphipodes *Hyalella azteca*, fondée sur la survie et l'inhibition de la croissance après 14 jours et/ou 28 jours.

La méthode s'applique

- a) aux échantillons de sédiments d'eau douce contaminés,
- b) aux boues chimiques, industrielles, urbaines, ou autres déchets solides pouvant se combiner à des sédiments d'eau douce, ou
- c) à des produits chimiques ou des préparations ajoutés à un sédiment propre.

La présente Norme internationale est applicable aux échantillons de sédiments d'eau douce. L'amphipode *Hyalella azteca* peut être utilisé pour soumettre à essai les eaux saumâtres d'une salinité maximale de 15 ‰, avec une acclimatation adéquate. La présente Norme internationale n'est pas applicable aux essais sur des échantillons de sédiments marins et estuariens présentant une salinité supérieure à 15 ‰.

La présente méthode consiste en un essai de survie et de croissance d'une durée de 14 jours et/ou 28 jours, applicable aux types d'échantillons de sédiments décrits ci-dessus.

## 2 Références normatives

Les documents suivants, en totalité ou en partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. 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 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*

## 3 Termes et définitions

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

**3.1**  
**sédiment artificiel**

mélange de matériaux simulant les composants physiques d'un sédiment naturel

Note 1 à l'article: voir (6.2.1).

**3.2**  
**sédiment témoin**

sédiment (naturel ou artificiel) utilisé pour évaluer le comportement des organismes d'essai et l'acceptabilité des essais (c'est-à-dire, sédiment propre)

Note 1 à l'article: Les résultats des essais sur le sédiment témoin sont utilisés à des fins de comparaison avec les réponses des organismes dans le(s) sédiment(s) d'essai contaminé(s) et d'évaluation de la validité des essais.

Note 2 à l'article: Les sédiments témoins sont utilisés de façon systématique pour évaluer l'acceptabilité d'un essai (6.2).

**3.3**  
**sédiment pour essai**

quantité distincte de sédiment (prélevé sur le terrain ou dopé) devant être soumise à essai dans le but de déterminer les effets possibles de la contamination sur les amphipodes

**3.4**  
**sédiment dopé (enrichi)**

sédiment auquel un matériau a été ajouté pour les essais

**3.5**  
**sédiment de référence**

sédiment prélevé sur le terrain à proximité d'une zone étudiée, choisi pour ses propriétés qui correspondent étroitement à celles du ou des échantillons du sédiment soumis à essai, à l'exception du degré de contamination

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 16303:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-35cc044a1478/iso-16303-2013>

Note 1 à l'article: Le sédiment de référence est souvent choisi dans un endroit non influencé par la source de contamination, mais généralement à proximité des endroits où sont prélevés les échantillons de sédiment pour essai. Les résultats de l'essai fournissent une base site-spécifique pour l'évaluation de la toxicité.

**3.6**  
**renouvellement intermittent**

essais au cours desquels les solutions d'essai ou l'eau surnageante sont renouvelées en fonction de la dégradation de la qualité de l'eau

**3.7**  
**colonne d'eau**

eau recouvrant la couche de sédiment dans le récipient d'essai

Note 1 à l'article: Également utilisée pour traiter, au besoin, le sédiment (par exemple, pour préparer un sédiment formulé ou des mélanges de sédiment dopé).

**3.8**  
**croissance**

augmentation du poids sec des organismes d'essai au cours de l'expérience, exprimée en poids sec moyen par amphipode survivant

**4 Principe**

Des jeunes amphipodes d'eau douce, *Hyaella azteca*, âgés de 2 jours à 9 jours, classés par tranche d'âge (1 jour à 2 jours), sont exposés par groupes de 10 organismes à un sédiment contaminé ou à un sédiment dopé par une substance chimique d'essai pendant 14 jours et/ou 28 jours.[1],[2],[3] Les critères d'effets de l'essai sont le taux de mortalité et l'inhibition de la croissance, évalués par rapport à ceux des organismes exposés en parallèle à un sédiment témoin. L'essai est réalisé dans des récipients en verre, avec un rapport sédiment/eau (volume à volume) de 1:1,75 ou de 1:4 (par exemple, 100 ml de sédiment avec



175 ml d'eau surnageante ou 100 ml de sédiment avec 400 ml d'eau surnageante). Des essais comparatifs intégrant les deux ratios sédiment/eau recommandés n'ont montré aucune différence notable entre les résultats d'essai sur *H. azteca*.<sup>[4]</sup> Toutefois, le rapport sédiment/eau de 1:4 permet de disposer d'un plus grand volume d'eau surnageante pour l'analyse chimique. L'exposition est essentiellement statique, sauf si le témoin (par exemple variation du pH affectant la forme de l'ammoniaque résiduel) révèle une dégradation de la qualité de l'eau qui nécessite le renouvellement de cette dernière.

Une option long terme (c'est-à-dire 42 jours) pour cet essai de toxicité vis-à-vis de *Hyaella azteca* est décrite dans l'[Annexe E](#). Les critères d'effets de cet essai à long terme comprennent la survie (jours 28, 35 et 42), la croissance (jours 28 et 42), et la reproduction (nombre de jeunes par femelle produits entre le jour 28 et le jour 42).

L'[Annexe F](#) décrit également une méthode d'essai, utilisant *Hyaella azteca*, uniquement en milieu aqueux. Cette méthode correspond à un essai d'une durée de 14 jours portant sur la survie et la croissance de jeunes amphipodes exposés à des échantillons d'effluents industriels, d'effluents de stations d'épuration, d'eaux douces (par exemple eau réceptrice), d'extraits aqueux ou de substances chimiques solubles ou pouvant être maintenues sous forme de suspensions ou de dispersions stables dans les conditions de l'essai.

## 5 Environnement d'essai

### 5.1 Installation d'essai

L'installation d'essai doit être bien ventilée, protégée contre les perturbations physiques et être exempte de poussière et de fumées. Les essais doivent être réalisés dans un local ou une enceinte thermostatée qui maintient une température de  $(23 \pm 2)$  °C dans les récipients d'essai.

### 5.2 Éclairage

Tous les récipients d'essai doivent recevoir un éclairage par le dessus correspondant à un éclairage normal de laboratoire (c'est-à-dire de 100 lx à 1 000 lx) au niveau de l'interface air/eau. Il convient que l'éclairage soit uniforme et qu'il assure un cycle jour/nuit (photopériode) de 16 h d'éclairage et de 8 h d'obscurité.

## 6 Réactifs, organismes et matériaux d'essai

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

### 6.1 Organisme d'essai

*Hyaella azteca* est un organisme épibenthique détritivore et fouisseur qui vit en contact étroit avec la surface (1 ou 2 premiers centimètres) des sédiments d'eau douce. Il est largement présent en Amérique du Nord et du Sud: dans les lacs, les étangs et les cours d'eau à faible courant en région tempérée.<sup>[1],[2],[3]</sup> Les jeunes *Hyaella azteca* proviennent d'élevages de laboratoire maintenus dans des conditions de température, de photopériode et d'alimentation identiques à celles de l'essai. Il convient que l'identification de l'espèce soit confirmée par un personnel qualifié expérimenté dans l'identification des amphipodes d'eau douce à partir des caractéristiques taxonomiques distinctives décrites dans l'[Annexe A](#) et dans des publications antérieures.<sup>[2],[5]</sup>

#### 6.1.1 Stade de développement et taille

Les amphipodes utilisés pour l'essai doivent être âgés de 2 jours à 9 jours et leur âge ne doit pas varier de plus de 2 jours. L'[Annexe B](#) décrit une méthode d'élevage de l'amphipode *Hyaella azteca* et d'obtention d'organismes d'essai d'âge connu. Si la croissance est exprimée en taille moyenne à la fin de l'essai, il convient qu'une longueur moyenne des organismes soit déterminée au lancement de l'essai.

### 6.1.2 Source

Tous les amphipodes utilisés lors d'un essai doivent provenir de la même population et de la même source. Les sources d'organismes à utiliser pour constituer des élevages comprennent des laboratoires publics ou privés qui élèvent *Hyalella azteca* pour les essais de toxicité sur sédiments, ou un fournisseur de réactifs biologiques reconnu.[1],[2],[3] L'Annexe C fournit une liste de sources possibles de *H. azteca*.

## 6.2 Sédiment témoin

Chaque essai de toxicité sur sédiment doit inclure un témoin comportant un nombre minimal de cinq récipients d'essai contenant le sédiment témoin. Les réponses des organismes exposés au sédiment témoin fournissent des mesures permettant de déterminer la validité de l'essai (voir 10.3), des indications relatives à l'état de santé et au comportement normal des organismes d'essai, ainsi qu'une base pour l'interprétation des données obtenues sur les sédiments soumis à essai. Le sédiment témoin est un sédiment naturel ou un sédiment artificiel (c'est-à-dire formulé).

### 6.2.1 Sédiment naturel

Un sédiment naturel, prélevé sur un site de collecte d'eau douce ou légèrement saumâtre (<15 ‰), exempt de sources connues de contaminants et pour lequel le comportement des témoins pour *H. azteca* est connu, peut être utilisé comme sédiment témoin pour un essai, ou comme matériau « propre » pour être dopé avec une substance chimique soumise à essai. Si l'eau des pores du sédiment présente une salinité significative, le laboratoire d'essai doit suivre une procédure d'acclimatation adaptée pour obtenir des *Hyalella* adultes pouvant être utilisés comme reproducteurs et ainsi s'assurer que des jeunes amphipodes, adaptés à la salinité, seront utilisés durant l'essai.

### 6.2.2 Sédiment artificiel

Le sédiment artificiel suivant peut être utilisé comme un sédiment témoin pour les essais sur sédiments d'eau douce, ou comme un matériau « propre » pour le doper avec une substance chimique soumise à essai. Cette préparation est fondée sur le sédiment artificiel recommandé dans l'ISO 10872.

Mélanger soigneusement les composants suivants selon les proportions indiquées:

Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :	20 %
CaCO <sub>3</sub> :	1 %
Dolomite (Argile):	0,5 %
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :	4,5 %
Sable siliceux (granulométrie moyenne: 0,063 mm):	30 %
Sable siliceux (0,1 mm à 0,4 mm):	40 %
Tourbe (issue de tourbières hautes, décomposée, non traitée; finement broyée et passée au tamis <1 mm):	4 %

Il existe plusieurs méthodes acceptables de préparation et de conditionnement du sédiment artificiel. En règle générale, il convient de prendre en compte les paramètres suivants lors du choix d'une formulation pour un sédiment témoin ou un sédiment d'essai.

- assurer la survie, la croissance ou la reproduction d'une grande variété d'organismes benthiques;
- fournir des résultats biologiques cohérents et acceptables pour une grande variété d'espèces;
- être composé de constituants standards, facilement disponibles pour les laboratoires d'essai;

- d) être exempts de concentrations en contaminants susceptibles d'avoir des effets néfastes sur les organismes d'essai.

Des options de sédiments artificiels acceptables sont décrites dans le guide d'Environnement Canada sur le sujet, comprenant également les techniques pour ajouter des substances chimiques d'essai dans un sédiment.[6]

## 6.3 Colonne d'eau

### 6.3.1 Eau douce naturelle

Une eau douce naturelle comprend une alimentation non contaminée d'eau souterraine ou une eau de surface. Si les essais ont pour objectif de simuler les conditions du terrain, l'eau naturelle peut être diluée avec de l'eau distillée ou déionisée ultrapure jusqu'à obtention de la dureté requise. Il est également possible d'utiliser de l'eau provenant du site où le sédiment a été recueilli. Il convient de filtrer l'eau de surface à travers un tamis à maille fine (par exemple 30 µm) pour éliminer des prédateurs ou des « compétiteurs » potentiels. L'utilisation d'eau déchlorée comme eau destinée à recouvrir le sédiment n'est pas recommandée car cette eau déchlorée est souvent de qualité très variable et elle peut contenir des concentrations excessivement élevées en chlore, chloramines, fluorure, cuivre, plomb, zinc ou autres contaminants.

### 6.3.2 Eau reconstituée

Si de l'eau douce reconstituée est utilisée pour la colonne d'eau lors des essais sur *Hyaella azteca*, le milieu artificiel suivant doit être préparé dans de l'eau déionisée:[7]

CaCl <sub>2</sub>	110,98 mg/l	(standards.iteh.ai)
NaHCO <sub>3</sub>	84,01 mg/l	ISO 16303:2013
MgSO <sub>4</sub>	30,09 mg/l	<a href="https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013">https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/21aa95be-57b4-4cc4-8c93-65ce6644a114/iso-16303-2013</a>
KCl	3,728 mg/l	
NaBr	1,029 mg/l	

Avant utilisation, le mélange est aéré pendant 24 h pour ajuster l'oxygène dissous (OD) et stabiliser le pH. Les concentrations en sels peuvent être ajustées afin d'obtenir une composition similaire à celle d'une eau réceptrice étudiée. Toutefois le rapport Ca:Br doit être maintenu constant car ces ions sont indispensables pour *H. azteca* et doivent être présents simultanément[8]. Na<sup>+</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> sont les ions les plus importants pour la survie de *H. azteca*, tandis que les ions Mg<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup> sont nécessaires pour une croissance et une reproduction optimales[7][9]. En raison de leur influence non confirmée, les plages de valeurs de l'alcalinité et de la dureté n'ont pas été définies. L'utilisation standard de la préparation d'eau reconstituée mentionnée ci-dessus pour l'élevage des organismes et pour les essais a confirmé des niveaux acceptables d'alcalinité et de dureté pour *Hyaella Azteca*. La conductivité, le pH, la dureté, l'oxygène dissous et l'alcalinité sont mesurés dans chaque lot d'eau reconstituée. Aucun lot d'eau reconstituée donné ne doit être utilisé pendant plus de 4 semaines.

### 6.3.3 Oxygène dissous

La teneur en oxygène dissous de l'eau recouvrant le sédiment doit être idéalement comprise entre 90 % et 100 % de la valeur de saturation de l'air au début de l'essai, et pendant toute la durée de l'essai. Cette teneur en oxygène dissous est maintenue par une aération modérée à l'aide d'air comprimé filtré et exempt d'huile. Il convient que le débit d'aération ne provoque pas de mise en suspension du sédiment (par exemple 2 à 3 bulles/s).

## 6.4 Alimentation des organismes

Il existe deux options pour l'apport de nourriture lors de l'essai sur *Hyaella*. Un aliment pour poissons du commerce et un mélange de levure, de Cerophyll™<sup>1)</sup> et de granulés pour truites (LCT) se sont avérés être adéquats pour *Hyaella azteca* dans les conditions d'essai définies<sup>[1],[2],[3],[10],[11],[12]</sup>.

Il existe également deux options pour la fréquence d'apport de nourriture. Les organismes d'essai sont alimentés soit une fois par jour, soit trois fois par semaine (jours non consécutifs) pendant toute la durée de l'essai. Une ration alimentaire identique est ajoutée à chaque récipient d'essai lors de chaque apport de nourriture<sup>[11]</sup>. La ration fournie doit être adéquate pour permettre une survie et une croissance acceptables de *H. azteca* pendant la période d'essai, mais elle ne doit en aucun cas être excessive.

### 6.4.1 Option 1: Nourriture pour poissons

De la nourriture pour poissons du commerce, sous forme de flocons, (par exemple Tetrafin™, Tetramin™, ou Nutrafin™<sup>2)</sup>) peut être utilisée comme une source d'alimentation pour les organismes pendant toute la durée de l'essai. La nourriture peut être broyée et passée au tamis afin d'obtenir des flocons de taille homogène ou de pouvoir préparer une bouillie en mélangeant les flocons pour poissons avec de l'eau de bonne qualité. Il convient de conserver la nourriture pour poissons, sous forme de flocons, à température ambiante dans un récipient hermétique.

Si l'apport journalier de nourriture est l'option choisie, 2,7 mg de flocons pour poissons (poids sec) sont ajoutés à chaque récipient d'essai, le premier jour de l'essai (le jour où les amphipodes sont placés dans les récipients d'essai) et ensuite une fois par jour, jusqu'à la fin de l'essai. Si l'apport de nourriture trois fois par semaine est l'option choisie, 6,3 mg de flocons pour poissons (poids sec) sont ajoutés, trois fois par semaine (en commençant le premier jour de l'essai), à chaque récipient d'essai, selon des jours non consécutifs (par exemple, les lundis, les mercredis et les vendredis), jusqu'au jour où l'essai prend fin. Les deux rations fournissent approximativement le même taux d'alimentation; cependant, l'apport quotidien de nourriture peut être une option préférentielle car la nourriture est disponible en permanence<sup>[6]</sup>.

ISO 16303:2013

### 6.4.2 Option 2: Mélange de levure/Cerophyll™<sup>3)</sup> / Nourriture pour truite (LCT)

Une seconde combinaison d'aliments fondée sur les méthodes d'essai préconisées par l'USEPA et Environnement Canada<sup>[1],[2]</sup> est également recommandée.

La formule de préparation du mélange LCT est donnée dans l'[Annexe D](#). Si un apport quotidien de nourriture est choisi, un volume de 1,5 ml (équivalent à 2,7 mg de nourriture, poids sec) d'un mélange de levure, de Cerophyll™<sup>3)</sup> et de nourriture pour truite, est ajouté quotidiennement à chaque récipient d'essai en commençant le premier jour de l'essai (c'est-à-dire le jour où les amphipodes sont placés dans les récipients d'essai), et ensuite une fois par jour, jusqu'au jour où l'essai prend fin. Si l'apport de nourriture trois fois par semaine est l'option choisie, un volume de 3,5 ml de mélange LCT (équivalent à environ 6,3 mg de nourriture, poids sec) est ajouté trois fois par semaine (en commençant le premier jour de l'essai), à chaque enceinte d'essai, selon des jours non consécutifs (par exemple, les lundis, les mercredis et les vendredis), jusqu'au jour où l'essai prend fin. Les deux rations fournissent approximativement le même taux d'alimentation; cependant, l'apport quotidien de nourriture peut être une option préférentielle car la nourriture est disponible en permanence.

Le mélange LCT peut être congelé. Des aliquotes décongelées de mélange LCT non utilisées peuvent être conservées à l'obscurité à (4 ± 3) °C, mais elles doivent être éliminées au bout de 14 jours.

1) Il est possible de se procurer du Cerophyll™ chez Ward's Scientific sous la désignation « Cereal Grass Media – Cerophyll ». Cette information est donnée à titre pratique aux utilisateurs du présent document et ne signifie nullement l'approbation de ce produit par l'ISO.

2) Tetrafin™, Tetramin™ et Nutrafin™ sont des exemples de flocons pour poissons disponibles dans le commerce. Ces informations sont données à titre pratique aux utilisateurs du présent document et ne signifient nullement l'approbation de ces produits par l'ISO.

3) Il est possible de se procurer du Cerophyll™ auprès de Ward's Scientific sous la désignation «Cereal Grass Media – Cerophyll». Cette information est donnée à titre pratique aux utilisateurs du présent document et ne signifie nullement l'approbation de ce produit par l'ISO.