
**Qualité de l'eau — Essai aux premiers
stades de la vie de copépodes
calanoïdes avec *Acartia tonsia***

*Water quality — Calanoid copepod early-life stage test
with Acartia tonsa*

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

[ISO 16778:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c-23b9ddccaa6f/iso-16778-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c-23b9ddccaa6f/iso-16778-2015>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16778:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c-23b9ddccaa6f/iso-16778-2015>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015

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
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Appareillage	2
6 Réactifs	3
6.1 Eau.....	3
6.2 Milieux de culture et d'essai.....	3
6.3 Eau de dilution.....	3
7 Organisme pour essai	3
8 Mode opératoire	4
8.1 Préparation du milieu de culture.....	4
8.2 Choix des concentrations d'essai.....	4
8.3 Préparation de la solution mère des substances d'essai.....	4
8.4 Préparation des solutions d'essai.....	5
8.5 Incubation/Exposition.....	5
8.5.1 Organismes pour essai et charge.....	5
8.5.2 Témoin d'éclosion.....	6
8.5.3 Taux de développement larvaire (développement des premiers stades de la vie).....	6
8.5.4 Durée.....	6
8.5.5 Manipulation des récipients d'essai.....	6
8.5.6 Alimentation.....	6
8.5.7 Lumière et température.....	7
8.5.8 Aération.....	7
8.5.9 Eau de dilution, renouvellement ou addition des solutions d'essai.....	7
8.6 Mesurages/observations.....	7
8.6.1 Concentration de la substance d'essai.....	8
8.6.2 Paramètres physico-chimiques.....	8
oxygène, pH, salinité et température.....	8
9 Critères de validité	8
10 Expression des résultats	9
11 Représentation des résultats	9
12 Interprétation des résultats	9
13 Substance de référence	9
14 Rapport d'essai	10
Annexe A (informative) Milieux de culture et d'essai définis	12
Annexe B (informative) Détails spécifiques concernant le renouvellement de la solution d'essai et le régime d'alimentation, et exemple d'organigramme pour un essai de développement larvaire (essai aux premiers stades de la vie) avec <i>Acartia tonsa</i>	14
Annexe C (informative) Échantillonnage en vue des analyses chimiques	18
Annexe D (informative) Solution de Lugol	19
Annexe E (informative) Feuille de collecte de données pour l'essai aux premiers stades de la vie d'<i>Acartia tonsa</i>	20
Annexe F (informative) Calculs	22

Annexe G (informative) Culture d'<i>Acartia tonsa</i>	25
Annexe H (informative) Détails spécifiques concernant les caractéristiques sexuelles secondaires d'<i>Acartia tonsa</i>	31
Annexe I (informative) Précautions de sécurité générales et techniques de manipulation des échantillons environnementaux	33
Bibliographie	39

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16778:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c-23b9ddccaa6f/iso-16778-2015>

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 (IEC) 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/IEC, 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/IEC, Partie 2 (voir 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 dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information 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](http://standards.iteh.ai/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c-23b94dccaaf/iso-16778-2015).

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16778:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c-23b9ddccaa6f/iso-16778-2015>

Qualité de l'eau — Essai aux premiers stades de la vie de copépodes calanoïdes avec *Acartia tonsia*

AVERTISSEMENT — Il convient que les personnes utilisant la présente Norme internationale connaissent bien les pratiques normales 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. L'utilisateur est tenu d'établir des pratiques de sécurité et d'hygiène appropriées et de s'assurer de leur conformité aux réglementations nationales existantes.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément au présent document soient exécutés par un personnel suffisamment formé.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie un mode opératoire d'essai aux premiers stades de la vie pour la détermination, en conditions semi-statiques, des effets toxiques d'un échantillon de substance chimique, d'effluent ou d'eau sur une espèce de copépode d'eaux marines froides et d'eaux saumâtres. Les critères d'effet biologiques incluent la survie et le développement des animaux aux premiers stades de leur vie. L'exposition commence avec les œufs et se poursuit jusqu'à l'émergence des stades juvéniles.

Les copépodes sont des espèces largement répandues dans les écosystèmes marins, saumâtres et d'eau douce. Ils constituent des proies importantes pour les larves de nombreuses espèces de poissons et de grands invertébrés et sont de plus en plus utilisés comme source d'alimentation vivante en aquaculture. Se nourrissant de phytoplancton, ils représentent un maillon écologique important en ce qui concerne le transfert d'énergie entre les producteurs primaires et les niveaux trophiques supérieurs.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c-23b9ddccaa6f/iso-16778-2015>

2 Références normatives

Aucune référence normative n'est citée dans le présent document.

3 Termes et définitions

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

3.1

CE

concentration avec effet

3.2

CE_x

concentration calculée pour laquelle un effet de x % est prévu

3.3

taux de développement larvaire

LDR

fraction des animaux ayant atteint un stade copépodide par rapport au nombre total de nauplies et copépodites survivants dans une période de temps donnée (5 j à 6 j)

3.4

concentration minimale avec effet observé

CMEO

plus faible concentration de la plage expérimentale à laquelle un effet significatif est observé

3.5
concentration sans effet observé
CSEO

concentration d'essai juste en dessous de la CMEO

[SOURCE: ISO/TS 20281:2006, 3.18]

3.6
intervalles de confiance de x %

intervalle de valeurs dans lequel la probabilité de trouver la valeur mesurée ou calculée est de x %

3.7
eau de dilution

eau ayant des propriétés définies (par exemple, salinité) ou eau de mer naturelle utilisée pour la dilution échelonnée de l'échantillon d'essai ou comme témoin

4 Principe

L'essai est un essai aux premiers stades de la vie, où les organismes sont exposés à différentes concentrations d'une substance chimique, d'effluent ou d'eau, du stade d'œufs aux stades juvéniles. La survie et le développement des premiers stades de la vie [taux de développement larvaire (LDR)] dépendent des paramètres étudiés. La durée totale de l'essai est de 5 jours à 6 jours environ, ce qui donne suffisamment de temps pour étudier le développement des stades naupliens aux stades copépodites.

Les stades naupliens (larves) et copépodites (juvéniles) présentent des morphologies distinctes; par conséquent, il est aisé d'observer la transition du dernier stade nauplien au premier stade copépodite. Le taux de développement larvaire (LDR) est enregistré au bout de 5 jours à 6 jours, lorsque 60 % environ des animaux témoins ont atteint un stade copépodite. Il est exprimé comme étant le rapport des copépodites au nombre total de survivants aux premiers stades de la vie (nauplies + copépodites) à la fin de l'essai de développement larvaire. Il convient de mentionner, avec le LDR, les éclosions réussies et la mortalité aux premiers stades de la vie.

L'essai donne pour résultat soit les valeurs de la concentration sans effet observé et de la concentration minimale avec effet observé (CSEO-CMEO), soit les concentrations d'effet donnant lieu à un certain degré (x %) d'inhibition (CE_x) (par exemple, CE₅₀ et CE₁₀).

5 Appareillage

Il convient que les récipients d'essai et autres matériels destinés à entrer en contact avec l'eau de dilution et les solutions d'essai soient entièrement fabriqués en verre ou autres matériaux chimiquement inertes vis-à-vis de la substance chimique d'essai.

5.1 Appareillage courant de laboratoire, par exemple pour le mesurage du pH, de la concentration en oxygène dissous, de la salinité et de la température.

5.2 Fioles en verre, d'une capacité de 1 l, 2 l et 5 l.

5.3 Pompes à air.

5.4 Filtres à air, porosité de 0,2 µm.

5.5 Pompe péristaltique pour l'alimentation.

5.6 Armoire ou pièce à température contrôlée.

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

5.8 Appareillage pour filtration sur membrane.

5.9 Filtres, 0,2 µm (6.2) et, à la fin, filtres quadrillés (8.5.1).

5.10 Filets, ouverture de maille 50 µm et 180 µm à 200 µm, pour l'isolation des œufs, la capture et le transfert des animaux; servent de filtres lorsque le milieu est changé.

5.11 Dispositif approprié pour régler le régime d'éclairage.

6 Réactifs

6.1 Eau

L'eau utilisée pour préparer le milieu de culture doit toujours être de l'eau de mer naturelle propre ou de l'eau déionisée, ou une eau de pureté équivalente. Prendre particulièrement soin d'éviter la contamination de l'eau par des substances inorganiques ou organiques pendant la préparation et le stockage.

Aucun matériel en cuivre ne doit être utilisé.

6.2 Milieux de culture et d'essai

Les milieux de culture et d'essai sont préparés soit à partir d'eau de mer synthétique, soit à partir d'eau de mer naturelle filtrée (0,2 µm) provenant d'un site non pollué. Un exemple d'eau de mer synthétique appropriée pour la culture et les essais est donné à l'[Annexe A](#). Des milieux constitués d'eau de mer synthétique de composition connue, se prêtant à la survie à long terme des copépodes et où ces derniers se comportent, se développent et se reproduisent normalement, peuvent servir de milieux de culture et d'essai, c'est-à-dire d'eau de dilution.

6.3 Eau de dilution

Il convient que l'eau de dilution ait une salinité identique à celle du milieu de culture (voir [Annexe A](#)). Avant d'être utilisée pour préparer les solutions d'essai, l'eau de dilution doit avoir une concentration en oxygène dissous supérieure à 70 % de la valeur de saturation dans l'air et un pH de $8,0 \pm 0,3$. Si un changement notable du pH à la concentration d'essai la plus élevée est mis en évidence, il est conseillé d'ajuster le pH de la solution mère/l'échantillon environnemental au pH de l'eau de dilution avant de préparer la série de dilutions. L'ajustement du pH de la solution mère ou des concentrations d'essai ne doit pas induire de changement significatif de la concentration; il ne doit pas non plus entraîner une réaction chimique ou la précipitation de la substance d'essai. HCl et NaOH sont utilisés de préférence pour ajuster le pH.

Si, par rapport à une culture de routine, les conditions physiques sont telles que la température de l'eau de mer devant servir pour l'essai diffère de plus de 5 °C, ou si la salinité diffère de plus de 10 ‰, une bonne pratique consiste à faire précéder l'essai d'une période adéquate d'acclimatation dans les mêmes conditions de température (20 ± 1) °C et de salinité (20 ± 2) ‰, d'une durée de 2 semaines à 3 semaines, pour éviter de stresser les œufs et les animaux. L'utilisation d'une autre température ou d'une autre salinité pouvant mieux convenir en présence d'eau océanique ou d'eau saumâtre doit être justifiée dans le rapport d'essai.

7 Organisme pour essai

L'espèce à utiliser est le copépode calanoïde marin *Acartia tonsa* Dana (voir [Annexe G](#) et [Annexe H](#)).

Il convient que les œufs utilisés durant l'essai proviennent d'une culture saine (c'est-à-dire une culture ne présentant aucun signe de stress tel qu'une mortalité élevée, une fécondité médiocre, etc.). Les animaux de réserve doivent être maintenus dans des conditions de culture (lumière, température, milieu et alimentation) similaires aux conditions de l'essai (une méthode de mise en culture d'*A. tonsa* est décrite à l'[Annexe G](#)).

8 Mode opératoire

8.1 Préparation du milieu de culture

Il est possible d'utiliser de l'eau de mer naturelle ou un milieu synthétique. Un milieu de culture synthétique approprié est décrit à l'[Annexe A](#). Toutefois, il est possible d'utiliser d'autres milieux synthétiques à condition que les critères de validité de l'essai soient respectés (voir [Article 9](#)). Le milieu défini décrit à l'[Annexe A](#) contient un chélateur; il peut donc ne pas convenir aux essais sur des échantillons contenant des métaux. La salinité peut être modifiée en choisissant une quantité voulue de la solution à 10 ‰ de salinité. La salinité des échantillons d'eau de mer naturelle et des échantillons environnementaux peut être augmentée en utilisant la même solution à 10 ‰ de salinité ([Tableau A.1](#)) ou diminuée en ajoutant un volume approprié de M7 (voir Référence [1] et [Annexe A](#)) ou d'eau déionisée.

8.2 Choix des concentrations d'essai

Il convient de s'appuyer sur une connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai (par exemple à partir d'un essai de toxicité aiguë^[1] ou d'études préliminaires) pour sélectionner des concentrations d'essai appropriées. L'expérience montre qu'il convient de choisir la concentration maximale de l'essai aux premiers stades de la vie dans l'intervalle compris entre la CL₁₀ et la CL₂₀ de l'essai de toxicité aiguë en 48 h, ceci afin d'éviter un effet significatif sur la survie.

Il convient de soumettre à essai au moins cinq concentrations différentes en progression géométrique de raison inférieure ou égale à 3,2. Si l'on utilise moins de cinq concentrations, il convient d'en apporter la justification. Il convient que les substances ne soient pas soumises à essai au-dessus de leurs limites de solubilité dans l'eau de dilution. L'essai doit inclure une eau de dilution témoin. Si un solvant est utilisé, il doit inclure également un témoin contenant un solvant ([8.3](#)) en concentration identique à celle de la série d'essai.

S'il y a matière à supposer qu'une concentration élevée d'une substance chimique ou qu'un échantillon environnemental à concentration élevée (par exemple, à 10 mg/l ou 100 ml/l) sera peu ou pas du tout toxique, l'essai aux premiers stades de la vie peut être réalisé en tant qu'essai limite, mettant en œuvre une concentration d'essai de 10 mg/l (ou 100 ml d'échantillon/l), par exemple, et le témoin. Il convient d'utiliser le nombre habituel de réplicats pour le groupe de traitement et pour le groupe témoin. Un essai limite peut montrer l'absence d'effet statistiquement significatif à la concentration limite, comparé aux témoins. Toutefois, si des effets significatifs sont enregistrés, un essai complet est normalement requis.

8.3 Préparation de la solution mère des substances d'essai

Les solutions d'essai sont habituellement préparées par dilution d'une solution mère d'une substance chimique d'essai ou d'un échantillon environnemental avec l'eau de dilution. Les solutions mères de substances chimiques doivent être préparées par dissolution de la substance dans l'eau de dilution. Les options préférées de préparation des solutions d'essai sont des méthodes physiques, telles que l'agitation et la sonication^{[2][3]}. Des colonnes de saturation (colonnes de solubilité) peuvent être utilisées pour obtenir une solution mère de concentration appropriée.

L'utilisation de solvants organiques peut s'avérer nécessaire dans certains cas pour produire une solution mère de concentration appropriée; il convient toutefois d'éviter, autant que faire se peut, l'utilisation de ces solvants porteurs. L'unique solvant recommandé pour cet essai est l'acétone. L'acétone doit être utilisée pour produire une solution mère pouvant être dosée avec précision dans l'eau. La concentration maximale d'acétone recommandée dans l'eau de dilution et les solutions d'essai est de 0,01 ml/l. La concentration doit être identique dans tous les récipients d'essai. Si un autre solvant est utilisé ou

si la concentration en acétone est plus élevée, l'absence d'effets doit être démontrée et documentée. L'acétone n'est pas toxique à la concentration de 0,01 ml/l et n'augmente pas la solubilité d'une substance dans l'eau. L'acétone peut s'avérer essentielle pour manipuler certaines substances; par exemple, pour préparer des solutions mères de substances présentant une instabilité hydrolitique ou de substances à haute viscosité.^[4]

8.4 Préparation des solutions d'essai

Dans l'essai de développement larvaire, il convient que le témoin comprenne au moins 10¹) répliqués témoins, et davantage de préférence, et au minimum 6 répliqués de chaque concentration d'essai. Le besoin en répliqués est plus important si la méthode statistique de l'ANOVA est utilisée, tandis que la technique de l'analyse de régression requiert généralement plus de concentrations.

Le nombre de répliqués dépend du critère d'effet statistique (ANOVA ou CEx). Lors de la planification de l'essai, il convient d'apprécier si l'objectif est d'obtenir une valeur de la CSEO/CMEO (par la méthode de l'ANOVA) ou une valeur de la CEx (par une technique de régression).

Pour l'utilisation de la technique de l'ANOVA ou d'une analyse de régression, voir Référence [5].

En définissant la gamme de concentrations, il convient de garder à l'esprit les points suivants:

Si l'objectif est d'obtenir la CSEO, la concentration d'essai minimale doit être suffisamment faible pour que le critère d'effet biologique à cette concentration ne diffère pas de manière significative de celui du témoin. Dans le cas contraire, l'essai devra être répété avec une concentration minimale réduite. Si l'objectif est d'obtenir la CSEO, la concentration d'essai maximale doit être suffisamment élevée pour induire un effet statistiquement significatif sur le critère d'effet biologique, comparé au témoin. Dans le cas contraire, l'essai devra être répété avec une concentration maximale augmentée.

S'il s'agit d'estimer la CEx ayant des effets sur le développement, les conditions optimales sont les suivantes: la concentration minimale est sans effet (idéalement, la seule sans effet), la concentration maximale est supérieure à la CE₅₀ et des concentrations suffisantes sont utilisées pour définir la CEx avec le niveau de confiance approprié. Si la concentration maximale est inférieure à la CE₅₀, il est recommandé de rapporter également les valeurs de la CE₁₀ et/ou de la CSEO/CMEO.

Il convient de préférence qu'aucune concentration ayant un effet significatif sur la survie ne soit incluse dans la gamme de concentrations d'essai puisque l'objet principal de l'essai est la mesure des effets sublétaux (par exemple, développement).

8.5 Incubation/Exposition

Un calendrier recommandé pour un essai aux premiers stades de la vie est donné à l'[Annexe B](#).

8.5.1 Organismes pour essai et charge

Il est préférable d'utiliser des œufs frais issus de la culture mère de copépodes, mais des œufs conservés au maximum une semaine à 4 °C peuvent être utilisés (voir [Tableau B.1](#)). 60 œufs à 90 œufs sont comptés au moyen d'un stéréomicroscope et ajoutés à la solution d'essai dans chaque récipient d'essai. Les œufs doivent faire l'objet d'un comptage individuel sur un filtre quadrillé ou dans une goutte d'eau (les filtres et les gouttes d'eau peuvent être placés dans une boîte de Petri graduée); après le comptage, ils doivent être transvasés dans le récipient d'essai (voir [Tableau B.1](#)).

Les nauplies récemment écloses présentes au comptage peuvent être écrasées au moyen d'une aiguille de préparation pendant le comptage; si elles sont ajoutées avec les œufs, les nauplies doivent être comptées également. Le nombre de nauplies récemment écloses ne doit pas dépasser 5 % du nombre d'œufs ajoutés.

1) Il est conseillé de démarrer avec au moins 12 répliqués témoins car certains d'entre eux vont probablement servir au contrôle du développement à un stade où le LDR est inférieur au critère des (60 ± 20) % pour la fraction de copépodites. Pour déterminer le meilleur moment d'arrêter l'essai de développement larvaire 1 ou 2, des témoins sont prélevés et comptés à intervalles réguliers lorsqu'on estime que le LDR s'approche de 60 %.

Une feuille de collecte des données appropriée pour la tenue des données enregistrées figure à l'[Annexe E](#).

8.5.2 Témoin d'éclosion

Un témoin supplémentaire pour l'éclosion peut être prévu en complément des récipients témoins de l'essai de développement larvaire. Quatre réplicats constitués de 40 ml à 80 ml d'eau de dilution (même volume que dans les réplicats d'essai – voir [8.5.3](#)) contenant 60 œufs à 90 œufs sont démarrés en même temps que l'essai de développement larvaire, avec des œufs issus du même lot (voir [Tableau B.1](#)). Ce témoin d'éclosion ne servira que deux jours ou trois jours, au terme desquels le nombre de larves et d'œufs non éclos sera compté pour contrôler le pourcentage d'éclosion.

8.5.3 Taux de développement larvaire (développement des premiers stades de la vie)

Pour chaque réplikat, les oeufs (60 à 90) sont exposés dans un récipient contenant un volume identique de la solution d'essai (40 ml à 80 ml). Le nombre exact d'œufs (et de nauplies récemment écloses) est enregistré. Les solutions d'essai sont renouvelées au jour 2 ou au jour 3, ou le volume est augmenté par addition de solution d'essai fraîche en suivant le principe de la Note de bas de page 3 (voir également [Annexe B, Tableau B.1](#)). Le taux de développement larvaire observé est normalement enregistré au bout de 5 jours à 6 jours, lorsque 60 % environ des animaux témoins ont atteint un stade copépodite. Il est exprimé comme étant le rapport des copépodites au nombre total (somme) de larves (nauplies) et de juvéniles (copépodites) vivants à ce moment de l'essai. Les animaux qui meurent au cours de l'essai disparaissent rapidement et tous les animaux comptés à la fin de l'essai sont supposés être vivants lorsque la solution de Lugol est ajoutée (voir [8.6](#) et [Annexe D](#)). Il convient de préparer des réplicats supplémentaires des témoins afin de saisir le meilleur moment pour arrêter l'essai au plus près du ratio de 60 % de copépodites (voir Note de bas de page 1). Il convient d'indiquer la mortalité (animaux morts et manquants durant l'essai) en même temps que le taux de développement larvaire (voir [Annexe F](#) pour des exemples de calcul).

8.5.4 Durée

ISO 16778:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c->

La durée totale (à 20 °C et avec une salinité de 20 ‰) de l'essai de développement larvaire est de 5 jours à 6 jours. À des températures plus basses ou avec des salinités plus élevées, le développement peut être plus lent, de sorte qu'un essai réalisé dans ces conditions peut durer plus longtemps. Voir, par exemple, la Référence [6] qui présente une étude du laps de temps écoulé avant que 50 % des animaux aux premiers stades de la vie atteignent un stade copépodite pour différents régimes de température et de salinité.

8.5.5 Manipulation des récipients d'essai

Il convient que la manipulation des récipients d'essai soit aléatoire, sous peine de créer un biais qui pourrait être pris pour un effet de la concentration. En particulier, si les unités expérimentales sont manipulées dans l'ordre de traitement ou l'ordre de concentration, certains effets liés au temps, tels que la fatigue ou toute autre erreur de l'opérateur, pourraient entraîner des effets plus importants aux concentrations plus élevées. Il convient de faire attention à ce que les conditions environnementales, telles que l'emplacement dans le laboratoire, soient uniformes pour tous les récipients d'essai, indépendamment de leur position physique dans le dispositif d'essai. Il est également important de souligner que tous les réplicats se voient allouer un temps de développement identique.

8.5.6 Alimentation

Il convient d'ajouter 5.0×10^4 cellules de *Rhodomonas salina* par millilitre au début de l'essai, ainsi qu'au moment des renouvellements du milieu ou lors de l'addition de solution d'essai fraîche (voir [8.5.9](#) et [Tableau B.1](#)). Il convient de consigner tout écart par écrit. Lorsque de petits volumes de la solution d'essai sont utilisés dans les essais semi-statiques, il est important de considérer le volume de nourriture distribué et la dilution de la concentration d'exposition. Il convient que le volume de nourriture apporté représente au maximum 1 % du volume total. Des détails spécifiques des régimes d'alimentation sont donnés au [Tableau B.1](#).

8.5.7 Lumière et température

Des détails spécifiques des régimes de lumière et de température à mettre en œuvre sont décrits à l'[Annexe G](#). Un cycle jour/nuit de 16 h de lumière suivies de 8 h d'obscurité est recommandé, à faible intensité lumineuse (5 μmol à 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). La température utilisée doit être de (20 ± 1) °C pendant toute la durée de la période d'exposition.

8.5.8 Aération

Si une aération est nécessaire pour maintenir la concentration en oxygène dissous (OD) supérieure à 70 % de la valeur de saturation dans l'air (VSA) (voir [Article 9](#)), il convient que l'aération des récipients d'essai soit aussi réduite que possible afin d'éviter l'évaporation de l'eau et l'extraction des substances chimiques d'essai.

8.5.9 Eau de dilution, renouvellement ou addition des solutions d'essai

La fréquence de renouvellement partiel ou d'addition des solutions d'essai dépend de la stabilité de la substance d'essai, mais il convient qu'elle soit d'au moins une fois pour un essai durant de 5 jours à 6 jours et d'au moins une fois tous les 2 jours à 3 jours si l'essai dure plus longtemps. Si des essais de stabilité préliminaires ou les propriétés physico-chimiques de la substance d'essai laissent à penser que la concentration n'est pas stable (c'est-à-dire en dehors de la gamme des 80 % à 120 % de la concentration nominale ou inférieure à 80 % de la concentration initiale mesurée) sur la période de renouvellement maximale (c'est-à-dire 2 jours à 3 jours), il convient d'envisager des renouvellements plus fréquents des solutions d'essai. Des données montrant que la concentration de la substance d'essai a été maintenue de manière satisfaisante doivent être fournies (voir [8.6](#)).

Le renouvellement de la solution d'essai s'effectue de différentes manières:

- une partie (50 % à 80 %) de l'ancienne solution d'essai peut être remplacée par de la solution d'essai fraîche²⁾; <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/322dac22-589d-45a4-983c->
- le volume peut être augmenté progressivement par addition de solution d'essai fraîche³⁾.

Une autre méthode pourrait consister à préparer une série de récipients d'essai contenant une solution d'essai fraîche et à transférer les animaux dans ces récipients en disposant, par exemple, d'une chambre intérieure dont le fond est garni d'un filet fin présentant une ouverture de mailles appropriée.

8.6 Mesurages/observations

Dans l'essai de développement larvaire, les nombres d'œufs non éclos, de nauplies (larves) et de copépodites (juvéniles) doivent être enregistrés à la fin de la période d'exposition. Les animaux et les œufs non éclos sont fixés dans une solution de Lugol et étudiés (comptés, mesurés, etc.). Étant donné que la solution de Lugol peut également oxyder la substance chimique d'essai, des échantillons destinés à l'analyse chimique doivent être prélevés avant d'ajouter la solution de Lugol, de préférence sur des récipients séparés préparés exclusivement à cet effet ([Annexe D](#)). La coloration (de tous les animaux, ainsi que leur mort) dans la solution de Lugol (voir [Annexe D](#)) facilite le comptage des animaux et des œufs non éclos. Le comptage des différents stades de développement d'*A. tonsa* doit être facilité au moyen d'un stéréomicroscope.

Il convient d'enregistrer sur des feuilles de collecte de données les observations réalisées durant l'essai. Des exemples sont fournis à l'[Annexe E](#).

2) La solution d'essai peut être prélevée au moyen d'un siphon muni d'un filet d'une ouverture de maille appropriée pour éviter que des animaux ou des œufs soient retirés du récipient d'essai.

3) L'ajout de solution d'essai fraîche peut s'effectuer en augmentant progressivement le volume dans les récipients d'essai, de 40 ml (par exemple) au début à 80 ml au jour 2 ou au jour 3.