
**Qualité de l'eau — Détermination de
la toxicité d'échantillons aqueux sur
le développement embryo-larvaire de
l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et
de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus
galloprovincialis*)**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Water quality — Determination of the toxicity of water samples on
the embryo-larval development of Japanese oyster (*Crassostrea
gigas*) and mussel (*Mytilus edulis* or *Mytilus galloprovincialis*)*

ISO 17244:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44dfc51a-bfa0-4cf2-8757-85b93594721d/iso-17244-2015>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17244:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44dfc51a-bfa0-4cf2-8757-85b93594721d/iso-17244-2015>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2015, Publié en Suisse

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
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Organismes d'essai et eau de mer	2
5.1 Géniteurs ou bivalves matures.....	2
5.2 Eau de mer de référence.....	3
5.2.1 Eau de mer naturelle.....	3
5.2.2 Eau de mer artificielle.....	3
5.2.3 Saumure hyper saline (HSB).....	4
6 Matériel	4
7 Substance de référence	5
8 Mode opératoire d'essai	5
8.1 Prélèvement, préparation et conservation des échantillons aqueux.....	5
8.2 Préparation des échantillons pour essai.....	6
8.2.1 Substances chimiques.....	6
8.2.2 Échantillons aqueux.....	6
8.3 Choix de la gamme de concentration/dilution.....	6
8.4 Obtention de gamètes.....	6
8.4.1 Généralités.....	6
8.4.2 Stimulation thermique.....	7
8.4.3 Stripping des gamètes.....	8
8.5 Mesurage de la densité des œufs.....	9
8.6 Fécondation et ensemencement des œufs fécondés.....	9
8.7 Incubation.....	10
8.8 Observation.....	10
8.9 Mesurages analytiques.....	10
9 Expression des résultats	10
10 Critères de validité	12
11 Rapport d'essai	12
Annexe A (informative) Vue d'ensemble de l'essai appliqué à l'huître creuse <i>Crassostrea gigas</i>	14
Annexe B (informative) Données de performance	15
Bibliographie	22

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (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 de 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/patents).

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, et pour toute autre 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](#)

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

Le niveau de contamination du milieu marin est traditionnellement présenté en termes de concentrations des contaminants présents dans le milieu. Cependant, ces mesures ne donnent pas une estimation des effets néfastes sur les organismes et doivent être complétées par les réponses biologiques obtenues au moyen de bio-essais (voir la Référence [5]).

Parmi les organismes marins utilisés pour évaluer l'impact potentiel des substances ou rejets arrivant dans l'environnement, les embryons et larves de bivalves sont, avec les oursins, parmi les organismes les plus fréquemment employés dans les bio-essais, depuis les premiers travaux de Lillies (1921) (voir la Référence [18]) sur l'oursin *Arbacia* et de Prytherch (1924) (voir la Référence [21]) sur l'huître *Crassostrea virginica*. Les embryons et les larves sont moins tolérants aux polluants que les adultes des mêmes espèces. Ils représentent donc les stades critiques pour les essais de toxicité (voir les Références [19] et [30]). Dès 1972, Woelke (voir la Référence [35]) préconise l'utilisation de l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, pour l'évaluation de la qualité de l'eau de mer. De plus, leur répartition dans les franges d'eaux côtières ainsi que leur importance commerciale (voir la Référence [10]), font des bivalves des espèces de choix pour la réalisation de bio-essais.

Les résultats de ces bio-essais permettent de déterminer les seuils de toxicité potentielle des substances chimiques susceptibles d'arriver dans le milieu marin, de manière accidentelle ou chronique, ainsi que la «qualité biologique» d'un milieu ou la toxicité potentielle d'une eau de rivière ou d'un rejet arrivant en mer. Quiniou *et al.* (1993, 1997) (voir les Références [27] et [26]) et His *et al.* (1999) (voir la Référence [11]) définissent la toxicité potentielle à partir des effets tératologiques.

La présente Norme internationale spécifie une méthode basée sur le développement embryo-larvaire de bivalves (huître creuse ou moule); elle est utilisable en routine pour l'évaluation des anomalies de développement dues à la présence éventuelle de substances chimiques et de mélanges présents dans l'eau de mer. Elle permet également d'évaluer la toxicité d'échantillons aqueux tels que les eaux marines, les eaux de surface, les effluents (urbains, agricoles, industriels, etc.), les extraits aqueux de sédiments et les produits pétroliers susceptibles d'être relargués dans la colonne d'eau lors de remise en suspension ou de leur déversement et séjour en mer.

Cet essai est réalisable durant toute l'année, en utilisant des bivalves matures prélevés dans le milieu naturel pendant leurs périodes de reproduction ou des bivalves matures provenant d'écloserie où ils ont été conditionnés.

Cet essai de toxicité, préconisé par le Conseil International pour l'Exploration de la Mer (CIEM), (voir la Référence [14]), a fait l'objet du premier essai d'intercalibration européen dès 1991 (voir la Référence [31]). Le protocole décrit dans la présente Norme internationale correspond à une modification et simplification de la méthode normalisée proposée par l'ASTM (1994) (voir la Référence [3]).

L'évaluation de la toxicité de métaux sur *C. gigas* et *Mytilus edulis* a permis de conclure à une sensibilité similaire des deux organismes (voir les Références [19] et [15]). Deux autres études effectuées sur des effluents urbains ont mis en évidence des réponses similaires pour les deux espèces (voir les Références [16] et [28]). Ces observations sont confirmées par les travaux réalisés sur le mercure par Beiras et His (1994) (voir la Référence [4]), qui ont comparé les résultats de quatre essais embryo-larvaires: *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *C. gigas* et *C. virginica*. Les embryons de *C. gigas* se révèlent plus sensibles aux métaux et aux hydrocarbures que les autres organismes marins couramment utilisés, par exemple les polychètes, les amphipodes, les poissons et les crustacés (voir la Référence [8]).

La sensibilité de la phase embryo-larvaire des bivalves souligne l'adéquation de cet essai pour l'évaluation de la toxicité de substances chimiques et d'échantillons aqueux. Les gammes de pH, de salinité et de température tolérées par les bivalves permettent leur emploi aisé dans les études d'écotoxicité, en particulier pour l'évaluation de la qualité des milieux côtiers et estuariens (voir la Référence [11]).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 17244:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44dfc51a-bfa0-4cf2-8757-85b93594721d/iso-17244-2015>

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité d'échantillons aqueux sur le développement embryolaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) et de la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*)

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 de tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme 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 indispensable que les essais menés selon la présente Norme internationale soient effectués par un personnel adéquatement qualifié.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de détermination des effets de substances chimiques et d'échantillons aqueux sur le développement embryolaire de bivalves marins. Elle permet de déterminer les concentrations induisant une anomalie du développement embryolaire. Cet essai convient pour des gammes de salinité allant de 20 à 40 pour les moules et de 25 à 35 pour les huîtres. Cette méthode est applicable:

- aux substances et préparations chimiques,
- aux eaux marines et estuariennes, [ISO 17244:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/44dfc51a-bfa0-4cf2-8757-85b93594771d/iso-17244-2015)
- aux cours d'eau et aux effluents aqueux (urbains, agricoles, industriels, etc.) sous réserve d'ajuster la salinité et/ou de limiter la dilution afin de respecter les gammes de salinité définies ci-dessus, et
- aux extraits aqueux (eau interstitielle, éluviats, éluats et lixiviats) de sédiments et de produits pétroliers.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*

ISO 14442, *Qualité de l'eau — Lignes directrices pour essais d'inhibition de la croissance algale avec matières peu solubles, composés volatils, métaux et eaux résiduaires*

3 Termes et définitions

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

3.1

CE_x

concentration (d'une substance) ou dilution (d'un échantillon aqueux, en %) calculée, pour laquelle un effet de *x* % est prévu par rapport au contrôle

3.2
concentration minimale avec effet observé
CMEO

concentration minimale de l'échantillon soumis à essai pour laquelle un effet statistiquement significatif est observé

3.3
concentration sans effet observé
CSEO

concentration soumise à essai juste en-dessous de la CMEO

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

3.4
eau de mer de référence

eau de mer naturelle ou eau de mer artificielle utilisée pour l'obtention des gamètes et la préparation des solutions d'essai

3.5
stade larve D

stade larvaire appelé ainsi en raison de la forme D caractéristique des larves observées au microscope

Note 1 à l'article: Les larves D normales obtenues après incubation possèdent une coquille avec charnière rectiligne aux valves symétriques. La taille des larves est régulière (environ 70 µm). Après fixation, le manteau remplit pratiquement l'intérieur des larves mais est totalement inclus dans les deux valves fermées.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4 Principe

Ce bio-essai évalue les effets de substances chimiques et d'échantillons aqueux environnementaux sur le développement embryon-larvaire de bivalves marins en conditions statiques.

L'exposition porte sur la période allant de l'œuf fécondé au stade larve D. Cet essai statique vise à déterminer la concentration (CE_x) qui induit des anomalies chez x % de larves exposées, en 24 h pour l'huître creuse, également appelée huître du Pacifique (*Crassostrea gigas*) et en 48 h pour la moule (*Mytilus edulis* ou *Mytilus galloprovincialis*). Plusieurs paramètres peuvent être évalués sur des larves anormales: altération de la coquille (charnière non rectiligne, valves inégales ou incomplètes), hypertrophie du manteau, retard ou blocage du développement embryonnaire et, pour finir, mort. Les résultats sont exprimés sous forme CE_x (CE_{20} ou CE_{50}). La Concentration Minimale avec Effet Observé (CMEO) et la Concentration Sans Effet Observé (CSEO) peuvent aussi être déterminées.

NOTE Cette méthode peut être appliquée à d'autres espèces de bivalves (par exemple, *C. virginica*). Toutefois, les conditions d'essai doivent être définies pour remplir les critères de validité de la norme.

5 Organismes d'essai et eau de mer

5.1 Géniteurs ou bivalves matures

Les bivalves matures utilisés pour l'obtention des gamètes peuvent être prélevés dans le milieu naturel, au cours des périodes de reproduction, à condition que soit vérifiée la bonne qualité du milieu de leur zone d'échantillonnage. Les périodes de reproduction sur les côtes européennes et africaines dépendent du milieu. Dans certaines régions, elles peuvent avoir lieu toute l'année.

Il est aussi possible, pour les huîtres, de se procurer des animaux matures auprès des écloséries où ils ont préalablement subi un cycle de conditionnement afin d'être prêts à pondre dès leur arrivée au laboratoire; ceci permet la réalisation d'essais pendant toute l'année.

Dès réception des bivalves par le laboratoire, il est recommandé de les conserver au sec jusqu'au démarrage de l'expérience (par exemple 15 °C) ou dans de l'eau de mer à une température proche de leur température de conditionnement ou d'élevage (par exemple 20 °C pour les huîtres provenant

d'écloseries). S'il s'avère nécessaire de garder les bivalves matures plus de 48 h après l'échantillonnage et/ou l'expédition, il faut les conserver dans de l'eau (voir en 5.2) à la même température que leur lieu d'origine et leur apporter une alimentation riche et appropriée (voir la Référence [9]). Dans ce cas, les géniteurs sont placés dans des bacs (15 animaux pour 30 litres d'eau de mer). L'eau des bacs, aérée en permanence, est maintenue à la température de $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Un tiers du volume doit être quotidiennement éliminé et remplacé par le même volume d'une culture monospécifique de la prasinophycée (*Tetraselmis suecica*) à une concentration moyenne de 1×10^6 cellules par ml ou de la diatomée *Skeletonema costatum* à une concentration moyenne de $2,7 \times 10^6$ cellules par ml.

Il convient que la valeur de pH de l'eau de mer soit comprise entre 7,0 et 8,5 pour les moules et les huîtres.

NOTE D'autres espèces peuvent être utilisées, par exemple, *Phaeodactylum tricornutum*. Toutefois, la concentration appropriée d'algues doit être définie.

5.2 Eau de mer de référence

La réalisation de cet essai nécessite de disposer d'une eau de mer de référence de qualité. Elle sert à la réalisation des témoins et à la préparation des dilutions des échantillons et/ou substances à soumettre à essai. Cette eau de mer peut être une eau de mer naturelle ou une eau de mer artificielle.

5.2.1 Eau de mer naturelle

L'eau de mer naturelle doit permettre un bon développement embryo-larvaire des bivalves et l'obtention d'un taux de larves sans anomalie au stade D d'au moins 80 %. L'essai étant sensible aux concentrations élevées en ammoniac (NH_3), la concentration en ammonium de l'eau de mer utilisée ne doit donc pas dépasser $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ ($= 1,8\text{ mg/l}$).

Dès son prélèvement, il est recommandé de s'assurer que l'eau n'est pas contaminée par des substances connues (rejets, activités anthropiques, etc.). Il convient de la préfiltrer sur une membrane de $1\text{ }\mu\text{m}$ de porosité. Cette eau doit ensuite être utilisée dans les deux semaines suivant son prélèvement, en la conservant dans une enceinte thermostatée entre 5 °C et 15 °C et à l'abri de la lumière. Cette eau de mer ne doit en aucun cas être congelée ou passée à l'autoclave.

Juste avant son emploi, ajuster l'eau de mer si nécessaire, par addition d'eau ultra pure (pour la dilution) ou de saumure hyper saline (voir en 5.2.3), à une salinité adaptée en fonction de l'espèce: de 20 à 40 pour les moules et de 25 à 35 pour les huîtres. La filtrer ensuite sur une membrane de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de porosité. La salinité doit ensuite être vérifiée à l'aide d'une sonde appropriée (voir en 6.6).

L'ajout direct de sels de mer à l'échantillon peut être une source de toxicité et il convient d'éviter cette opération (Référence [17]).

5.2.2 Eau de mer artificielle

De l'eau de mer artificielle, préparée conformément au [Tableau 1](#), peut également être utilisée. La composition de cette eau de mer est similaire à celle indiquée par Zaroogian *et al.* (1969) (voir la Référence [36]) sans EDTA afin de ne pas réduire la biodisponibilité des ions métalliques bivalents, entraînant une diminution de la toxicité apparente de ces ions (voir la Référence [25]). La préparation de l'eau de mer artificielle se fait par ajout de substances chimiques de qualité réactifs pour analyse dans une eau ultra pure (eau distillée ou déminéralisée) dans l'ordre du [Tableau 1](#). Préparer un volume minimal de 5 l d'eau de mer artificielle. Mélanger après chaque ajout de sel pour garantir une bonne dissolution.

Une fois préparée, l'eau de mer artificielle est filtrée comme l'eau de mer naturelle (voir en 5.2.1).

Tableau 1 — Composition de l'eau de mer artificielle pour un litre d'eau ultra pure

Substance chimique	Concentration dans l'eau ultra pure (g/l)
NaF	0,003
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,02
H ₃ BO ₃	0,03
KBr	0,1
KCl	0,7
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,47
Na ₂ SO ₄	4,0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10,78
NaCl	23,5
Na ₂ SiO ₃ ·H ₂ O ^a	0,2
NaHCO ₃	0,2

^a Le silicate n'est pas nécessaire lorsque l'eau est préparée dans un flacon en verre.

L'eau de mer artificielle ne contenant que des sels minéraux peut être conservée jusqu'à un an dans un récipient étanche stocké à l'abri de la lumière, dans un endroit propre, sec, tempéré et sans odeurs. Elle peut également être conservée en chambre froide dans des récipients étanches.

5.2.3 Saumure hyper saline (HSB)

De la saumure hyper saline peut être préparée en concentrant de l'eau de mer naturelle par congélation ou évaporation. La salinité maximale de la saumure préparée de cette manière est d'environ 100 % (méthode de l'USEPA, Référence [33]).

De la saumure hyper saline peut également être préparée selon la formule de Zarogian concentrée jusqu'à 5× maximum.

Des sels de mer commerciaux peuvent aussi être utilisés pour préparer la HSB mais un essai avec la substance de référence doit être réalisé pour s'assurer de l'absence d'agents complexants.

Un essai témoin avec la HSB diluée à une salinité acceptable pour le développement embryonnaire doit être effectué pour vérifier l'absence d'effet de cette préparation.

6 Matériel

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

6.1 Armoire ou enceinte thermostatée pour les incubations.

6.2 Microscope, 200x minimum mais 400x de préférence.

Si possible, utiliser un microscope optique inversé de manière à réaliser les observations directement dans les petits flacons expérimentaux (par exemple, plaques multi-puits).

6.3 Flacons de culture, d'une capacité allant de moins d'un millilitre à plusieurs litres.

Les expériences sont généralement effectuées avec un volume de solution d'essai de 50 ml. Par conséquent, il est préférable d'utiliser des flacons de culture d'une capacité de 100 ml à 200 ml. Les flacons de culture peuvent être en verre (systématiquement lavé et stérilisé) ou en polystyrène cristal à usage unique, comme des plaques multi-puits ou des récipients utilisés pour les prélèvements médicaux.

6.4 Dispositif de filtration sur cartouche ou membrane, équipé de filtres et pré-filtres adéquats pour la préparation des milieux d'essai.

6.5 Four ou autoclave, pour la stérilisation du matériel et de la verrerie destinés aux bio-essais.

6.6 Sondes de mesure de la température, de la salinité, du pH et de l'oxygène dissous dans l'eau.

6.7 Tamis, de 32 µm et 100 µm de vide de maille, destinés, respectivement, à la filtration des gamètes mâles et femelles.

Les gamètes qui passent au travers de tamis appropriés sont recueillis en vue de l'étape de fécondation.

6.8 Pipettes de transfert en polyéthylène à usage unique (1 ml à 3 ml).

6.9 Loupe binoculaire.

6.10 Compteur électronique de particules (en option).

Toute la verrerie utilisée pour isoler les géniteurs et prélever les gamètes, ainsi que les pipettes, doit être soit à usage unique soit stérilisée avant emploi pour les essais (par exemple, passage au four pendant 2 h à 200 °C pour la verrerie).

7 Substance de référence STANDARD PREVIEW

Le sulfate de cuivre pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) est la substance de référence recommandée. Cette substance chimique est systématiquement ajoutée dans chaque série d'essais afin de vérifier la sensibilité des larves. Les concentrations d'essai sont comprises entre 0 µg/l et 100 µg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ou entre 0 µg/l et 25 µg/l exprimées en cuivre.

Il convient que la valeur de la CE_{50} soit comprise entre 4 µg/l et 16 µg/l pour le cuivre total (voir l'[Annexe B](#)).

Du sulfate de zinc heptahydraté ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) peut également être utilisé comme substance de référence. Dans ce cas, il convient que les concentrations d'essai soient comprises entre 44 µg/l et 2 462,9 µg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou entre 10 µg et 560 µg exprimées en zinc.

NOTE L'expérience acquise avec le sulfate de zinc est moindre que pour le sulfate de cuivre. Par conséquent, aucune gamme acceptable ne peut être encore recommandée dans la présente Norme internationale.

8 Mode opératoire d'essai

8.1 Prélèvement, préparation et conservation des échantillons aqueux

Procéder au prélèvement et au transport des échantillons conformément aux modes opératoires généraux décrits dans l'ISO 5667-16.

Recueillir les échantillons dans des flacons en matériaux chimiquement inertes.

Procéder à l'essai de toxicité dès que possible, idéalement dans les 12 h suivant le prélèvement des échantillons. Si cet intervalle de temps ne peut pas être respecté, conserver les échantillons à 4 °C et effectuer l'essai de préférence dans les 15 jours suivant le prélèvement des échantillons.

8.2 Préparation des échantillons pour essai

8.2.1 Substances chimiques

Les solutions mères de substances chimiques d'essai sont préparées en dissolvant les substances dans l'eau de mer de référence (naturelle ou artificielle).

Lorsque la substance à soumettre à essai est peu soluble dans l'eau de mer, il est possible de préparer la solution mère dans de l'eau déminéralisée ou selon les modifications décrites dans l'ISO 14442 et l'ISO 5667-16 (emploi d'un agent solubilisant, de la dispersion des ultrasons, etc.).

8.2.2 Échantillons aqueux

Les échantillons aqueux (eau de mer, eaux de rivières, effluents urbains, agricoles ou industriels, ou encore extraits aqueux) sont soumis à essai à l'état brut et/ou après filtration ou centrifugation, afin de déterminer la fraction responsable des effets observés. De plus, selon les paramètres physico-chimiques de ces échantillons aqueux, il peut être nécessaire d'ajuster leur salinité conformément à la gamme recommandée pour l'espèce choisie.

8.3 Choix de la gamme de concentration/dilution

Pour les substances chimiques, les solutions d'essai sont préparées en diluant la solution mère dans de l'eau de mer naturelle ou artificielle.

Dans le cas d'échantillons d'eaux, d'effluents, de lixiviats et d'éluats de faible salinité, toutes les dilutions doivent rester dans la gamme de salinité acceptable pour l'espèce utilisée. Pour les eaux douces, la concentration maximale soumise à essai ne doit pas dépasser 18 % du volume de l'échantillon de départ. Si cela s'avère indispensable, il convient d'ajuster la salinité avec de la saumure hyper saline (voir en [5.2.1](#)).

ISO 17244:2015

Ces solutions peuvent être préparées en avance ou juste au moment de l'essai si des modifications rapides de la composition des échantillons sont prévues.

Au moins cinq dilutions doivent être effectuées pour couvrir une gamme de concentration permettant d'observer une gamme complète d'effets répartis entre 0 % et 100 % du développement embryo-larvaire anormal. Selon les effets potentiels recherchés, les substances peuvent être soumises à essai seules ou en mélanges. Pour les échantillons aqueux, la gamme de dilution à soumettre à essai peut être optimisée en fonction de l'objectif de l'essai: calcul d'une valeur CE_x ou détermination d'une dilution sans effet.

Il convient que l'expérience inclue au moins trois réplicats par dilution/concentration d'essai, un témoin solvant (s'il y a lieu) et cinq à dix témoins eau de référence.

Si l'essai préliminaire indique qu'aucun effet n'est attendu dans les conditions d'essai requises, un essai limite peut être effectué pour confirmer l'absence d'effet à la concentration la plus élevée ou plus faible dilution de la gamme de l'essai préliminaire.

Si l'essai est effectué dans de petits flacons (par exemple, plaques multi-puits), il convient d'augmenter le nombre de réplicats par condition d'essai de façon à atteindre le nombre de larves requis (300 par condition d'essai, 500 à 1 000 pour les témoins).

8.4 Obtention de gamètes

8.4.1 Généralités

Les gamètes mâles et femelles sont obtenus par frai naturel des adultes (c'est-à-dire, choc thermique) ou par stripping des gonades pour les huîtres. Avant de les stimuler pour obtenir des gamètes, les bivalves matures peuvent être placés dans de l'eau de mer naturelle ou artificielle (voir en [5.2](#)) afin que les animaux récupèrent du stress dû au transport et éliminent la majorité de leurs fèces. Juste avant