
Norme internationale



7346/1

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] —
Partie 1: Méthode statique

*Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] — Part 1: Static method*

ISO 7346-1:1984

Première édition — 1984-12-01

CDU 574.63/.64

Réf. n° : ISO 7346/1-1984 (F)

Descripteurs : eau, qualité, essai, détermination, toxicité, substance toxique, eau douce, poisson.

Prix basé sur 9 pages

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 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.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 7346/1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

ISO 7346-1:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/07904c5a-34bd-43cd-ab1a-cb784690c7b1/iso-7346-1-1984>

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] —

Partie 1: Méthode statique

0 Introduction

Les trois parties de l'ISO 7346 décrivent des procédures d'essais pour déterminer la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis du poisson zèbre, *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan, mais il faut souligner que l'emploi recommandé du poisson zèbre n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces. Les méthodologies présentées ici peuvent être aussi utilisées pour d'autres espèces de poissons d'eaux douces, d'eaux de mer ou d'eaux saumâtres, avec les modifications appropriées de la qualité de l'eau de dilution ou des conditions de température de l'essai, par exemple.

Parmi les trois parties de la Norme, un choix peut être fait entre les méthodes statique, semi-statique et avec renouvellement continu. L'essai statique décrit dans l'ISO 7346/1, dans lequel la solution n'est pas renouvelée, a l'avantage de ne nécessiter qu'un appareillage simple, quoique la substance puisse s'épuiser dans le récipient d'essai au cours de l'essai et la qualité globale de l'eau se détériorer. La méthode avec renouvellement continu, décrite dans l'ISO 7346/3, dans laquelle la solution d'essai est renouvelée de façon presque continue, évite de tels problèmes mais nécessite l'emploi d'un appareillage plus complexe. Dans la méthode semi-statique, décrite dans l'ISO 7346/2, les solutions d'essais sont renouvelées chaque jour, offrant ainsi un compromis entre les deux.

La méthode avec renouvellement continu peut être utilisée pour la plupart des types de substances, y compris celles qui sont instables dans l'eau, mais les concentrations de la substance à expérimenter sont déterminées chaque fois que possible. La méthode statique est limitée à l'étude des substances dont les concentrations expérimentales restent relativement constantes

pendant la durée de l'essai. La méthode semi-statique peut être utilisée pour expérimenter des substances dont les concentrations peuvent être maintenues constantes de façon satisfaisante tout au long de l'essai par le renouvellement des solutions toutes les 24 h.

Pour faciliter la préparation et le maintien en solution de substances dont les concentrations létales sont supérieures à leur solubilité dans l'eau, il est possible d'utiliser un faible volume de solvant, comme indiqué dans les méthodes.

1 Objet et domaine d'application

La présente partie de l'ISO 7346 spécifie une méthode statique pour la détermination dans une eau de qualité donnée, de la toxicité aiguë létale d'une substance, soluble dans l'eau dans les conditions de l'essai, vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae) — nom commun, poisson zèbre].

Pour chaque substance à expérimenter, le mode opératoire est applicable pour donner une idée globale de la toxicité aiguë létale vis-à-vis du *Brachydanio rerio*, dans les conditions de l'essai.

Les résultats sont en eux-mêmes insuffisants pour définir des normes de qualité d'eau en vue de la protection de l'environnement.

La méthode est également applicable à certaines autres espèces de poissons d'eaux douces comme organismes d'essais.¹⁾

1) Les espèces suivantes de poissons d'eaux douces peuvent être utilisées, en sus de *Brachydanio rerio*, sans modification de la présente partie de l'ISO 7346:

- *Cichlasoma nigrofasciatum* (Téléostei, Cichlidae)
- *Lepomis macrochirus* (Téléostei, Centrarchidae)
- *Oryzias latipes* (Téléostei, Poeciliidae)
- *Pimephales promelas* (Téléostei, Cyprinidae)
- *Poecilia reticulata* (Téléostei, Poeciliidae)

Néanmoins, les résultats des essais obtenus avec une espèce ne peuvent être extrapolés aux autres espèces.

La méthode peut être adaptée à d'autres poissons d'eaux douces, marines ou saumâtres avec des modifications appropriées des conditions d'essais, concernant notamment la quantité et la qualité de l'eau de dilution et la température.

2 Principe

Détermination, dans des conditions définies, des concentrations auxquelles une substance est létale pour 50 % d'une population d'essai de *Brachydanio rerio*, après des périodes d'exposition de 24 et 48 h à cette substance dans l'eau ambiante. Ces concentrations moyennes létales sont désignées par CL 50 - 24 h et CL 50 - 48 h. Si cela est approprié, l'essai peut être poursuivi jusqu'à une période d'exposition de 96 h.

L'essai est réalisé en deux étapes:

- a) un essai préliminaire qui donne une indication approximative des concentrations moyennes aiguës létales et sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif;
- b) un essai définitif dont seuls les résultats sont retenus.

S'il est manifeste que les concentrations restent relativement constantes (par exemple s'écartant au plus de 20 % de la valeur nominale) pendant l'essai, les concentrations nominales ou mesurées peuvent être utilisées pour l'estimation de la CL 50. Si des analyses montrent que les concentrations restent relativement constantes, mais à moins de 80 % des valeurs nominales, les valeurs analytiques doivent être utilisées pour l'estimation de la CL 50. S'il n'est pas manifeste que les concentrations d'essais restent à un niveau acceptable pendant la durée de l'essai ou s'il est connu (ou suspecté) que les concentrations de la substance d'essai ont décliné significativement à un certain stade de l'essai, alors, sans tenir compte des données analytiques disponibles ou non, la CL 50 ne peut être déterminée en utilisant la présente méthode d'essai. Dans ce cas, l'essai n'est pas nécessairement invalidé, mais il ne peut être établi seulement que la CL 50 de la substance est $\leq x$ mg/l, la valeur, x , donnée étant estimée à partir des concentrations nominales utilisées.

3 Organismes pour essai et réactifs

Les réactifs chimiques doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée pour la préparation des solutions de réactif doit être distillée dans un appareil en verre, ou déionisée, d'une pureté au moins équivalente.

3.1 Organisme pour essai

L'espèce utilisée pour l'essai doit être le *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae), appelé communément «poisson zèbre». Chaque poisson pour essai doit avoir une longueur totale de 30 ± 5 mm et une masse de $0,3 \pm 0,1$ g.

Ils doivent être sélectionnés à partir d'une population d'un stock unique. Ce stock doit avoir été acclimaté et, dans tous les cas, maintenu au moins 2 semaines avant l'essai, dans l'eau de dilution, aérée de manière continue par barbotage d'air, dans

des conditions de qualité de l'eau et d'éclairage semblables à celles utilisées pour l'essai. Ils doivent être nourris normalement jusqu'aux 24 h précédant immédiatement l'essai.

Les poissons pour essai doivent être exempts de maladies ou de malformations visibles. Ils ne doivent subir aucun traitement pendant l'essai ou pendant les 2 semaines précédant l'essai.

Les conditions d'environnement pour la maintenance et l'élevage du *Brachydanio rerio* sont données dans l'annexe A.

3.2 Eau de dilution normalisée

L'eau de dilution normalisée fraîchement préparée doit avoir un pH de $7,8 \pm 0,2$, une dureté calcique d'environ 250 mg/l exprimée en carbonate de calcium et doit être préparée de la façon suivante.

Préparer les solutions suivantes, en utilisant de l'eau distillée ou déionisée:

- a) Solution de chlorure de calcium.

Dissoudre 11,76 g de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans l'eau et diluer à 1 litre.

- b) Solution de sulfate de magnésium.

Dissoudre 4,93 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dans l'eau et diluer à 1 litre.

- c) Solution d'hydrogencarbonate de sodium.

Dissoudre 842,59 g d'hydrogencarbonate de sodium (NaHCO_3) dans l'eau et diluer à 1 litre.

- d) Solution de chlorure de potassium.

Dissoudre 0,23 g de chlorure de potassium (KCl) dans l'eau et diluer à 1 litre.

Mélanger 25 ml de chacune des solutions a) à d) et compléter à 1 litre avec de l'eau.

Aérer l'eau de dilution jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous atteigne la valeur de saturation dans l'air et jusqu'à stabilisation du pH à $7,8 \pm 0,2$. Si nécessaire, ajuster le pH de la solution en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium ou de l'acide chlorhydrique. L'eau de dilution ainsi préparée ne doit recevoir aucune aération supplémentaire avant emploi dans les essais.

3.3 Solution mère de la substance à expérimenter

Une solution mère de la substance à expérimenter doit être préparée par dissolution d'une quantité connue de la substance dans un volume défini d'eau de dilution, d'eau déionisée ou d'eau distillée dans un appareil en verre. La solution mère doit être préparée le jour de l'emploi à moins que la stabilité du matériau en solution soit connue, auquel cas la solution mère peut être préparée en quantité suffisante pour 2 jours. Afin de permettre la préparation des solutions mères et d'aider à leur transfert dans les récipients d'essai, les substances de faible

solubilité aqueuse peuvent être solubilisées ou dispersées par des moyens adéquats tels que des dispositifs à ultrasons et des solvants organiques de faible toxicité vis-à-vis du poisson. Lorsqu'un solvant organique est employé, sa concentration dans la solution d'essai ne doit pas excéder 0,1 ml/l, et deux jeux d'essais témoins, l'un contenant le solvant à la concentration maximale utilisée dans les récipients d'essai et l'autre sans solvant ni substance à expérimenter, doivent être inclus.

3.4 Solutions d'essais

Les solutions d'essais sont préparées par ajout des quantités appropriées de la solution mère de la substance à expérimenter à l'eau de dilution pour obtenir les concentrations nécessaires. Il est recommandé, lorsqu'une solution mère est préparée dans de l'eau déionisée ou de l'eau distillée, de ne pas ajouter plus de 100 ml de la solution mère pour 10 l d'eau de dilution.

4 Appareillage

Tout matériau qui est susceptible d'entrer en contact avec tout liquide dans lequel les poissons sont placés ou avec lequel ils sont mis en contact, doit être inerte et ne doit pas adsorber significativement la substance à expérimenter.

Matériel courant de laboratoire, y compris un filet en nylon ou en autre matériau chimiquement inerte pour les récipients de contrôle et un autre pour tous les récipients pour essai (4.1), et

4.1 Récipients pour essai

Les récipients pour essai doivent être de capacité suffisante (une capacité supérieure à 10 l peut être nécessaire) avec une grande aire d'interface entre l'air et le milieu d'essai (d'environ 800 cm² pour 10 l de milieu) et doivent être équipés d'un couvercle sûrement fixé.

Avant emploi, les récipients pour essai neufs doivent être soigneusement lavés puis rincés successivement avec de l'eau et de l'eau de dilution. En fin d'essai, les récipients doivent être vidés, nettoyés par des moyens appropriés, rincés à l'eau pour éliminer toutes traces de la substance d'essai et de l'agent de lavage, et séchés.

Les récipients pour essai doivent être rincés avec de l'eau de dilution juste avant emploi.

4.2 Dispositif de contrôle de la température

La température des solutions d'essais et de l'eau dans les récipients de stockage doit être régulée à 23 ± 1 °C à l'aide d'une méthode appropriée.

5 Environnement de l'essai

La préparation et la conservation des solutions, la conservation des poissons et l'ensemble des manipulations et des essais doivent être réalisés dans des locaux dont l'atmosphère est exempte de contaminants de l'air à des concentrations nocives.

Éviter soigneusement toute perturbation indésirable susceptible de modifier le comportement des poissons. Les essais doivent être réalisés sous un éclairage normal de laboratoire et un photopériodisme de 12 à 16 h d'éclairage.

6 Mode opératoire

6.1 État des poissons

En cas de changement de la population mère, un essai de toxicité selon la méthode définie dans la présente partie de l'ISO 7346 doit être effectué en utilisant une substance de référence appropriée. Les résultats de tels essais doivent être en accord raisonnable avec les résultats obtenus précédemment par le même laboratoire.

6.2 Essai préliminaire

Placer au moins 2,5 l, de préférence 5 l, d'eau de dilution normalisée (3.2) dans six récipients et les aérer si nécessaire pour restituer la concentration de l'oxygène dissous à sa valeur de saturation dans l'air.

Préparer les solutions d'essai par addition des quantités appropriées de la solution mère de la substance à expérimenter (3.3) dans cinq des récipients afin d'obtenir un domaine de concentration adéquat, par exemple 1 000; 100; 10; 1; et 0,1 mg/l. Ne rien ajouter au sixième récipient qui tient lieu de témoin. Les solutions doivent être amenées et maintenues à 23 ± 1 °C.

Placer cinq poissons dans chaque récipient.

Au moins une fois par jour pendant la période qui convient, noter le nombre de poissons morts et la concentration en oxygène dissous dans chaque récipient. Retirer les poissons morts.

Si les données sont insuffisantes pour établir la gamme de concentrations nécessaires à la réalisation de l'essai définitif, répéter l'essai préliminaire, avec une autre gamme de concentrations.

6.3 Essai définitif

Choisir au moins cinq concentrations formant approximativement une série géométrique, par exemple 8; 4; 2; 1; et 0,5 mg/l entre elles, et incluant, la plus basse concentration tuant tous les poissons dans l'essai préliminaire et la plus haute concentration non létale en 48 h. La série de concentrations choisie doit fournir la possibilité d'obtenir des mortalités entre 20 et 80 % pour au moins trois concentrations consécutives de la série géométrique utilisée, pour l'estimation de la CL 50.

Dans certains cas, une gamme de concentrations plus étroite peut être nécessaire pour fournir les données nécessaires et, dans d'autres cas, une gamme plus large peut être nécessaire.

Prendre au moins six récipients d'essai et dans chacun d'entre eux, verser, par exemple, 10 l d'eau de dilution normalisée. Ne rien ajouter dans l'un d'entre eux (témoin) et ajouter dans ceux restants les différentes quantités de solution mère nécessaires pour obtenir la gamme particulière de concentrations de la substance à expérimenter qui a été choisie pour l'essai. Si un solvant organique a été utilisé pour dissoudre une substance,

préparer un second témoin avec l'eau de dilution normalisée contenant suffisamment de solvant organique pour obtenir la concentration maximale à laquelle le solvant est présent dans les récipients d'essais. Après que la solution d'essai ait été amenée à 23 ± 1 °C, placer 10 poissons dans chacun des récipients comme suit.

Choisir les poissons au sein de la solution mère et les distribuer dans les récipients d'essais de façon aléatoire, sans délai, à l'aide d'un filet à petites mailles constitué d'un matériau doux inerte. Écarter tout poisson tombé ou maltraité d'une autre façon pendant le transfert. Pour un essai donné, tous les poissons doivent être introduits en l'espace de 30 min.

Les solutions ne doivent pas être vigoureusement aérées. Noter le nombre de poissons morts dans chaque récipient au moins deux fois par jour durant la période de l'essai. Retirer chaque poisson mort des récipients aussitôt que possible. Des observations peuvent être faites plus fréquemment, par exemple, pour pouvoir calculer pour chaque concentration les périodes moyennes de survie.

Noter tout comportement anormal des poissons.

Lorsque cela est possible, les concentrations de la substance à expérimenter dans les récipients d'essais doivent être mesurées au moins au début et à la fin de l'essai.

Mesurer la concentration en oxygène dissous, le pH et la température dans chaque récipient au moins une fois par jour et au début et à la fin de l'essai.

Une proposition de formulaire d'enregistrement des données est présentée en annexe B.

7 Expression des résultats

7.1 Validité

Les résultats sont considérés comme valables si les conditions suivantes sont respectées:

- la concentration en oxygène dissous mesurée dans les solutions d'essais au cours de l'essai est égale au moins à 60 % de la valeur de saturation dans l'air;
- les concentrations des substances à expérimenter ne sont pas connues (ou suspectées) comme ayant décru significativement pendant l'essai (mais voir chapitre 2);
- la mortalité du témoin n'excède pas 10 %;
- la proportion de poissons témoins montrant un comportement anormal n'excède pas 10 %;
- la CL 50 - 24 h de la substance chimique de référence pour la population mère se situe à un niveau acceptable par rapport aux résultats obtenus précédemment dans un même laboratoire.

7.2 Estimation de la CL 50

Si une simple estimation graphique est considérée comme suffisante, celle-ci peut être obtenue en portant la mortalité (en pourcent de poissons d'essai dans chaque récipient d'essai) en fonction de la concentration de la substance à expérimenter. En utilisant des axes arithmétiques, on obtient une relation sigmoïde à partir de laquelle la CL 50 peut être déduite par interpolation, la concentration causant 50 % de mortalité (voir figure 1).

Il est plus approprié de porter les données sur un papier graphique possédant des échelles de probabilité et logarithmique.

Les données portées de cette manière fournissent une relation linéaire à partir de laquelle la CL 50 peut être déduite par interpolation (voir figure 2).

Si une estimation de la pente, des limites de son intervalle de confiance à 95 % et de la CL 50 est nécessaire, les données peuvent être analysées graphiquement.^[2]

Si l'on dispose de systèmes de calcul, l'analyse probit peut être appliquée.^[1]

Si les résultats sont disponibles en nombre insuffisant pour estimer la CL 50 à 24 h et à 48 h, et si les données sont disponibles à 72 h et 96 h, noter la concentration minimale à laquelle se produit 100 % de mortalité et la concentration maximale causant 0 % de mortalité à 24, 48, 72 et 96 h. Ces concentrations indiquent les limites dans lesquelles se trouve la CL 50.

8 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit contenir les indications suivantes:

- l'identité chimique et toute information supplémentaire disponible sur la substance à expérimenter;
- la méthode de préparation de l'eau de dilution, des solutions mères et des solutions pour essai;
- toute information chimique, biologique et physique relative à l'essai et non spécifiée dans la présente partie de l'ISO 7346, y compris les détails des conditions d'acclimatation des poissons pour essai et la masse de poisson, en grammes par litre;
- les données prises en compte pour établir la validité de l'essai:
 - concentration en oxygène dissous,
 - mortalité observée chez les poissons du témoin,
 - proportion des poissons du témoin ayant un comportement anormal,
 - CL 50 de la substance de référence;
- un tableau indiquant les concentrations nominales expérimentées (ou les résultats d'analyses chimiques s'ils sont disponibles) et le pourcentage total des mortalités pour chacune d'entre elles à 24 et 48 h, et, s'ils sont disponibles, à 72 et 96 h après le début de l'essai;

f) les valeurs de la CL 50 et, si elles sont disponibles, les limites de leur intervalle de confiance, à 24 et 48 h, et si elles sont disponibles, à 72 et 96 h, de la substance expérimentée. La référence de la méthode de calcul doit être donnée ainsi que celle de la méthode d'analyse chimique éventuellement utilisée;

g) la pente de la courbe concentration-réponse (et les limites de son intervalle de confiance à 95 % si elles sont disponibles);

h) une illustration graphique de la relation concentration-réponse;

j) toutes réactions inhabituelles des poissons dans les conditions d'essai et tout effet externe visible produit par la substance expérimentée;

k) toute modification apportée au mode opératoire décrit dans la présente partie de l'ISO 7346 et ses raisons;

m) la référence à la présente partie de l'ISO 7346.

9 Bibliographie

[1] FINNEY, D.J. *Statistical Methods in Biological Assay* Wycombe, United Kingdom, Griffin, 1978.

[2] LITCHFIELD, J.T. and WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96** 1949: 99-113.

[3] STEPHAN, C.E. *Measurements for calculating an LC 50. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. ASTM (1977), ST, p. 634.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 7346-1:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/07904c5a-34bd-43cd-ab1a-cb784690c7b1/iso-7346-1-1984>

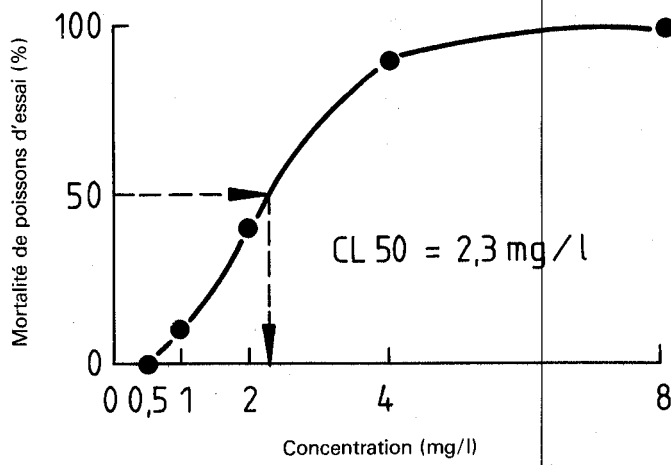


Figure 1 — Interpolation graphique de la CL 50 (axes arithmétiques)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

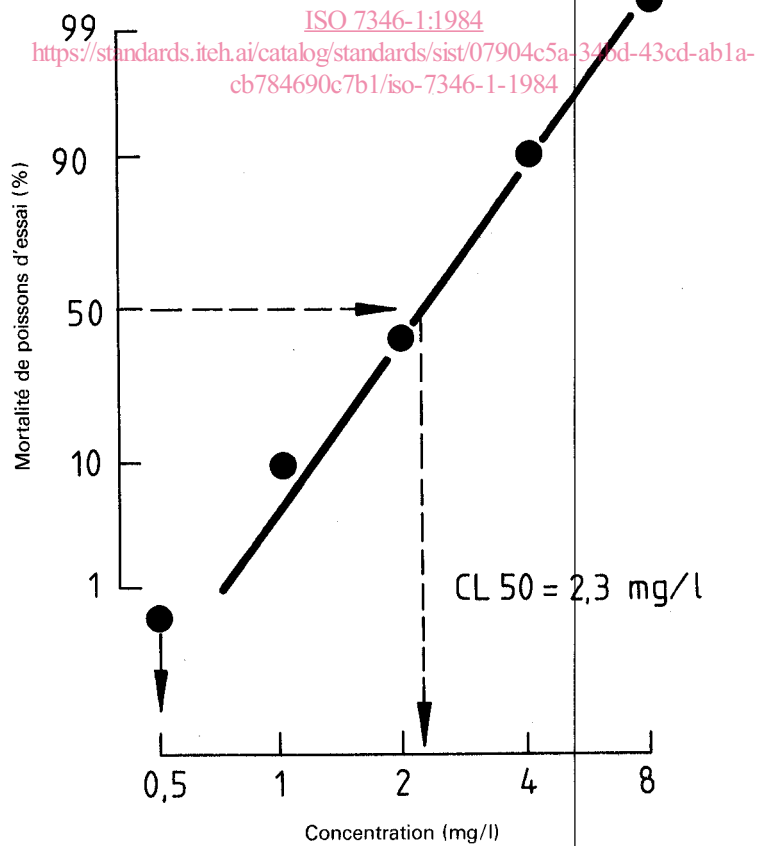


Figure 2 — Interpolation graphique de la CL 50 (axes à échelles logarithmique et de probabilité)

Annexe A

Conditions d'environnement pour la maintenance et l'élevage du poisson zèbre (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan)

A.0 Introduction

L'espèce est originaire de la côte indienne de Coromandel où elle se localise dans des courants rapides. Il s'agit d'un poisson d'aquarium commun, pour lequel les informations relatives aux soins et à l'élevage peuvent être trouvées dans des ouvrages courants sur l'élevage des poissons tropicaux. Sa biologie a récemment été revue par Laale^[A.2].

Le poisson dépasse rarement une longueur de 45 mm. Le corps est cylindrique avec 7 à 9 stries horizontales bleu-noir sur argent. Ces stries se prolongent sur les nageoires anales et caudales. Le corps est vert olive. Les mâles, plus minces que les femelles, sont chatoyants dorés. Les femelles sont plus argentées et leur abdomen est plus gonflé, particulièrement en période de frai.

A.1 Conditions d'environnement

Le poisson est capable de supporter de larges gammes de températures, de pH et de dureté de l'eau. Axelrod^[A1] cite une gamme de températures de 15,5 à 43,3 °C et un pH de 6,6 à 7,2. Le poisson peut se reproduire, être élevé et maintenu en eau de robinet d'une dureté allant jusqu'à 300 mg/kg (exprimée en carbonate de calcium) et d'un pH de 7,7 à 8,2. La température est maintenue à 26 ± 1 °C et atteint 27 ± 1 °C pour induire la ponte.

A.2 Matériels et méthodes

Pour la ponte, le poisson peut être mis en réservoir en verre d'environ 70 l de capacité. Ultérieurement, le frai est transféré dans un réservoir de 200 l de capacité.

Les adultes étant friands d'œufs, une méthode de protection des œufs et des jeunes est nécessaire. Une méthode, utilisée avec succès, consiste à isoler les poissons adultes dans des cages grillagées dans l'eau de façon que les œufs pondus par la femelle tombent sur le fond du réservoir à travers le grillage et soient hors d'atteinte des adultes.

Les cages grillagées sont constituées d'un filet de plastique de 3 mm de maille et de 250 mm x 250 mm x 80 mm de dimensions approximatives. Elles sont fixées au bord du réservoir de façon que la totalité de la partie supérieure de la cage émerge, le grillage étant immergé de 60 mm dans l'eau. Un système de filtre sous gravier ne doit pas être utilisé pour assainir l'eau car il risque d'endommager les œufs. Les réservoirs doivent être éclairés 8 h par jour.

A.3 Conditionnement

Cette période dure approximativement 2 semaines. Les mâles et les femelles sont séparés et nourris de nourriture vivante constituée de vers blancs *Enchytracides*, de *Daphnies* et de crevettes d'eaux saumâtres (*Artemia*). La densité de population durant le conditionnement est maintenue inférieure à 30 poissons pour un réservoir de 70 l de capacité.

Au bout de 2 semaines, les mâles sont très chatoyants dorés et les femelles sont très gonflées par les ovules.

A.4 Reproduction

Le réservoir de frai peut être aménagé de la façon suivante:

Remplir un réservoir vide d'eau du robinet récemment vieillie à 27 °C durant 48 h juste après avoir été collectée et placer une cage plastique à l'intérieur du réservoir accrochée au bord de façon à laisser aux poissons un espace de nage d'environ 1 litre. Placer six femelles le matin dans le panier et les nourrir de crevettes d'eaux saumâtres séchées et congelées.

Ajouter neuf mâles le soir et nourrir les poissons une fois de plus avec des crevettes d'eaux saumâtres séchées et congelées avant extinction de l'éclairage.

La ponte est induite par l'éclairage matinal et est achevée après environ 4 h d'éclairage. Les œufs, non adhésifs, tombent à travers les mailles hors d'atteinte des adultes.

Lorsque les femelles sont vides d'œufs, enlever les adultes et laisser les œufs pour éclosion.

A.5 Développement du frai

Les œufs éclosent en 4 ou 5 jours, et le frai ou les alevins adhèrent aux parois du réservoir et restent sans bouger durant 24 à 48 h. Lorsque le frai nage librement, le nourrir avec de la nourriture en particule de petite taille spécialement conçue pour poisson. Au bout de 3 semaines, le frai peut être nourri avec des crevettes d'eaux saumâtres, nouvellement écloses, et la croissance devient alors plus rapide. Au bout de 1 mois, le frai peut être transféré dans un réservoir de 200 l et nourri d'un mélange de nourriture vivante et spéciale pour poisson. Les poissons sont sexuellement matures à 3 mois et atteignent une longueur de 3,5 cm. Il est à noter que des anomalies spontanées dans le développement des larves ont été observées pour certaines souches^[A6]. D'autres études indiquent que le facteur diététique est responsable de malformation et que le poisson zèbre est particulièrement sensible à ce facteur (d'autres espèces croissent normalement quand elles se nourrissent avec le même aliment pour poisson)^[A4].