

NORME  
INTERNATIONALE

**ISO**  
**7346-1**

Deuxième édition  
1996-06-15

---

---

**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 (Téléostei,  
Cyprinidae)] —**

**Partie 1:**

**Méthode statique**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3b1e0e86-1c80-4c08-b54c-60a5dea0429e/iso-7346-1-1996>

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

*Part 1: Static method*



Numéro de référence  
ISO 7346-1:1996(F)

## 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 projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 7346-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 7346-1:1984), dont elle constitue une révision technique.

L'ISO 7346 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *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 (*Téléostei, Cyprinidae*)]:

- Partie 1: *Méthode statique*
- Partie 2: *Méthode semi-statique*
- Partie 3: *Méthode avec renouvellement continu*

Les annexes A, B et C de la présente partie de l'ISO 7346 sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1996

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

## Introduction

Les trois parties de l'ISO 7346 décrivent des procédures d'essai 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 aussi être utilisées pour d'autres espèces de poissons d'eau douce, d'eau de mer ou d'eau saumâtre, avec les modifications appropriées de, par exemple, la qualité de l'eau de dilution ou des conditions de température de l'essai.

Parmi les trois parties de l'ISO 7346, un choix peut être fait entre les méthodes statique, semi-statique et avec renouvellement continu. L'essai statique décrit dans la présente partie de l'ISO 7346, dans lequel la solution n'est pas renouvelée, a l'avantage de ne nécessiter qu'un appareillage simple, bien que la substance puisse s'épuiser dans le récipient d'essais 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 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'essai sont renouvelées toutes les 24 h ou 48 h, 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 c'est 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 ou 48 h. Des adaptations peuvent être nécessaires pour les substances hautement volatiles.

Pour faciliter la préparation et le maintien de concentrations de substances qui peuvent être létales lorsqu'elles sont proches de la solubilité aqueuse, il est possible d'utiliser un faible volume de solvant, comme prescrit dans les méthodes.

Page blanche

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

ISO 7346-1:1996

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3bfe0e86-1c80-4c08-b54c-60a5dea0429e/iso-7346-1-1996>

# 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 (Téléostei, Cyprinidae)] —

## Partie 1: Méthode statique

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 7346 prescrit une méthode statique pour la détermination de la toxicité aiguë létale de substances simples, stables, non volatiles, solubles dans l'eau dans les conditions prescrites, vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae) — nom commun, poisson-zèbre], dans une eau de qualité donnée.

La méthode est applicable pour chaque substance à expérimenter, 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 de l'eau en vue de la protection de l'environnement.

La méthode est également applicable à certaines autres espèces de poissons d'eau douce comme organismes pour essais<sup>1)</sup>.

La méthode peut être adaptée pour d'autres poissons d'eaux douce, marine ou saumâtre avec des modifications appropriées des conditions d'essai, 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 à cette substance de 24 h, 48 h, 72 h et 96 h dans l'eau ambiante. Ces concentrations moyennes létales sont désignées par CL50 - 24 h, CL50 - 48 h, CL50 - 72 h et CL50 - 96 h.

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

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

L'essai est réalisé en deux étapes:

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

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 sont utilisées pour l'estimation de la CL50. Si des analyses montrent que les concentrations réelles restent relativement constantes, mais inférieures à 80 % ou supérieures à 120 % des valeurs nominales, les valeurs analytiques sont utilisées pour l'estimation de la CL50. S'il n'est pas manifeste que les concentrations d'essai 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 CL50 ne peut être déterminée en utilisant la présente méthode d'essai. Dans ce cas, l'essai n'est pas nécessairement invalidé, mais il peut seulement être établi que la CL50 de la substance est  $\leq x$  mg/l, la valeur,  $x$ , 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 Organismes pour essai

L'espèce utilisée pour l'essai doit être le *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae), appelée communément «poisson-zèbre». Chaque poisson pour essai doit avoir une longueur totale de  $30 \text{ mm} \pm 5 \text{ mm}$  ce qui, en principe, correspond à une masse de  $0,3 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ . Ils doivent être sélectionnés à partir d'une population mère unique. Il convient que cette population mère ait été acclimatée et, dans tous les cas, maintenue au moins 7 jours avant l'essai dans l'eau de dilution, aérée de manière continue par barbotage d'air (voir 3.2), dans des conditions de qualité de l'eau et d'éclairement 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. À l'issue de l'essai, il convient d'éliminer de façon convenable les poissons restant en vie.

Les conditions d'environnement pour la maintenance et l'élevage du poisson-zèbre 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 contenir les concentrations suivantes de sels dissous dans l'eau distillée ou déionisée:

294,0 mg/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

123,3 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

63,0 mg/l  $\text{NaHCO}_3$

5,5 mg/l KCl

Aérer l'eau de dilution jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous atteigne au moins 90 % de 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 Solutions mères des substances à expérimenter

Il convient de préparer une solution mère de la substance à expérimenter 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. Afin de permettre la préparation des solutions mères et d'aider à leur transfert dans les récipients d'essais, 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 ou un volume contenant 0,1 g/l (prendre en compte la valeur la plus élevée). Lorsqu'un solvant est utilisé, deux jeux d'essais témoins, l'un contenant le solvant à la concentration maximale utilisée dans les récipients d'essais et l'au-

tre sans solvant ni substance à expérimenter, doivent être inclus.

### 3.4 Solutions d'essai

Les solutions d'essai 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 litres 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 et ce qui suit.

**4.1 Récipients d'essais**, de capacité suffisante (une capacité supérieure à 10 litres peut être nécessaire), avec une grande aire d'interface entre l'air et le milieu d'essai (d'environ 800 cm<sup>2</sup> pour 10 litres de milieu) et équipés d'un couvercle sûrement fixé. Il convient que la capacité des récipients d'essais soit suffisante afin de ne pas dépasser, à aucun moment de l'essai, un rapport massique de 1 g de poisson par litre d'eau.

Avant emploi, les récipients d'essais doivent être soigneusement nettoyés, par exemple à l'aide d'un détergent non ionique (suivi par des lavages à l'aide d'acide et de solvant pour les substances susceptibles de s'adsorber dans le récipient d'essais).

**4.2 Dispositif de contrôle de la température**, pour réguler la température des solutions d'essai et de l'eau dans les récipients de stockage, à 23 °C ± 1 °C à l'aide d'une méthode appropriée.

**4.3 Filet**, en nylon ou en un autre matériau chimiquement inerte, pour les récipients de contrôle et un autre pour tous les récipients d'essais (4.1).

## 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. Réaliser les essais sous un éclairage normal de laboratoire d'une photopériode quotidienne de 12 h à 16 h.

## 6 Mode opératoire

### 6.1 État des poissons

En cas de changement de la population mère, effectuer un essai de toxicité selon la méthode définie dans la présente partie de l'ISO 7346 en utilisant un produit chimique de référence approprié [par exemple le dichromate de potassium (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)]. Les résultats de tels essais doivent être en accord raisonnable avec les résultats obtenus précédemment par le même laboratoire.

Les poissons soumis à l'essai ne doivent pas avoir été utilisés dans des essais antérieurs.

Maintenir la température de l'eau dans les récipients de stockage à 23 °C ± 1 °C (4.2).

### 6.2 Essai de limite

En utilisant les modes opératoires décrits dans la présente partie de l'ISO 7346, un essai de limite peut être réalisé à la limite de solubilité aqueuse dans les conditions de l'essai ou à 100 mg/l (prendre en compte la valeur la plus faible), afin de démontrer que la CL50 - 96 h est plus élevée que cette concentration. Si aucun poisson ne meurt lors de l'essai de limite, aucun essai supplémentaire n'est requis.

Réaliser l'essai de limite à partir de 10 poissons, avec un nombre identique dans le(s) témoin(s).

NOTE 1 La théorie binomiale impose que lorsque 10 poissons sont utilisés, avec une mortalité nulle, il est sûr à 99,9 % que la CL50 - 96 h est plus élevée que la concentration de l'essai de limite. En cas de mortalité, il peut être nécessaire d'envisager une étude plus approfondie (voir 6.3 et 6.4). Si des effets sublétaux sont observés, il convient de les consigner.

### 6.3 Essai préliminaire

Placer au moins 2,5 litres, de préférence 5 litres, d'eau de dilution normalisée (3.2) dans six récipients d'essais (4.1) et les aérer si nécessaire pour restituer la concentration en oxygène dissous à au moins 90 % de 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) à cinq des récipients afin d'obte-

nir une gamme adéquate de concentrations en progression géométrique, par exemple 1 000 mg/l, 100 mg/l, 10 mg/l, 1 mg/l et 0,1 mg/l. Ne rien ajouter au sixième récipient qui tient lieu de témoin. Les solutions doivent être amenées et maintenues à  $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  (4.2) et ne doivent pas être vigoureusement aérées durant l'essai.

Placer trois poissons dans chaque récipient.

Au moins deux fois par jour, 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.

#### 6.4 Essai définitif

Choisir au moins cinq concentrations formant approximativement une série géométrique, par exemple 8 mg/l, 4 mg/l, 2 mg/l, 1 mg/l et 0,5 mg/l, et incluant la plus basse concentration tuant tous les poissons dans l'essai préliminaire et la plus haute concentration non létale en 96 h. La série de concentrations choisie doit fournir la possibilité d'obtenir des mortalités entre 0 % et 100 % pour au moins deux concentrations consécutives de la série géométrique utilisée, ce qui est nécessaire pour une estimation de la CL50 à l'aide de la méthode des probit.

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

Prendre au moins six récipients d'essais (4.1) et dans chacun d'entre eux verser, par exemple, 10 litres d'eau de dilution normalisée (3.2). Ne rien ajouter dans l'un d'entre eux (témoin) et ajouter dans ceux qui restent les différentes quantités de solution mère (3.3) 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 (3.4) a été amenée à  $23\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  (4.2), placer au moins 7 poissons dans chacun des récipients, comme suit.

De façon aléatoire, choisir les poissons au sein de la solution mère et les placer dans les récipients d'es-

sais, sans délai, à l'aide d'un filet à petites mailles constitué d'un matériau doux inerte (4.3). 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 chaque 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.

Si la substance s'avère stable durant la période d'exposition, alors, lorsque cela est possible, mesurer les concentrations de la substance à expérimenter dans les récipients d'essais 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. Il convient que la température et le pH des solutions d'essai ne varient pas de plus de  $1\text{ °C}$  ou de plus de 0,2 unité pH respectivement.

Une proposition de formulaire d'enregistrement des données est présentée dans l'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 dans les solutions d'essai au cours de l'essai est au moins égale 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 l'article 2);
- La mortalité du témoin n'excède pas 10 % ou un par récipient;
- la proportion de poissons témoins montrant un comportement anormal n'excède pas 10 % ou un par récipient;
- la CL50 - 24 h du produit chimique de référence [par exemple le dichromate de potassium



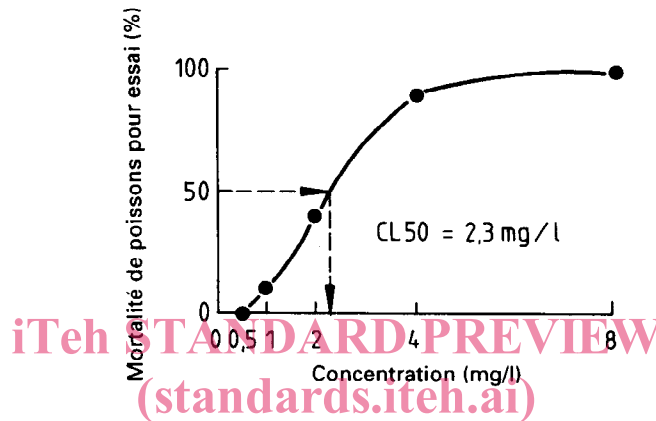
(K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)] pour la population mère, si elle est disponible, se situe à un niveau acceptable par rapport aux résultats obtenus précédemment dans le même laboratoire.

**7.2 Estimation de la CL50**

Si une simple estimation graphique est considérée comme suffisante, celle-ci peut être obtenue en portant la mortalité (en pourcentage de poissons pour essai dans chaque récipient d'essais) 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 CL50 peut être déduite par interpolation de la concentration causant 50 % de mortalité (voir figure 1).

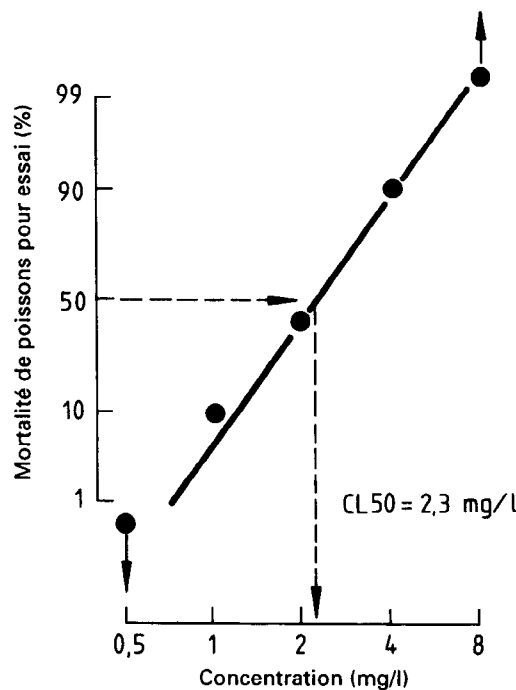
Il est plus approprié de porter les données sur un papier graphique possédant des échelles logarithmique et de probabilité. Les données portées de cette manière fournissent une relation linéaire à partir de laquelle la CL50 peut être déduite par interpolation (voir figure 2).



**Figure 1 — Interpolation graphique de la CL50 (axes arithmétiques)**

ISO 7346-1:1996

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3bf0e86-1c80-4c08-b54c-60a5dea0429e/iso-7346-1-1996>



**Figure 2 — Interpolation graphique de la CL50 (axes à échelles logarithmique et de probabilité)**