
Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce — Méthode d'évaluation des effets de substances sur le taux de croissance de la truite arc-en-ciel [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)]

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3a0e7ca0-16b6-4760-aafe-fac162759ca/iso-10229-1994>

*Water quality — Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish — Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)]*



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 10229 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Les annexes A et B de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

ITC STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 10229:1994

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/65ca0-16b6-4760-aafefac162759ca/iso-10229-1994>

© ISO 1994

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

Version française tirée en 1995

Imprimé en Suisse

Introduction

La présente Norme internationale décrit des procédures d'essai pour déterminer la toxicité à long terme de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce. Ces méthodes comprennent la détermination des réponses létales et sublétales. Dans tous les cas, l'utilisation spécifiée d'une espèce n'exclut pas l'utilisation d'autres espèces. Les méthodes présentées ici peuvent être aussi utilisées pour d'autres espèces de poissons d'eau douce, à condition d'apporter des modifications appropriées, par exemple à la qualité de l'eau de dilution, aux conditions de température et aux taux d'alimentation et de définir les relations entre les taux de croissance, les taux d'alimentation et les efficacités de conversion.

Dans le cadre de la présente Norme internationale, un choix peut être opéré entre les méthodes statique, semi-statique et avec renouvellement continu. Ces méthodes ont déjà été décrites pour la détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce dans l'ISO 7346-2 et l'ISO 7346-3, respectivement. Le choix de la méthode de présentation de la solution d'essai dépend de deux facteurs: la nature de la substance d'essai et la forme de la méthode d'essai.

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 semi-statique peut être utilisée pour étudier les substances dont la concentration peut être maintenue 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 de concentrations de substances qui peuvent invoquer les réponses choisies chez le poisson à des concentrations proches de celle de leur solubilité aqueuse, un faible volume de solvant est parfois utilisé, comme indiqué dans les méthodes.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10229:1994

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3a0e7ca0-16b6-4760-aaf6-fac162759ca/iso-10229-1994>

Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce — Méthode d'évaluation des effets de substances sur le taux de croissance de la truite arc-en-ciel [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae)]

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour la détermination de la toxicité sublétales à long terme de substances solubles dans l'eau, dans des conditions spécifiées vis-à-vis d'une espèce de poisson anadrome [*Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae) — nom commun, truite arc-en-ciel] dans l'eau douce.

NOTE 1 «Substances» est considéré comme incluant les produits chimiques purs testés seuls ou en mélange, les eaux résiduaires, les eaux industrielles ou d'autres eaux dont il est nécessaire de déterminer la toxicité sublétales vis-à-vis du poisson. Il convient d'examiner les eaux résiduaires et les eaux industrielles dans une gamme de dilutions (voir 8.2).

La réponse mesurée est la modification du taux de croissance du poisson exposé à la substance d'essai pendant des périodes de 14 jours et 28 jours (voir [1] en annexe B).

NOTE 2 La masse de chaque poisson au départ de l'essai, la période d'exposition, le programme d'alimentation et le domaine de température ont été sélectionnés de manière à garantir que le poisson témoin croîtra de manière exponentielle tout au long de l'essai.

La méthode est applicable pour l'évaluation, pour chaque substance d'essai, d'une catégorie de toxicité sublétales à long terme vis-à-vis d'*Oncorhynchus mykiss* dans les conditions d'essai.

Les résultats sont insuffisants par eux-mêmes pour définir les limites de qualité de l'eau pour la protection de l'environnement.

La méthode peut être adaptée à d'autres poissons d'eau douce, marine et saumâtre avec une modification appropriée des conditions d'essai, notamment en ce qui concerne la température, la quantité et la qualité de l'eau de dilution, la nourriture et la technique de marquage des poissons.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 7346-2:1984, *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 2: Méthode semi-statique.*

ISO 7346-3:1984, *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 3: Méthode avec renouvellement continu.*

3 Principe

Détermination, dans des conditions définies, des concentrations auxquelles une substance réduit, de manière statistiquement significative, le taux de croissance d'une population d'essai d'*Oncorhynchus mykiss* après des périodes d'exposition de 14 jours et 28 jours à cette substance dans l'eau ambiante.

L'essai est réalisé en deux étapes:

- a) un essai préliminaire, réalisé en utilisant la truite arc-en-ciel comme espèce d'essai, mais en accord avec l'ISO 7346-2 ou l'ISO 7346-3 (bien que la truite arc-en-ciel ne soit pas spécifiquement nommée dans ces parties de l'ISO 7346), qui détermine les concentrations auxquelles la substance est létale pour 50 % d'une population d'essai après exposition à la substance dans l'eau ambiante pendant 96 h: cette concentration létale moyenne est désignée par CL50 96 h et sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif (voir note 11 en 8.1).
- b) un essai définitif, utilisant 16 poissons par concentration, dans lequel les résultats sont enregistrés à la fois comme la concentration observée la plus faible présentant un effet (LOEC) et la concentration sans effets observés (NOEC). Elles comportent une indication de la période d'exposition concernée, comme dans «LOEC-28 jours». Les données peuvent être ajustées à un modèle de régression, afin de calculer la CI10 (concentration d'inhibition pour un effet à 10 %) ou des statistiques similaires.

Si les données analytiques indiquent que les concentrations d'essai moyennes restent relativement constantes (c'est-à-dire à moins de 20 % des valeurs nominales) tout au long de l'essai, la méthode permet alors l'utilisation de concentrations, soit mesurées, soit nominales dans les déclarations sur LOEC et NOEC. Si ces analyses indiquent que les concentrations présentes restent relativement constantes (c'est-à-dire ± 20 % de la moyenne) mais sont inférieures à 80 % ou supérieures à 120 % des valeurs nominales, les valeurs analytiques tirées de cette méthode sont utilisées en présentant la LOEC et la NOEC. S'il n'est pas manifeste que les concentrations d'essai restent à un niveau acceptable pendant toute

la durée de l'essai, ou si l'on sait que les concentrations de la substance d'essai ont connu une modification significative (c'est-à-dire supérieure à 20 % de la moyenne) à un stade quelconque pendant l'essai, dans ce cas, et sans tenir compte de données analytiques chimiques disponibles ou non, la LOEC et la NOEC ne peuvent être déterminées en utilisant la présente méthode d'essai. Dans ces cas, l'essai n'est pas nécessairement invalidé, mais on peut seulement affirmer que la LOEC de la substance est $\leq x$ mg/l et que la NOEC de la substance est $\leq y$ mg/l, les valeurs x et y données étant estimées à partir des concentrations nominales utilisées.

NOTE 3 Chaque fois que cela est possible, il est très important de déterminer les concentrations de la substance d'essai à laquelle les poissons sont exposés.

Les poissons peuvent être identifiés individuellement tout au long de l'essai en utilisant la technique du marquage à froid ou une méthode équivalente (par exemple, le marquage aux radio-éléments), mais ceci n'est pas obligatoire.

4 Organisme pour essai

L'espèce recommandée pour l'essai est *Oncorhynchus mykiss* Walbaum (Teleostei, Salmonidae), dont le nom commun est la truite arc-en-ciel. Les poissons pour essai doivent être sélectionnés à partir d'une population d'un stock unique. Ce stock doit avoir été acclimaté et, dans tous les cas, maintenu pendant 2 semaines au moins avant l'essai, dans l'eau de dilution, aérée de manière continue par barbotage d'air dans des conditions de qualité de l'eau, de programme d'alimentation et d'éclairage semblables à celles utilisées pour l'essai.

Sauf indication contraire (voir article 8), les poissons doivent être nourris selon une quantité minimale égale à 1 % de leur masse corporelle humide par jour pendant la période de préacclimatation et d'acclimatation et à 4 % par jour pendant l'essai définitif (voir 8.2).

NOTE 4 Cette latitude en ce qui concerne la quantité administrée pendant la période de pré-essai permet au poisson d'arriver, ou d'être maintenu, à une taille appropriée (voir ci-après) pour le début de l'essai.

La nourriture doit être constituée par un frai de salmonidae sec et divisée en deux portions égales administrées aux poissons à raison de deux rations journalières, à 5 h minimum d'intervalle. Après 14 jours d'exposition à la substance d'essai, lorsque les poissons seront repesés, les rations seront calculées à nouveau pour chaque récepteur pour essai.

Au début de l'essai, chaque poisson devra avoir une masse supérieure à 3 g et inférieure à 5 g (mais voir également 8.2). Pour l'ensemble du lot de poissons utilisés lors de l'essai, la gamme des masses individuelles au début de l'essai se situera à $\pm 10\%$ de la masse arithmétique moyenne.

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

Maintenir les poissons dans des conditions d'environnement appropriées à la truite arc-en-ciel.

NOTE 5 Consulter des manuels d'élevage des poissons, par exemple [2] dans l'annexe B.

5 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée pour la préparation des solutions mères doit être distillée dans un appareil en verre ou déionisée et de pureté au moins équivalente.

5.1 Eau de dilution

L'eau de dilution doit être adaptée à la survie à long terme et à la croissance des poissons d'essai. Le pH de l'eau de dilution doit se situer dans un domaine compris entre 6,7 et 8,5, mais pour un test donné, le pH de l'eau de dilution ne devra pas varier de plus de $\pm 0,2$ unité pH vis-à-vis de la valeur moyenne.

NOTE 6 Un tel intervalle de pH peut être normalement associé à une alcalinité de bicarbonate de 1 mg/l à 100 mg/l de CaCO_3 et à des valeurs de dureté totales de 20 mg/l à 300 mg/l de CaCO_3 ; toutefois, ces intervalles dépendront de la constitution exacte de l'eau de dilution et du temps disponible pour l'équilibrage de l'eau. Une eau artificielle appropriée peut être réalisée au moyen d'eau distillée, comme suit:

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 NaHCO_3

5,5 mg/l KCl

5.2 Solutions mères des substances à expérimenter

Préparer une solution mère de la substance à expérimenter par dissolution d'une quantité connue de la substance d'essai dans un volume défini d'eau de di-

lution, d'eau déionisée ou d'eau distillée dans un appareil en verre.

NOTE 7 Dans le cas où la substance à expérimenter est une eau usée, une eau industrielle ou une autre eau (voir article 1, note 1) et n'est pas constituée par un ou plusieurs produits chimiques purs, ces eaux peuvent être considérées comme la solution mère.

Préparer ou obtenir la solution mère aussi fréquemment que nécessaire de façon à conserver des solutions stables. Bien que l'utilisation de solvants ne soit pas souhaitable, afin de permettre la préparation des solutions mères et de faciliter leur transfert dans les récipients pour essai, les substances de faible solubilité aqueuse peuvent être solubilisées ou dispersées par des moyens adéquats tels que des dispositifs à ultrasons ou par l'emploi de solvants organiques de faible toxicité vis-à-vis du poisson. Lorsqu'un tel solvant organique est utilisé, sa concentration dans la solution d'essai ne doit pas dépasser 0,1 ml/l (elle doit, de préférence, se situer au-dessous de 0,01 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.

NOTE 8 Il est préférable d'utiliser la même concentration de solvant dans tous les récipients pour essai.

5.3 Solutions d'essai

Préparer les solutions d'essai par ajout de quantités appropriées de la solution mère de la substance à expérimenter (5.2) à l'eau de dilution pour obtenir les concentrations nécessaires (8.2). Il est recommandé, lorsqu'une solution mère est préparée dans de l'eau déionisée ou distillée, de ne pas ajouter plus de 100 ml de la solution mère pour 10 litres d'eau de dilution. Lorsque cela est possible, il est très important de déterminer les concentrations de la substance à expérimenter dans chaque récipient d'essai, sauf pour les eaux résiduelles où cela peut ne pas être possible.

6 Appareillage

6.1 Généralités

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 absorber significativement la substance à expérimenter.

Le matériel courant de laboratoire [y compris un filet en nylon ou en tout autre matériau chimiquement inerte, pour les récipients témoins et un autre pour tous les récipients pour essai (6.2)] doit être utilisé.

6.2 Récipients pour essai, d'une capacité de 45 litres au moins. Leurs parois latérales doivent être recouvertes d'un matériau opaque, de manière à minimiser les perturbations pour les poissons.

Avant emploi, les récipients pour essai neufs doivent être soigneusement lavés puis rincés successivement avec de l'eau et de l'eau de dilution (5.1). En fin d'essai, les récipients doivent être vidés, nettoyés, par exemple au moyen d'un détergent non ionique (suivi par des lavages à l'acide et aux solvants pour les substances susceptibles de s'absorber sur les récipients), rincés à l'eau pour éliminer toute trace de la substance d'essai et de l'agent de nettoyage, et séchés.

Les récipients pour essai doivent être rincés avec de l'eau de dilution (5.1) juste avant l'emploi.

6.3 Contrôle de la température, pour maintenir la température des solutions d'essai et de l'eau dans les récipients de stockage des poissons dans un intervalle de 12,5 °C à 17,5 °C, avec régulation à ± 1 °C.

6.4 Dispositif de renouvellement des solutions, comprenant un appareillage de dosage et de mélange capable de maintenir les concentrations nécessaires de la solution mère dans les récipients d'essai à moins de 10 % de la moyenne, l'appareillage étant installé pour renouveler les solutions d'essai dans les récipients à un rythme suffisant pour empêcher une chute de la concentration en oxygène dissous en dessous de 70 % de la valeur de saturation dans l'air.

6.5 Techniques de marquage des poissons

Si l'on recourt à un marquage individuel des poissons, plusieurs techniques sont tolérées, comme le marquage à froid par exemple.

Pour le marquage à froid, les fers de marquage doivent être constitués par du fil d'acier inoxydable (par exemple 22 SWG 316) pliés pour former un chiffre arabe ou une lettre et fixés à un manche non métallique. La figure 1 illustre un exemple de modèle approprié pour ces marques. Les marques doivent être refroidies dans de l'azote liquide contenu dans un flacon dûment isolé.

NOTES

9 Directement après le marquage, la marque est presque invisible, mais elle apparaît progressivement pendant les 2 jours qui suivent pour être ensuite clairement visible pendant 6 semaines au moins. Les marques qui comportent des boucles fermées (comme dans les chiffres 0, 6, 8, 9) seront évitées dans le cas où elles favorisent une infection de la peau. La face de la marque sera lisse et plate, de manière à éviter une pression excessive en tout point de la peau marquée.

10 Il est permis d'utiliser les méthodes de marquage des poissons autres que le marquage à froid, à condition que ces méthodes soient sans influence sur l'essai.

7 Environnement de l'essai

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

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

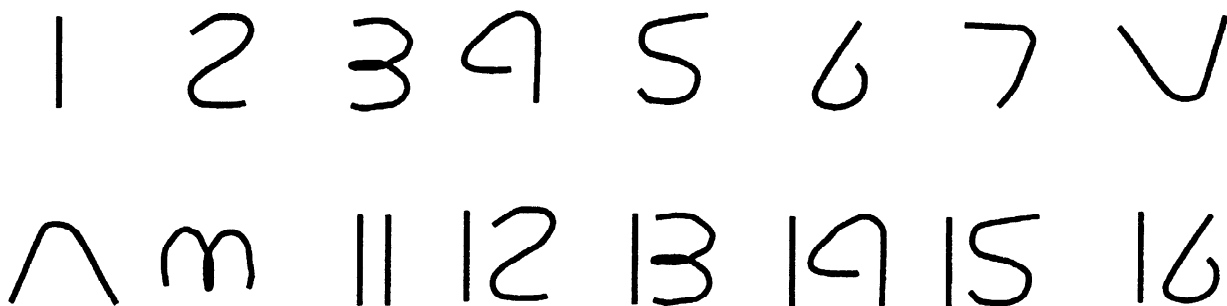


Figure 1 — Exemple de marques sur des poissons marqués à froid

8 Mode opératoire

8.1 Essai préliminaire

Effectuer un essai préliminaire en réalisant un essai CL50 96 h selon l'ISO 7346-2 ou l'ISO 7346-3, mais en utilisant des truites arc-en-ciel comme espèce d'essai. Les poissons doivent, de préférence, être prélevés parmi le même stock que ceux utilisés pour l'essai définitif et être de même taille. La température, la qualité de l'eau de dilution et l'éclairage seront très proches des conditions à adopter lors de l'essai définitif.

NOTE 11 Il est bien entendu que si la substance d'essai a été examinée antérieurement et que des données de toxicité létale applicables sont disponibles, il n'est pas nécessaire de répéter l'essai de toxicité létale aiguë.

Consigner les résultats de l'essai préliminaire comme indiqué à l'article 8 de l'ISO 7346-2:1984 ou de l'ISO 7346-3:1984.

8.2 Essai définitif

Normalement, sélectionner au moins cinq concentrations, formant approximativement une série en progression géométrique. Les concentrations maximales ne doivent généralement pas être inférieures à 10 % ou supérieures à 32 % de la CL50 96 h telle que définie en 8.1. Si moins de cinq concentrations sont utilisées, ce mode opératoire doit être justifié.

NOTE 12 À titre indicatif pour le choix de la fraction de la CL50 96 h à utiliser comme concentration maximale lors de l'essai définitif, si la courbe de toxicité déterminée lors de l'essai préliminaire présente peu de marques d'aplatissement vers une CL50 asymptotique, une fraction de 10 % environ devrait être utilisée. Si une CL50 asymptotique a été définie dans les 96 h ou semble être susceptible d'être définie peu après 96 h, une fraction de 32 % environ peut être appropriée.

Le facteur entre concentrations consécutives ne pourra dépasser $\sqrt{10}$ (c'est-à-dire 3,162).

NOTE 13 S'il est nécessaire de répéter l'essai, un intervalle de concentrations plus étroit ou plus large peut devoir être établi.

Rassembler au moins six récipients pour essai de 45 litres environ (6.2) et le matériel auxiliaire (6.3 à 6.5) et verser 40 litres de solutions d'essai (5.3) dans tous ces récipients sauf un ou deux, de manière à obtenir la gamme de concentrations de la substance à expérimenter sélectionnée pour l'essai. Dans l'un des récipients restants, verser de l'eau de dilution

(5.1) uniquement comme témoin. Si un solvant organique a été utilisé pour dissoudre une substance ou la disperser, préparer un second témoin avec l'eau de dilution contenant suffisamment de solvant organique pour obtenir la concentration maximale à laquelle le solvant est présent dans tous les récipients pour essai.

Ajuster la température des solutions d'essai au niveau requis (voir 6.3).

Mesurer les concentrations de la substance d'essai dans les solutions sortant des récipients pour essai au moins au début, au milieu et en fin d'essai.

NOTE 14 De préférence, il convient de se conformer à la méthode d'échantillonnage et d'analyse de l'eau d'essai établie ci-dessous.

- 4 Commencer le dosage de la substance d'essai dans les récipients pour essai
- 3 Échantillon 1
- 2 Échantillon 2
- 0 Si les échantillons 1 et 2 sont jugés satisfaisants, marquer les poissons, si nécessaire et commencer l'essai
- 0 à 7 Échantillon 3
- 8 à 14 Échantillon 4
- 15 à 21 Échantillon 5
- 22 à 28 Échantillon 6

Régler l'appareillage (6.4) de manière à remplacer la solution d'essai dans les récipients pour essai à une cadence d'au moins 200 l/jour, soit continuellement, soit par des ajouts à intervalles courts. Si des poissons d'une masse initiale supérieure à 5 g sont utilisés, l'essai ne doit pas être invalidé, mais la cadence de remplacement doit être augmentée de manière à ce que dans tous les cas, la concentration d'oxygène dissous de la solution sortante reste supérieure à 70 % de la valeur de saturation dans l'air, et de manière à satisfaire aux conditions concernant les concentrations de la substance d'essai (voir 6.4).

NOTE 15 Lorsque des poissons plus grands sont utilisés. Il convient de tenir compte de la nécessité d'utiliser des récipients pour essai plus grands.

Ajuster et maintenir la température de la solution d'essai à utiliser pour le remplacement proche de la température d'essai avant l'ajout aux récipients pour essai.

Réaliser l'essai, soit

- a) en mesurant les taux de croissance individuels, soit

- b) en mesurant la croissance moyenne de chaque groupe de poisson.

Ces méthodes peuvent avoir une sensibilité égale, mais celle-ci n'est probablement vraie que si le domaine de masses ou de longueurs au départ de l'essai est restreint et est conforme aux critères stipulés à l'article 4.

NOTE 16 Un taux de croissance individuel peut constituer un réglage final plus sensible si les masses/longueurs initiales sont variables (voir [3] en annexe B).

a) Mesurage du taux de croissance individuel

Ne pas donner à manger aux poissons soumis à l'essai (article 4) pendant 24 h avant le début de l'essai. Ensuite, choisir les poissons au hasard au sein du stock, et les anesthésier en utilisant une solution aqueuse de 100 mg/l de sulfonate de méthane tricaïne ou une substance similaire (par exemple, benzocaïne). Peser les poissons à 100 mg près et les mesurer (fourche, longueur totale ou normalisée) au millimètre près.

NOTE 17 Il convient de se référer à [4] dans l'annexe B pour de plus amples informations.

Placer les poissons anesthésiés tour à tour sur un lit de tissu en papier humide et éliminer l'excès d'humidité de la partie du poisson destinée à être marquée. Ensuite, appliquer doucement un fer à marquer (voir 6.5) refroidi par immersion dans de l'azote liquide, sur le poisson sous l'arête dorsale pendant 3 s. Laisser les poissons se réveiller dans de l'eau claire. Placer les poissons, marqués individuellement, par lots de 16, dans les récipients pour essai.

AVERTISSEMENT — Il convient de noter que le sulfonate de méthane tricaïne peut être cancérigène.

NOTE 18 Il est recommandé de transférer les poissons en utilisant un filet à mailles étroites, de matière inerte souple.

Écarter tout poisson tombé ou maltraité d'une autre façon pendant le transfert.

Pour un essai donné, le premier et le dernier poissons doivent avoir été marqués, pesés, mesurés et placés dans les bacs d'exposition dans les 4 h.

14 jours après la première exposition des poissons à la substance, priver les poissons de nourriture à nouveau pendant 24 h. Répéter l'anesthésie et le mesurage des poissons et recalculer la ration (voir article 4). Remplacer les poissons dans les récipients

pour essai pendant une nouvelle période de 14 jours et répéter les 24 h d'inanition, l'anesthésie et le mesurage des poissons.

Examiner les poissons, de préférence chaque jour pendant la période de l'essai et noter tout comportement anormal. Enregistrer les mortalités, s'il y en a, et éliminer les poissons morts du récipient le plus rapidement possible. Remplacer les poissons morts par des individus de poids similaire prélevés sur le stock (ne pas inclure ces poissons de remplacement dans l'analyse des données).

NOTES

19 Les poissons de remplacement sont prévus pour minimiser tous les effets qui pourraient se produire dans le cas contraire lorsque le nombre des poissons d'essai a diminué dans un récipient pour essai donné.

20 Si la mortalité à la concentration d'essai la plus élevée dépasse 10 %, ceci peut indiquer que l'intervalle des concentrations d'essai a été réglé trop proche de la CL50 96 h.

Mesurer la concentration en oxygène dissous, le pH et la température de la solution de chaque récipient pour essai une fois par jour au moins, ainsi qu'au début et à la fin de l'essai. Éliminer les matières fécales et les aliments non absorbés des récipients pour essai chaque jour.

b) Mesurage du taux de croissance spécifique moyen

La procédure est la même que pour le mesurage du taux de croissance individuel, sauf que les poissons ne sont pas identifiés individuellement et ne sont donc ni anesthésiés ni marqués. Les longueurs et masses de chaque groupe de poissons sont notées au début de l'essai, après 14 jours et après 28 jours, mais les augmentations moyennes en longueurs ou masses sont utilisées pour calculer le taux de croissance spécifique.

9 Précision du mode opératoire

Les résultats d'un essai interlaboratoire européen utilisant deux substances d'essai, 3,4-dichloroaniline et sulfonate d'alkylbenzène linéaire ont donné des estimations pour un coefficient de variation de 29 % et 31 %, respectivement. Ces estimations étaient basées sur les résultats de l'analyse par régression de 11 jeux de données pour la première substance et de six jeux de données pour la seconde (voir [3] dans l'annexe A).

10 Expression des résultats

10.1 Validité

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

- la concentration en oxygène dissous mesurée dans les solutions d'essai au cours de l'essai est égale au moins à 70 % de la valeur de saturation dans l'air;
- la température est dans l'intervalle 12,5 °C à 17,5 °C et n'a pas varié de plus de 2 °C;
- les concentrations de la substance à expérimenter sont connues comme étant restées à ± 20 % de la valeur moyenne pendant l'essai (mais voir l'article 3);
- la mortalité des poissons témoins ne dépasse pas 10 %.

10.2 Données disponibles

Reporter dans un tableau les données suivantes pour chaque poisson à 0 jour, 14 jours et, le cas échéant, 28 jours:

- poids vif;
- fourche, longueur totale ou normalisée;
- taux de croissance spécifique (r), calculé comme suit:

$$r = \frac{\log_e m_2 - \log_e m_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

où

m_1 est la masse, en grammes, au temps t_1 ;

m_2 est la masse, en grammes, au temps t_2 ;

m_1 et m_2 sont soit des masses individuelles, soit la masse moyenne du groupe.

NOTE 21 r peut être calculé pour les périodes suivantes:

$$t_1 = 0, t_2 = 14 \text{ jours}$$

$$t_1 = 14, t_2 = 28 \text{ jours}$$

$$t_1 = 0, t_2 = 28 \text{ jours}$$

10.3 Estimation de la LOEC et de la NOEC

Pour l'estimation directe de la LOEC et de la NOEC, analyser les données pour les masses des poissons considérés individuellement, leurs longueurs et leurs taux de croissance individuels en utilisant une analyse de variance unique. Comparer les moyennes du traitement à celles des poissons témoins en utilisant une méthode statistique appropriée.

NOTE 22 L'essai de Dunnett^[5] ou l'essai de Williams^[6] peut être approprié, mais il convient de ne pas utiliser ces essais sans répétition véritable.

Si les taux de croissance individuels n'ont pas été mesurés, les données du taux de croissance spécifique moyen peuvent être utilisées pour calculer la CI10 qui peut être prise comme une approximation de la LOEC.

NOTE 23 Se référer à 7.2 de l'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*, pour le calcul de la CI10. Le calcul de la CE10 (concentration effective pour 10 % du poisson) est identique à celui de la CI10.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les indications suivantes:

- la référence à la présente Norme internationale;
- 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 d'essai, y compris une description détaillée du dispositif de renouvellement des solutions ou une référence à ce dernier;
- toute information biologique, chimique et physique relative à l'essai et non spécifiée dans la présente Norme internationale, y compris les détails des conditions d'acclimatation des poissons pour l'essai et de la méthode de marquage des poissons;
- les données prises en compte pour établir la validité de l'essai:
 - concentrations en oxygène dissous et substance d'essai, et