

---

---

**Qualité de l'eau — Détermination de la  
toxicité aiguë des eaux résiduaires  
vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre  
(*Danio rerio*)**

*Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to  
zebrafish eggs (Danio rerio)*

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

[ISO 15088:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-  
b3afa7500053/iso-15088-2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007)



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 15088:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2007

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

**Sommaire**

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>2</b>
<b>4</b> <b>Interférences</b> .....	<b>3</b>
<b>5</b> <b>Principe</b> .....	<b>3</b>
<b>6</b> <b>Réactifs</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>4</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>4</b>
<b>9</b> <b>Détermination des paramètres toxicologiques</b> .....	<b>7</b>
<b>10</b> <b>Critères de validité</b> .....	<b>9</b>
<b>11</b> <b>Détermination de LID<sub>egg</sub></b> .....	<b>9</b>
<b>12</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>9</b>
<b>13</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>9</b>
<b>14</b> <b>Reproductibilité</b> .....	<b>10</b>
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Schéma de représentation et de répartition des œufs sur les microplaques</b> .....	<b>11</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>12</b>

## 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

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.

L'ISO 15088 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

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

[ISO 15088:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007>

## Introduction

Les poissons jouent un rôle majeur dans la chaîne alimentaire aquatique et sont des consommateurs de premier ordre (souvent situés en bout de chaîne) qui remplissent d'importantes fonctions de régulation des écosystèmes aquatiques. Les poissons sont des organismes reconnus dans les stratégies d'essais concernant les différents niveaux trophiques.

Les œufs de poisson-zèbre (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) sont utilisés comme matériau d'essai. Les poissons-zèbres appartiennent à la famille des cyprinidés (carpes) dans le groupe des ostéichthyens (téléostéens). Ils sont faciles à élever et produisent tout au long de l'année des œufs transparents et non collants (ayant un diamètre d'environ 1 mm). Leur développement embryonnaire est parfaitement connu. Le poisson-zèbre constitue l'un des modèles de recherche les plus importants dans le domaine de la biologie du développement des vertébrés et fait partie des espèces recommandées dans les Lignes directrices 203, 204 et 210 de l'OCDE.

Les constituants de l'eau et les effluents peuvent avoir un impact sur le développement des œufs de poissons fécondés. La mort des embryons et certaines anomalies définies du développement embryonnaire qui aboutissent finalement à la mort sont considérés comme des effets.

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

[ISO 15088:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007>

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

ISO 15088:2007

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007>

# Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduelles vis-à-vis des œufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*)

**AVERTISSEMENT** — Les personnes qui utilisent la présente Norme internationale doivent parfaitement connaître les pratiques de travail habituelles des laboratoires. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité éventuellement liés à son utilisation. L'utilisateur est tenu d'établir des pratiques de sécurité et d'hygiène adaptées et de s'assurer que les conditions réglementaires nationales sont respectées.

**IMPORTANT** — Les essais entrant dans le cadre de la présente Norme internationale doivent impérativement être réalisés par des personnes ayant une qualification appropriée. Lors de l'application de la présente Norme internationale, il est nécessaire de déterminer systématiquement s'il convient d'établir des conditions d'essai supplémentaires, ainsi que leur étendue.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour déterminer les degrés de dilution ou les concentrations d'eaux résiduelles produisant un effet toxique aigu vis-à-vis des œufs de poisson en l'espace de 48 h. La présente Norme internationale est également applicable aux eaux résiduelles municipales traitées et aux effluents industriels.

**NOTE** La présente Norme internationale a été élaborée dans le but de remplacer l'essai de toxicité aiguë vis-à-vis des poissons. Appliquée aux eaux résiduelles, elle donne des résultats identiques ou similaires à ceux obtenus avec l'essai de toxicité aiguë sur poisson (par exemple l'ISO 7346-1 et l'ISO 7346-2). Si elle est utilisée pour des substances individuelles, il convient de tenir compte des éventuelles différences de sensibilité entre les deux systèmes d'essai.

## 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour 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 5814, *Qualité de l'eau — Dosage de l'oxygène dissous — Méthode électrochimique à la sonde*

ISO 7346-1, *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*

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

### 3 Termes et définitions

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

#### 3.1

##### lot témoin

eau de dilution contenant des œufs de poisson fécondés

#### 3.2

##### niveau de dilution

$D$

inverse de la valeur de la fraction volumique des eaux résiduelles dans l'eau de dilution dans laquelle l'essai est réalisé

EXEMPLE 250 ml d'eaux résiduelles dans un volume total de 1 000 ml (fraction volumique de 25 %) représentent un niveau de dilution  $D = 4$ .

NOTE Voir l'ISO 5667-16.

#### 3.3

##### CE<sub>50</sub>

concentration à laquelle un effet conforme au critère d'essai est observé sur 50 % des organismes

NOTE Dans la présente Norme internationale, CL<sub>50</sub> est la concentration létale à laquelle 50 % des organismes sont morts.

#### 3.4

##### œuf de poisson

terme générique désignant tous les stades de développement d'une cellule d'œuf (à l'intérieur du chorion) dans la présente Norme internationale

ISO 15088:2007

NOTE Si nécessaire, on utilise pour ce terme les qualificatifs suivants: «non fécondé», immédiatement après la ponte; «fraîchement fécondé», stade de développement compris entre 4 et 128 cellules; «embryon», si l'embryon en cours de développement est visible à l'intérieur de l'œuf avant l'éclosion.

#### 3.5

##### plus faible dilution sans effet

##### facteur de dilution

LID

niveau de dilution  $D$  (3.2) pour lequel aucune inhibition n'est observée ou bien uniquement des effets ne dépassant pas la variabilité spécifique à l'essai

#### 3.6

##### LID<sub>egg</sub>

niveau de dilution pour lequel aucune inhibition n'est observée dans un lot d'essai dans lequel au moins 90 % des œufs de poissons ne présentent aucun effet décrit dans la présente Norme internationale

NOTE Voir Articles 11 et 12 et Figure 2.

#### 3.7

##### lot d'essai

dilutions définies contenant des œufs de poisson fécondés



## 4 Interférences

Dans le cas d'eaux résiduelles fortement colorées et/ou troubles, la différenciation des œufs peut s'avérer difficile. L'ordre de préparation est alors modifié de la manière suivante avant de débiter l'exposition:

- ponte;
- différenciation des œufs fécondés et non fécondés (8.2.2);
- transfert dans l'eau de dilution (7.10, cristallisoirs);
- transfert dans des microplaques sans exposition préalable.

Lors du transfert dans les microplaques, il convient de minimiser l'erreur de dilution due à l'eau adhérente.

## 5 Principe

Dans une série de dilutions, les eaux résiduelles sont mélangées à l'eau de dilution pour obtenir des niveaux de dilution,  $D$ , définis. Après l'exposition des œufs de poisson fécondés aux lots d'essai pendant 48 h dans des microplaques, on détermine la limite de dilution (LID) à laquelle aucun effet toxique aigu n'apparaît. À 26 °C, les embryons éclosent après une période comprise entre 72 h et 96 h. La durée de l'essai est de 48 h. En tant que lot témoin positif, une solution de 3,7 mg/l de substance de référence de 3,4-dichloroaniline est soumise à l'essai avec 10 œufs fécondés (8.3).

La présente Norme internationale peut également être utilisée pour calculer des valeurs de  $CE_{50}$  basées sur des relations dose-réponse exprimées en pourcentage d'eaux résiduelles, sans modifier la conception de l'essai.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 15088:2007](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007)

## 6 Réactifs

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007>

Dans la mesure du possible, utiliser uniquement des produits chimiques de qualité analytique reconnue.

- 6.1 Eau**, déminéralisée ou de pureté équivalente (conductivité < 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).
- 6.2 Acide chlorhydrique**, par exemple  $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .
- 6.3 Solution d'hydroxyde de sodium**, par exemple  $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ .
- 6.4 Substance de référence 3,4-dichloroaniline**, solution mère,  $\rho(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}_2\text{N}) = 100 \text{ mg/l}$ .

Verser 0,05 g de dichloroaniline dans 500 ml d'eau de dilution (6.5) et agiter pendant 24 h. Ajuster le pH à 7,0.

Conserver cette solution mère au réfrigérateur, à l'abri de la lumière, pendant une durée maximale de 6 mois. Une concentration de 3,7 mg/l est utilisée comme lot témoin positif (8.3).

### 6.5 Eau de dilution

Utiliser de l'eau de dilution normalisée, tel que spécifié dans l'ISO 7346-1 et l'ISO 7346-2.

- 294,0 mg/l de chlorure de calcium dihydraté,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ;
- 123,3 mg/l de sulfate de magnésium heptahydraté,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ;
- 63,0 mg/l d'hydrogencarbonate de sodium,  $\text{NaHCO}_3$ ;
- 5,5 mg/l de chlorure de potassium,  $\text{KCl}$ .

Avant d'ajouter la substance de référence (6.4) ou les échantillons d'eaux résiduelles à soumettre à essai, équilibrer l'eau de dilution avec de l'air jusqu'à 100 % de saturation en oxygène à  $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

## 7 Appareillage

- 7.1 **Microscope inversé et/ou binoculaire**, ayant un facteur de grossissement minimal de  $\times 30$ .
- 7.2 **Récipients d'exposition**, ayant un volume de 2,5 ml à 5 ml, à fond plat, par exemple des microplaques à usage unique en polystyrène (24 puits).
- 7.3 **Film adhésif**, pour recouvrir les microplaques.
- 7.4 **Incubateur réglé en température ou climatisation de la pièce à  $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$** , éclairage contrôlé pendant la conservation des poissons parents et l'exposition des œufs.
- 7.5 **pH-mètre**.
- 7.6 **Sonde à oxygène**, voir ISO 5814.
- 7.7 **Bacs de ponte en matière plastique inerte ou en verre pour recueillir les œufs pendant la ponte**.
- 7.8 **Plantes artificielles en verre ou en matière plastique**.
- 7.9 **Pipette**, pour transférer les œufs.
- 7.10 **Cristallisoirs**.
- 7.11 **Verrerie pour préparer les niveaux de concentration et l'eau de dilution**.
- 7.11.1 **Fioles jaugées**. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fea8f8da-b81b-455a-a506-b3afa7500053/iso-15088-2007>
- 7.11.2 **Éprouvettes graduées**.
- 7.11.3 **Pipettes graduées**.
- 7.11.4 **Boîtes de Petri**.
- 7.11.5 **Bécher**, par exemple de 150 ml.
- 7.12 **Aquariums pour conserver les poissons adultes**.
- 7.13 **Thermomètre de laboratoire**.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Conservation des poissons et production des œufs

#### 8.1.1 Généralités

Pour la production des œufs, utiliser uniquement des reproducteurs apparemment en bonne santé, ne présentant aucune maladie extérieurement visible et âgés de 6 mois à 24 mois.

Ne donner aux poissons parents utilisés pour l'essai aucun médicament (à caractère aigu ou prophylactique) pendant les 6 mois qui précèdent immédiatement la ponte.

### 8.1.2 Aquariums

Conserver les reproducteurs dans des aquariums offrant un espace de nage suffisant (c'est-à-dire 1 l par poisson).

### 8.1.3 Eau pour la conservation et l'élevage des poissons

Utiliser l'eau de dilution normalisée (6.5).

Il convient d'obtenir une saturation en oxygène au moins égale à 80 % et de maintenir une température de  $26\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ . Pour la conservation et l'élevage des poissons, de l'eau potable adaptée (ne contenant par exemple aucun agent désinfectant) peut être utilisée en remplacement.

### 8.1.4 Alimentation

Il convient de nourrir les poissons en leur distribuant de la nourriture sèche pour poissons d'aquarium, disponible dans le commerce.

Il est recommandé de compléter cette nourriture, par exemple par des aliments vivants (nauplie d'*Artemia*, daphnies de taille appropriée).

Il convient d'éviter tout excès de nourriture.

Des œufs d'*Artemia* peuvent être achetés dans les magasins d'aquariophilie. Les instructions du producteur fournissent généralement des informations sur les conditions d'élevage. Avant de nourrir les poissons, rincer minutieusement les nauplies d'*Artemia* à l'eau afin d'en ôter le sel.

### 8.1.5 Conditions d'éclairage (standards.iteh.ai)

La photopériode est ajustée de façon constante tout au long de l'année, c'est-à-dire 16/8 h (éclairage/obscurité) ou 12/12 h.

NOTE Toutes les conditions physiologiques acceptables d'éclairage et de photopériodes sont admissibles.

## 8.2 Production des œufs destinés à l'essai

### 8.2.1 Généralités

L'accouplement et la ponte ont généralement lieu dans un délai de 30 min après le début de la période d'éclairage. Il est recommandé de mettre en présence des sujets mâles et femelles dans un rapport de 2 pour 1, ce rapport ayant fourni des résultats concluants.

À l'état adulte, les poissons-zèbres sont connus pour être friands de leurs propres œufs fécondés. Par conséquent, placer des bacs de ponte en verre recouverts d'une grille en acier inoxydable dans les aquariums afin de pouvoir prélever les œufs sans être gêné par les sujets adultes. Il convient de fixer des plantes artificielles en matière plastique ou en verre (7.8) sur la grille recouvrant les bacs de ponte afin de favoriser un stimulus tactile qui déclenchera la ponte.

Insérer les bacs de ponte (7.7) dans les aquariums juste avant l'activation de la lumière afin de garantir que le stade de développement des œufs fécondés se situe dans la plage de 4 à 128 cellules.

Il est admis d'utiliser d'autres modes opératoires pour obtenir les œufs fécondés, à condition que les critères définis pour les conditions de démarrage (stade de 4 à 128 cellules) soient satisfaits.

Retirer les bacs de ponte environ 30 min après l'activation de la lumière et avant de nourrir les poissons.

Les œufs transparents peuvent être facilement identifiés en plaçant le bac de ponte sur un fond noir et en examinant son contenu à l'aide d'un faisceau lumineux transverse.

Il convient que le taux de fécondation soit supérieur à 50 %. Il peut être admis d'approximer ce taux (8.2.2).