

E-V-5 - Détermination de la toxicité chronique par *Daphnia magna* Straus - Méthode 21 jours

1. Objet

Cette procédure décrit une méthode de détermination de la toxicité à long terme d'échantillons liquides vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*). Les paramètres d'effet étudiés sont la survie et l'inhibition de la capacité reproductrice au cours d'un essai de 21 jours.

2. Domaine d'application

La présente procédure s'applique aux substances chimiques solubles dans les conditions de l'essai ou pouvant être maintenues en suspension ou en dispersion stable dans les conditions de l'essai, aux effluents industriels ou urbains, épurés ou non, s'il y a lieu après décantation, filtration ou centrifugation, aux eaux de surface ou eaux souterraines ainsi qu'aux extraits aqueux (eau interstitielle, lixiviats,...).

3. Définitions et abréviations

Daphnia magna : microcrustacé d'eau douce de l'ordre des cladocères.

Parthénogenèse acyclique : reproduction asexuée (pas d'intervention de gamète mâle) sans alternance avec une phase de reproduction sexuée normale. Dans ce cas, les femelles donnent naissance uniquement à des femelles. L'apparition de mâles dans l'élevage est le signe de perturbations dans celui-ci.

EC_{XX} (21j) : concentration ou dilution effective estimée qui inhibe à XX% la capacité reproductrice pour une exposition de 21 jours.

NOEC : concentration d'essai la plus haute qui ne provoque pas d'effet observé au cours de l'essai réalisé (plus forte concentration d'essai qui fournit une réponse statistiquement similaire à celle du témoin).

LOEC : concentration d'essai la plus faible pour laquelle un effet peut être observé au cours de l'essai réalisé (plus faible concentration d'essai qui fournit une réponse statistiquement différente de la réponse des témoins).

4. Principe

La survie et l'inhibition de la capacité reproductrice de *Daphnia magna* sont utilisées comme mesure de la toxicité chronique des substances et des échantillons aqueux soumis à l'essai.

Pendant l'essai, des daphnies femelles âgées de moins de 24 heures sont exposées pendant 21 jours, dans les conditions définies par la norme ISO 10706 et détaillées dans le protocole expérimental ci-dessous (**paragraphe 10**), à une gamme de concentrations ou de dilutions de la substance ou de l'échantillon dont la toxicité doit être déterminée dans un système semi-statique ou à renouvellement continu. Le nombre de parents survivants ainsi que le nombre de descendants vivants issus de parents vivants à la fin de l'essai sont consignés. La survie est notée et la capacité reproductrice des parents mis en expérimentation, vivants en fin d'essai (exprimée en nombre d'individus) est comparée à celle des parents témoins. La relation



concentration-effet est déterminée par analyse statistique. L'eau de dilution sert de milieu témoin.

5. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Les échantillons d'eaux ou d'effluents doivent être prélevés conformément à la procédure générale définie dans l'ISO 5667-2. Les flacons en verre ou en matériau chimiquement inerte doivent être complètement remplis pour ne plus contenir d'air. L'essai de toxicité doit être effectué dès que possible et dans les 12 heures qui suivent le prélèvement. Si ce délai ne peut être respecté, l'échantillon doit être refroidi à 4 ± 2 °C sur le lieu du prélèvement et conservé à cette température afin d'être analysé dans les 48 heures qui suivent le prélèvement. Remarquons que l'échantillon peut éventuellement être congelé afin d'être analysé dans les 2 mois qui suivent le prélèvement.

Lorsque l'échantillon est un prélèvement d'eau ou d'effluent, toutes les portions (sous-échantillons) doivent être prétraitées de la même manière (c'est-à-dire que lorsqu'il est nécessaire de congeler de l'eau instable, toutes les portions, y compris celles utilisées le premier jour, doivent être congelées avant les essais).

En raison de la durée de cet essai (21 jours) et de la nécessité de renouveler périodiquement les solutions, un nombre suffisant de portions d'échantillon doit être congelé afin de renouveler les solutions d'essai et de répéter l'essai si nécessaire (échantillons de réserve). Le volume minimal de portions congelées dépend de la toxicité de l'échantillon à analyser. Le volume d'échantillon nécessaire pour un essai semi-statique avec mise en expérimentation individuelle de dix daphnies dans 100 ml d'échantillon non dilué est de 9 litres ; des prélèvements supplémentaires seront nécessaires pour des échantillons dilués.

Lorsque l'essai est réalisé sur le site ou à proximité du lieu de prélèvement, il est admis d'utiliser des échantillons frais pour remplacer les solutions d'essai. Dans ce cas, les variations existantes sur le lieu de prélèvement sont intégrées dans la méthode d'essai.

6. Appareillages et matériels utilisés

6.1 Appareillage

- Pièce ou enceinte climatisée à 20 ± 2 °C permettant le respect de l'environnement de l'essai préconisé au **paragraphe 10.3.** ainsi que le contrôle du cycle jour/nuit et de l'intensité lumineuse
- Incubateur réfrigéré (4 °C)
- Congélateur (< -18 °C)
- Balance analytique de sensibilité 0,1 mg
- pH-mètre
- Oxymètre
- Luxmètre
- Conductivimètre
- Thermomètre ou sonde de température
- Kits de dureté, NH_4^+ et NO_2^-
- Spectrophotomètre



6.2. Petit matériel

Récipients d'essai, en matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante pour les essais (par exemple tubes à essais ou béchers en verre de 50 ml ou 100 ml), propres et non contaminés. Les récipients d'essai doivent être préalablement rincés à l'eau déionisée et ensuite séchés. Dans tous les cas, l'utilisation d'un matériel autre que le verre sera mentionnée dans le rapport d'essai.

7. Matériel biologique

Cet essai est basé sur l'utilisation de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) notée *D. magna* dans la suite du texte, de troisième génération au moins, obtenue par parthénogenèse acyclique dans des conditions d'élevage définies (**voir paragraphe 10.5.**).

Les animaux utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 24h (=néonates) et provenir de la seconde à la cinquième portée. Les daphnies doivent provenir d'un lot sain ne présentant aucun signe de stress tel que, par exemple, un taux de mortalité supérieur à 20 %, la présence de mâles, d'éphippies ou d'animaux décolorés, et doivent produire sans retard (à l'âge de 11 jours maximum) la première génération.

Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions d'élevage (lumière, température, milieu, alimentation et nombre par unité de volume) similaires à celles de l'essai. Si les conditions d'élevage diffèrent de celles de l'essai, il est recommandé d'acclimater une génération aux conditions d'essai pendant environ trois semaines afin d'éviter toute source de stress aux animaux parents.

8. Eau de dilution

Le milieu M4 préconisé par l'OCDE et détaillé dans la norme ISO 10706, Annexe A (voir ci-dessous) est utilisé pour la réalisation de cet essai. Pour ce milieu, la teneur en COT (Carbone organique total) n'est pas mesurée. Remarquons qu'une autre eau de dilution peut être utilisée. Sa composition ainsi que ses principales caractéristiques (par exemple, pH, dureté, COT, DCO) seront systématiquement mentionnées sur la feuille d'essai. Il n'est par exemple pas recommandé d'utiliser de l'eau de dilution contenant de l'EDTA (comme dans le M4) pour analyser la toxicité de composés contenant des métaux (chélation et donc diminution de la toxicité).

Le milieu doit être aéré jusqu'à 95 % de saturation en oxygène et le pH stabilisé à $7,8 \pm 0,2$. Si nécessaire, ce dernier peut être ajusté par ajout d'une solution de NaOH ou de HCl.

Préparation du milieu M4 :

Des solutions mères (solutions mères 1) séparées contenant chacune un des éléments traces nécessaires sont d'abord préparées dans de l'eau déionisée pour être ensuite combinées en une solution mère 2. Cette solution 2 contient tous les éléments traces nécessaires à la préparation du milieu (voir **tableau 1**).

Le milieu M4 est ensuite préparé en utilisant la solution mère 2 ainsi que les macro-nutriments et les vitamines dans les quantités présentées dans le **tableau 2**.



La préparation de la solution mère de vitamines se fait selon le **tableau 3** en ajoutant les 3 vitamines à 1 l d'eau déionisée. La solution de vitamines doit être ajoutée au milieu juste avant l'emploi. Elle peut être conservée congelée en petites portions aliquotes.

Pour éviter toute précipitation des sels lors de la préparation complète du milieu, ajouter les aliquotes des solutions mères à environ 800 ml d'eau déionisée et compléter à 1 l.

Tableau 1 : préparation des solutions mères des éléments traces individuels.

Solution(s) mère(s) 1 (substance unique)	Concentration dans l'eau déionisée (mg/l)	Concentration (en fonction du milieu M4)	Pour préparer la solution mère 2, ajouter à l'eau déionisée le volume suivant de solution mère 1 (ml/l)
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 fois	1
MnCl ₂ .4H ₂ O	7 210	20 000 fois	1
LiCl	6 120	20 000 fois	1
RbCl	1 420	20 000 fois	1
SrCl ₂ .6H ₂ O	3 040	20 000 fois	1
NaBr	320	20 000 fois	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 260	20 000 fois	1
CuCl ₂ .2H ₂ O	335	20 000 fois	1
ZnCl ₂	260	20 000 fois	1
CoCl ₂ .6H ₂ O	200	20 000 fois	1
KI	65	20 000 fois	1
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 fois	1
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 fois	1
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (a)	5 000	2 000 fois	
FeSO ₄ .7H ₂ O (a)	1 991	2 000 fois	
(a) Les solutions Na ₂ EDTA et FeSO ₄ sont préparées séparément, puis rassemblées et immédiatement mises en autoclave. Ce qui donne :			
Solution Fe-EDTA		1 000 fois	20

Tableau 2 : préparation du milieu M4.

Solutions mères	Concentration dans l'eau déionisée (mg/l)	Concentration (en fonction du milieu M4)	Volume de solution mère ajouté pour préparer le milieu (ml/l)
Solution mère 2 (éléments trace combinés)		20 fois	50
Solutions mères de macronutriments (une seule substance) :			
CaCl ₂ .2H ₂ O	293 800	1 000 fois	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	246 600	2 000 fois	0,5
KCl	58 000	10 000 fois	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000 fois	1
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	50 000	5 000 fois	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000 fois	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 fois	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000 fois	0,1
Solution mère de vitamines combinée	/	10 000 fois	0,1

Tableau 3 : préparation de la solution mère de vitamines.

Vitamine	Concentration (mg/l)	Concentration (en fonction du milieu M4)
Chlorhydrate de thiamine	750	10 000 fois
Cyanocobalamine (B12)	10	10 000 fois
Biotine	7,5	10 000 fois

9. Préparation des solutions des substances à expérimenter

9.1. Préparation des solutions mères

Si les composés à analyser se présentent sous forme de substances chimiques solubles, la solution mère de la ou des substances à expérimenter doit être préparée par dissolution d'une quantité connue de la ou des substances considérées dans un volume défini d'eau de dilution, d'eau déionisée ou d'eau distillée dans un récipient en verre. La solution mère doit être préparée juste avant la préparation des solutions d'essai à moins que la (les) substance(s) soit (soient) réputée(s) stable(s) dans des conditions de conservation définies, auquel cas la solution mère peut être préparée avant l'essai et conservée dans ces conditions.

Les solutions mères ou les suspensions de substance(s) de faible solubilité aqueuse peuvent être solubilisées ou dispersées directement dans le milieu par des dispositifs à ultrasons, et/ou des agitateurs ou des solvants ou des dispersants de faible toxicité vis-à-vis de *D. magna*. Si un solvant est utilisé, la concentration du solvant dans la solution mère doit être telle que la concentration dans la plus forte solution d'essai ne dépasse pas 0,1 ml/l.

Il convient d'éviter l'utilisation de solvants organiques. Si ceux-ci sont nécessaires, des solvants organiques tels que acétone, éthanol, méthanol, diméthylformamide, triéthylèneglycol ou des dispersants tels que Cremophor RH40, méthylcellulose 0,1 % et HCO-40 peuvent être utilisés pour obtenir une solution mère convenablement concentrée. Ils ne sont pas toxiques vis-à-vis de *D. magna* à des concentrations de 0,1 ml/l. En raison des différences de nature des substances chimiques, aucune procédure unique ne peut être conseillée pour la préparation des solutions mères de substances de faible solubilité aqueuse.

9.2. Préparation des solutions d'essai

Les solutions d'essai doivent être préparées par ajout des solutions mères ou des échantillons d'effluents à l'eau de dilution en quantités définies.

Lorsque les solutions mères sont préparées dans de l'eau déionisée ou distillée, il ne faut pas ajouter plus de 100 ml de solution mère par litre d'eau de dilution.

Les concentrations choisies peuvent également être préparées séparément par ajout direct de la substance d'essai à l'eau de dilution lorsque les quantités à ajouter peuvent être pesées, ou introduites à l'aide d'une pipette dans le cas des liquides, de manière précise.

Si le pH de l'échantillon n'est pas compris entre 6 et 9, l'essai doit être effectué après ajustement du pH à la valeur la plus proche (6 ou 9) à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium.



N.B. : l'analyse d'échantillons d'eau à des concentrations supérieures à 100 ml/l peut réduire la reproduction et la survie des daphnies en raison d'insuffisances dans le milieu (par exemple, la dureté). Il peut s'avérer nécessaire, pour déterminer les effets de ces insuffisances, d'ajouter à l'échantillon les mêmes sels que ceux de l'eau de dilution.

10. Mode opératoire

10.1. Témoins

Chaque essai doit comporter un témoin ne contenant aucune substance d'essai.

Lorsqu'un solvant ou un dispersant est utilisé, deux témoins sont nécessaires : l'un ne doit contenir aucun solvant ou dispersant, l'autre doit contenir le solvant ou le dispersant utilisé à une concentration égale à celle de la plus forte concentration d'essai.

10.2. Sélection des concentrations d'essai

Pour les eaux de surface et les eaux souterraines à priori peu toxiques, un test limite (10 répliques avec une concentration de 100 % de l'échantillon) peut être réalisé.

Pour les substances d'essai, les effluents industriels ou urbains et les extraits aqueux (eaux interstitielles, lixiviats, ...), au moins cinq concentrations d'essai disposées en une série géométrique avec un facteur de séparation ne dépassant pas 3,2 doivent être utilisées.

Lors de l'établissement de la gamme des concentrations, les points suivants doivent être pris en compte :

a) Si l'objectif est d'obtenir la NOEC (concentration d'essai la plus haute sans effet observé), la gamme de concentration doit inclure au moins une concentration produisant un effet significatif par rapport au témoin (LOEC : concentration d'essai la plus faible avec effet observé), précédée d'une NOEC. Si ce n'est pas le cas, l'essai doit être répété avec une concentration plus faible.

b) Si l'objectif est d'obtenir la EC_p (concentration produisant une réponse en pourcentage, généralement 20 % et/ou 50 %, p étant le pourcentage de réponse choisi) relative à l'effet sur la reproduction et la survie, il est souhaitable que deux concentrations d'essai soient supérieures à cette concentration EC_p. Dans le cas contraire, bien qu'il soit possible d'estimer la EC_p, l'intervalle de confiance obtenu sera très large et il peut s'avérer impossible d'évaluer de manière satisfaisante l'adéquation du modèle établi.

10.3. Environnement de l'essai

L'environnement de l'essai doit être exempt de poussières ou de vapeurs toxiques pour *D. magna*. Les solutions d'essai ne doivent pas être aérées.

La concentration en oxygène dissous dans les solutions d'essai doit être supérieure à 3 mg/l et le pH doit se situer dans la gamme comprise entre 6 et 9 et ne doit pas varier de plus de 1.5 unités au cours de l'essai. La dureté doit avoir une valeur supérieure à 140 mg/l (exprimée en CaCO₃). La température des solutions d'essai doit être maintenue dans une gamme comprise entre 18 et 22 °C et ne pas varier de plus de 2 °C pendant toute la durée de l'essai.



Le cycle d'essai doit être de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. L'intensité lumineuse doit de préférence être comprise entre 600 lux et 800 lux à la surface du récipient d'essai, mais ne pas excéder 1200 lux.

10.4. Fréquence de renouvellement des solutions d'essai

Le renouvellement des solutions se fait au moins deux fois par semaine (par exemple : mardi et vendredi ou lundi et jeudi).

10.5. Introduction des animaux dans le système d'essai

Pour l'essai, seules les daphnies âgées de moins de 24 heures peuvent être utilisées. Afin d'obtenir les jeunes d'âge désiré, il est nécessaire de sélectionner les daphnies productrices au plus tôt 24 heures avant le début de l'essai.

Les daphnies utilisées lors des essais proviennent au minimum de la troisième génération par parthénogenèse acyclique des daphnies. Afin d'assurer la production de jeunes de deuxième à cinquième portée, le système d'élevage suit l'âge des daphnies mères. Par exemple, les daphnies passent par 3 « niveaux » : le niveau des « jeunes » (daphnies âgées de 1 à 2 j. jusque 7 à 8 j.), le niveau des « productrices première semaine » (daphnies âgées de 8 à 9 j. jusque 14 à 15 j.) et le niveau des « productrices deuxième et/ou troisième semaine » (daphnies âgées de 15 à 16 j. jusque 28 à 29 j.). Seuls les niveaux des productrices (première, deuxième et/ou troisième semaine) sont utilisés pour produire les jeunes de moins de 24 h. servant aux essais.

Dix répliques par concentration et dix répliques témoins, contenant environ 50ml de solution d'essai et une daphnie de moins de 24 heures, sont lancés.
La durée d'exposition des organismes doit être de 21 jours.

10.6. Alimentation des organismes

Les animaux parents sont nourris avec des cellules vivantes de deux espèces différentes parmi les espèces suivantes : *Chlorella* spp, *Pseudokirchneriella subcapitata* ou *Scenedesmus subspicatus*.

La ration de nourriture donnée est de 0,1 mg C_{org} /daphnie/jour du jour 0 au jour 5 de l'essai puis de 0,15 mg C_{org} /daphnie/jour à partir du jour 6 jusqu'à la fin de l'essai.

Les algues sont données sous forme de suspensions algales. Celles-ci sont obtenues à partir de cultures d'algues centrifugées deux fois à 4000 tr/min. durant 20 minutes. Elles sont remises en suspension dans du milieu M4 frais après chaque centrifugation.

10.7. Observations et mesures

Chaque jour ouvrable pour lequel une production est observée, les descendants vivants sont dénombrés et retirés du récipient contenant la mère.

Le nombre de parents, de descendants, de mâles ou d'ephippia sont consignés.

Les facteurs confondants tels que mesures de pH, O_2 , NO_2^- , NH_4^+ sont mesurés en début et en fin de test dans le contrôle et la plus forte concentration et au jour 7 et au jour 14 dans l'ancien et le nouveau milieu de ces solutions.



Si les valeurs de la plus forte concentration sont significativement différentes de celles du contrôle, les mesures doivent être effectuées dans les dilutions.

La conductivité est mesurée sur l'échantillon ou toute portion d'échantillon.

La mesure de salinité est applicable à des cas spécifiques (par exemple, eau interstitielle de sédiments salins).

11. Analyse des données et expression des résultats

Dans le cas d'essais sur produits chimiques, lorsque la concentration effective de la substance d'essai se situe à moins de 20 % de la concentration nominale ou initiale, les résultats doivent être exprimés en termes de concentration nominale ou initiale.

Lorsque l'écart de la concentration effective de la substance d'essai est supérieur à ± 20 % de la concentration nominale ou initiale, il est recommandé d'exprimer les résultats en termes de concentration moyenne pondérée dans le temps.

Lorsque l'un des parents s'avère être un mâle, les répliques considérées ne doivent pas être considérées pour l'analyse des données de reproduction.

Compter le nombre total de descendants issus de chaque parent et calculer le nombre moyen (à la décimale la plus proche) de descendants vivants issus de chaque parent vivant par concentration d'essai.

La capacité reproductrice doit être exprimée comme le nombre total de descendants vivants par parent vivant (pour chaque répétition) à la fin de l'essai. Si les animaux parents sont exposés individuellement, la capacité reproductrice peut seulement être exprimée comme le nombre moyen de descendants vivants par parent vivant à la fin de l'essai. Lorsque plusieurs organismes ont été exposés dans un récipient donné, la capacité reproductrice doit être exprimée en « nombre total de descendants vivants par parent vivant ».

Comparer le nombre moyen de descendants vivants par parent dans chaque concentration d'essai à celui des témoins par des tests de Dunnett ou Williams à condition que l'homogénéité de la variance entre les concentrations d'essai soit montrée par l'analyse ANOVA (analyse de la variance). Si les variances ne sont pas homogènes, les transformer et procéder à une nouvelle évaluation des données.

La plus faible concentration d'essai qui fournit une réponse statistiquement différente de la réponse des témoins est la LOEC (concentration d'essai minimale pour laquelle un effet est observé).

La plus forte concentration d'essai inférieure à la LOEC qui fournit une réponse statistiquement similaire à celle des témoins est la NOEC (concentration d'essai la plus haute sans effet observé).

La concentration d'essai produisant différents niveaux d'inhibition de production de descendants plus des limites de confiance à 95 % peut être estimée en réalisant différentes analyses de régression comme par exemple les méthodes des probits, logit, weibul, des moyennes mobiles, Spearman-Kärber. Les concentrations d'inhibition de 10 %, 20 % et 50 % (par exemple EC10, EC20, EC50), ou les concentrations létales (LCx), peuvent être calculées au moyen de ces méthodes qui sont également disponibles sous forme de programmes



informatiques. Les données obtenues doivent également être reportées et tracées sur des axes log-probit afin de représenter les résultats informatiques.

12. Validité des résultats

Pour considérer les résultats comme valides, les conditions suivantes doivent être réalisées :

Le nombre total d'adultes morts et de mâles dans les témoins doit être inférieur ou égal à 20 % en fin d'essai. Le nombre moyen de descendants vivants par parent vivant dans les récipients témoins doit être de minimum 60 individus à la fin de l'essai. Pour que ce critère soit atteint, il convient que les individus témoins aient atteint leur maturité sexuelle et aient produit leur première couvée dans les 11 jours à partir du début de l'essai.

Le coefficient de variation (CV) de la reproduction dans les témoins doit être inférieur ou égal à 20 %.

Le critère de validité « nombre moyen de descendants vivants par parent vivant » est vérifié par une carte de contrôle basée sur la moyenne et avec affichage des limites d'acceptation. En cas de non atteinte de la limite d'acceptation (nombre moyen de descendants vivants par parent vivant dans les récipients témoins inférieur à 60 individus en fin d'essai), les résultats des échantillons ne pourront être validés et l'essai devra être recommencé dans la mesure du possible (disponibilité de l'échantillon).

13. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne et éventuellement à la méthode normalisée ;
- l'identification complète de l'échantillon ;
- la date de prélèvement ; ceci qu'il ait été réalisé par le laboratoire ou par le client ;
- la date d'analyse ;
- les résultats du dénombrement conformément au **paragraphe 10** ;
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

14. Références

Basé sur la **Norme internationale ISO 10706:2000(F)** : Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*).