

E-V-3v1-Détermination de la toxicité aiguë (EC50-48h) par *Daphnia magna* Straus – Méthode conventionnelle (daphnies issues d'élevage)

1. Préambule

Il existe deux méthodes de détermination de la toxicité aiguë par *Daphnia magna* : la présente méthode dite « conventionnelle » qui utilise des daphnies de 3^{ème} génération maintenues en élevage et la méthode dite « en kit » qui utilise des daphnies directement écloses à partir d'œufs dormants (éphippies ; kit disponible auprès de la société belge Microbiotests Inc.). Cette dernière méthode est particulièrement bien adaptée à l'autocontrôle puisqu'elle ne nécessite pas le maintien d'un élevage de daphnies, mais exige la même rigueur dans sa mise en œuvre, en particulier dans le respect des conditions d'ambiance (température, milieu, ...). Différentes études comparatives de la sensibilité des deux méthodes ont été réalisées : aucune différence significative n'a été constatée entre les deux méthodes.

2. Objet

Cette procédure décrit la méthode de détermination de la toxicité aiguë d'échantillons liquides vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) suivant la méthode conventionnelle impliquant l'utilisation de daphnies issues d'un élevage. Le paramètre d'effet est l'inhibition de la mobilité.

3. Domaine d'application

Cette procédure s'applique aux échantillons liquides tels les eaux usées industrielles et les eaux usées urbaines ou agricoles, épurées ou non, les eaux douces de surface et souterraines, les eaux interstitielles, les lixiviats de résidus solides, les 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, ou tout autre échantillon aqueux.

4. Définitions et abréviations

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

EC50-24/48h : concentration ou dilution effective estimée qui immobilise 50 % des daphnies après 24/48 h d'exposition.

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.

5. Principe

L'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* est utilisée comme mesure de la toxicité aiguë des substances et des échantillons aqueux soumis à l'essai.



Pendant l'essai, les daphnies sont exposées pendant 24 et/ou 48 heures à des concentrations ou dilutions graduelles de la substance ou de l'échantillon dans les conditions définies par la norme ISO 6341 et décrites dans le mode opératoire présenté ci-dessous (**point 10**). La relation concentration-effet est déterminée par analyse statistique. L'eau de dilution sert de témoin. La toxicité de la substance ou de l'échantillon est exprimée en concentration ou dilution qui en 24 et/ou 48 heures immobilise 50 % des *D. magna* mises en expérimentation, respectivement EC₅₀-24h et/ou EC₅₀-48h.

La toxicité d'un échantillon ou d'une substance en solution peut également être exprimée en unités de toxicité : TU₅₀-24h (48h) = 100/EC₅₀-24h (48h).

6. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Les échantillons doivent être soumis à l'essai le plus rapidement possible après le prélèvement, ou éventuellement congelés puis décongelés, filtrés ou centrifugés.

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, idéalement dans les 6 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. Cette congélation, bien que prévue par la norme ISO 6341, n'est toutefois pas à privilégier dans la mesure où une modification de la toxicité est généralement constatée suite à la congélation.

7. Appareillages et matériels utilisés

7.1. Appareillage

- Pièce ou enceinte climatisée à 20 ± 2 °C
- Balance analytique de sensibilité 0.1 mg
- pH-mètre
- Oxygène
- Conductivimètre
- Kit de mesure de la dureté de l'eau

7.2. Petit matériel

- Ballons jaugés en verre (pour la préparation des solutions et des dilutions) ;
- Entonnoirs en verre ;
- Berlins en verre de 600 ml par exemple (pour l'élevage des daphnies) ;
- Berlins en verre de 50 ml ;
- Bêchers de 30 ml en polypropylène par exemple (récipients d'essai) ;
- Verres de montre (utilisés comme couvercles pour les récipients d'essai) ;
- Plateaux (pour disposer les récipients d'essai) ;
- Pipettes pasteurs ;
- Poires d'aspiration (2 ml) (pour la récupération des daphnies).

La verrerie utilisée doit être propre. Le nettoyage s'effectue à l'aide d'un programme comportant de nombreux rinçages (détergent, rinçage, rinçage à l'eau acidifiée, sept rinçages à l'eau déminéralisée et séchage). Elle doit être rincée avec de l'eau déionisée avant utilisation (il en est de même pour les bêchers en polypropylène).

8. Matériel biologique

Les essais sont réalisés sur *Daphnia magna Straus* (*Cladocera, Crustacea*) de troisième génération de descendants au moins (3^{ème} ponte), obtenues par parthénogenèse acyclique. Les individus utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 24 heures (= néonates). Il convient donc d'isoler les femelles porteuses dans du milieu frais et de recueillir les nouveaux-nés libérés dans les 24 h suivant l'isolement de la mère.

Les *D. magna* doivent provenir d'une culture saine, ne montrant pas de signe de stress (mortalité < 20 % en 2 jours, absence de mâles ou d'ephippies, pas de décoloration des individus, etc).

L'âge et l'origine des organismes doivent figurer dans le rapport d'essai car ils ont un impact sur la sensibilité aux substances toxiques.

9. Réactifs utilisés

9.1. Eau

Il convient d'utiliser de l'eau déionisée ou d'une pureté équivalente (conductivité < 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$, COT < 5ppb) pour la préparation des solutions et de l'eau de dilution.

Il convient d'éviter toute contamination de l'eau par des substances inorganiques ou organiques pendant la préparation et la conservation.

9.2. Solution de chlorure de calcium (solution 1)

Dissoudre 11.76 g (balance analytique précise au 10^{-4} g) de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau déionisée et compléter à 1 litre. La solution, conservée au frigo (4 °C), peut être utilisée pendant 4 mois.



9.3. Solution de sulfate de magnésium (solution 2)

Dissoudre 4.93 g (balance analytique précise au 10^{-4} g) de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau déionisée et compléter à 1 litre. La solution, conservée au frigo (4°C), peut être utilisée pendant 4 mois.

9.4. Solution d'hydrogénocarbonate (solution 3)

Dissoudre 2.59 g (balance analytique précise au 10^{-4} g) d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) dans de l'eau déionisée et compléter à 1 litre. La solution, conservée au frigo (4°C), peut être utilisée pendant 4 mois.

9.5. Solution de chlorure de potassium (solution 4)

Dissoudre 0.23 g (balance analytique précise au 10^{-4} g) de chlorure de potassium (KCl) dans de l'eau déionisée et compléter à 1 litre. La solution, conservée au frigo (4°C), peut être utilisée pendant 4 mois.

9.6. Eau de dilution (ED)

Pour un volume total de 1 litre, mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions (**points 9.2. à 9.5.**) avec de l'eau déionisée (de conductivité $< 10\mu\text{S/cm}$). L'eau de dilution doit être aérée jusqu'à stabilisation du pH (minimum 2 heures, de préférence une nuit). Le pH doit être de 7.8 ± 0.2 ; si nécessaire, ajuster par ajout d'une solution de NaOH (1N) ou de HCl (1N). La dureté totale doit être de 250 ± 25 mg/l en CaCO_3 (soit $14,0 \pm 1,4$ degré allemand équivalent à $25 \pm 2,5^\circ\text{F}$) et la concentration en oxygène dissous supérieure à 7 mg/l.

Lors de la préparation des solutions 1 à 4 (**points 9.2 à 9.5**), un carnet de suivi pour l'eau de dilution doit être complété. Les éléments suivants doivent y figurer :

- la dénomination exacte de la substance utilisée ;
- la date de préparation de la solution ;
- la pesée réelle effectuée ;
- la balance utilisée.

Lors de la préparation de l'eau de dilution, le carnet de suivi pour l'eau de dilution doit être complété. Les éléments suivants doivent y figurer :

- la date de préparation des solutions mères 1 à 4 ;
- la date de préparation de l'ED et le volume préparé.

9.7. Solution de la substance de référence dichromate de potassium (solution mère)

Préparer une solution de dichromate de potassium à 1g/l en dissolvant par exemple 100 mg de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (pesés sur une balance analytique précise au 10^{-4} g) dans 100ml d'eau déionisée. La solution peut se conserver pendant 4 mois au frigo (4°C) et à l'obscurité.



9.8. Solution d'essai de la substance de référence à 10 mg/l

Le jour du test, diluer 100 fois la solution mère de dichromate de potassium (**point 9.7**) dans de l'eau de dilution. Par exemple, pipeter 1 ml de solution mère dans un jaugé de 100 ml et ajuster au trait avec de l'eau de dilution.

10. Mode opératoire

10.1. Préparation des daphnies en vue d'essais

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

Les daphnies utilisées lors des essais proviennent au minimum de la troisième génération de descendants (3^{ème} ponte) par parthénogenèse acyclique. Afin d'assurer la production de jeunes de deuxième à cinquième portée, le système d'élevage suit l'âge des daphnies mères. Généralement, les daphnies passent par 3 « niveaux » : le niveau des jeunes, le niveau des productrices première semaine et le niveau des productrices deuxième et/ou troisième semaine. Seuls les niveaux des productrices (première, deuxième et/ou troisième semaine) ayant leur troisième porté sont utilisés pour produire les jeunes servant aux essais.

10.2. Préparation des dilutions ou concentrations de l'échantillon à tester

La gamme de dilutions préparée est fonction de la toxicité de l'échantillon et du paramètre d'effet ciblé (EC₅₀-24h ou EC₅₀-48h). Un test préliminaire peut être nécessaire pour déterminer la gamme de concentrations utile.

Si le test se déroule en deux étapes (préliminaire + définitif), il est souhaitable que la gamme de dilution choisie pour le test définitif résulte d'au moins trois pourcentages d'immobilisation compris entre 10 et 90 %.

10.2.1. Dilutions des échantillons

Avant de préparer les dilutions, les échantillons et l'eau de dilution sont amenés à une température de 20 ± 2 °C. Le pH et la concentration en oxygène dissous sont mesurés. Si la concentration en oxygène dissous des échantillons est inférieure à 3 mg/l, elle peut être amenée à minimum cette valeur (en suivant les instructions reçues avec l'échantillon) par aération de l'échantillon. Le pH de l'échantillon peut également être corrigé (en suivant les instructions reçues avec l'échantillon) lorsqu'il se situe en dehors de l'intervalle de tolérance (5,5 à 9) pour le paramètre d'effet observé par ajout de HCl ou de NaOH (généralement une solution concentrée à 1 M est utilisée). Cette correction est optionnelle et se fait si l'objectif est d'évaluer la toxicité aiguë en ne tenant pas compte des effets du pH. Si une correction est appliquée, il convient également de faire le test sans correction de pH car celle-ci est susceptible d'altérer la nature de l'échantillon.

Pour les échantillons environnementaux, les dilutions se font habituellement dans les berlines en polypropylène (s'il n'y a pas de contre indication) à l'aide de pipettes. Les récipients en verre sont requis dans le contexte « substances chimiques ». Les dilutions peuvent également se faire par dilutions successives de moitié dans des jaugés de 200 ml et 100 ml :

- remplir le jaugé de 200 ml au trait avec l'échantillon.
- compléter au trait un jaugé de 100 ml noté « dilution 100 % » à partir du jaugé de 200 ml



- il reste alors 100 ml d'échantillon dans le jaugé de 200 ml, l'ajuster au trait avec de l'ED (dilution 2 fois)
- compléter au trait un second jaugé de 100 ml (noté 50 %) à partir du jaugé de 200 ml ;
- procéder ainsi de suite jusqu'à l'obtention du nombre de dilutions voulues.

10.2.2. Préparation des solutions des substances à expérimenter

10.2.2.1. Préparation des solutions mères

Les solutions mères des substances à expérimenter doivent être préparées par dissolution d'une quantité connue de la substance à expérimenter dans un volume défini d'eau de dilution (**point 9.6.**), d'eau déionisée (**point 9.1.**) dans un récipient en verre. Elles doivent être préparées au moment de l'emploi à moins que la substance en solution soit connue pour être stable, auquel cas la solution mère peut être préparée jusqu'à 2 jours avant l'essai. Si un solvant est utilisé, la concentration du solvant dans la solution d'essai finale ne doit pas dépasser 0.1 ml/l. Dans ce cas, deux essais témoins, l'un ne contenant aucun solvant, l'autre contenant la concentration maximale en solvant, doivent être inclus dans l'essai.

10.2.2.2. Préparation des solutions d'essai

Les solutions d'essai doivent être préparées par ajout des solutions mères (**point 10.2.2.1**) à l'eau de dilution (**point 9.6.**) en quantités définies. Généralement, les solutions sont préparées dans des ballons jaugés en verre d'une contenance de 100 ml.

Lorsque les solutions mères sont préparées dans de l'eau déionisée ou distillée, il est recommandé de ne pas ajouter plus de 10 ml de solution mère par litre d'eau de dilution.

10.3. Distribution des solutions dans les berlins

Les solutions à tester sont dispensées, à raison de 20 ml, dans les récipients adéquats, généralement des berlins en polypropylène de 30 ml pour les échantillons environnementaux (ou des berlins en verre de 50 ml en cas de contre indication). Pour chaque concentration ou dilution ainsi que pour le(s) témoin(s), quatre répliques sont préparées.

10.4. Transfert des daphnies dans l'échantillon

Cette opération doit être terminée au plus tard 24 heures après la préparation des daphnies en vue de l'essai (**point 10.1.**).

A l'aide d'une pipette adéquate (par exemple une pipette pasteur, côté col large et non coupant), transférer 5 daphnies dans les berlins en débutant par la concentration la plus faible. (Attention, une pipette qui a été en contact avec l'échantillon ou la substance ne doit plus être mise en contact avec le réservoir de daphnies).

Recouvrir chaque berlin contenant 5 daphnies d'un verre de montre.

Incuber à 20 ± 2 °C à l'obscurité.

Si certains berlins ne contiennent pas 5 daphnies, le nombre total de daphnies transférées dans le récipient d'essai doit être noté sur la feuille d'essai afin d'en tenir compte lors du traitement des résultats.



10.5. Dénombrement des daphnies après 24 heures

Vingt-quatre heures après l'introduction des daphnies dans les différentes dilutions de l'échantillon, les daphnies immobiles sont dénombrées dans chaque récipient. Les individus incapables de se déplacer dans les quinze secondes qui suivent une légère agitation du récipient sont considérés comme étant immobilisés, même si des mouvements d'antennes peuvent encore être décelés.

Si l'essai ne dure que 24 h, immédiatement après le dénombrement, la concentration en oxygène dissous est mesurée pour la plus faible concentration pour laquelle toutes les daphnies sont immobilisées (1 réplique).

Si l'essai dure 48 h, les berlins sont replacés à l'obscurité.

10.6. Dénombrement des daphnies après 48 heures

Quarante-huit heures après la mise en contact des daphnies avec l'échantillon ou la substance d'essai, effectuer le dénombrement tel que décrit ci-dessus (**point 10.5.**).

Mesurer la concentration en oxygène dissous pour la plus faible concentration pour laquelle toutes les daphnies sont immobilisées ou, s'il n'y en a pas, pour la concentration la plus élevée pour laquelle une immobilisation partielle est observée (1 réplique). Si celle-ci est inférieure à 2 mg/l, mesurer la concentration en oxygène dissous pour la concentration suivante ayant une immobilisation partielle supérieure à 10 % (1 réplique), et ainsi de suite jusqu'à ce que le critère de validité du test (teneur en O₂ ≥ 2 mg/l) soit rencontré.

11. Essai de contrôle

L'essai de contrôle avec la substance de référence est réalisé chaque semaine d'essai et à chaque fois qu'un élément du mode opératoire de l'essai ou de l'élevage est modifié. A cette fin, préparer les dilutions suivantes dans de l'eau de dilution à partir de la solution d'essai (**point 9.8.**). Par exemple dans des jaugés de 100 ml : solutions à 2.4 mg/l ; 1.8 mg/l ; 1.3 mg/l ; 1,0 mg/l ; 0.75 mg/l ; 0.56 mg/l ; 0.42 mg/l en K₂Cr₂O₇.

Suivre ensuite les instructions détaillées dans les **points 10.3. à 10.5.** du mode opératoire. Les valeurs des essais de contrôles sont reportées en carte de contrôle d'acceptation, la EC₅₀-24 h du dichromate de potassium devant être comprise entre 0,6 et 2,1 mg/l. En cas de dépassement des limites d'acceptation, les résultats des échantillons ne pourront être validés et l'essai devra être recommencé dans la mesure du possible (selon la disponibilité de l'échantillon).

12. Estimation de la EC₅₀ et expression des résultats

Les EC₅₀-24h et EC₅₀-48h sont déterminées par traitement informatique (TOXKIT DATA Treatment, par exemple) utilisant les méthodes statistiques binomiales, moyenne mobile et probit.

Sur la feuille d'essai, la EC₅₀-24h, EC₅₀-48h ainsi que les limites correspondant à 0 % et à 100 % d'immobilisation sont exprimées :

- en pourcentage dans le cas des effluents ou d'autres échantillons aqueux de composition inconnue ;
- en milligrammes par litre dans le cas des substances chimiques.



13. Validité des résultats

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

- a) la teneur en oxygène dissous en fin d'essai (mesurée comme indiqué aux **points 10.5. et 10.6.**) est supérieure ou égale à 2 mg/l ;
- b) le pourcentage d'immobilisation observé dans les récipients témoins est inférieur ou égal à 10 % ;
- c) la EC₅₀-24h du dichromate de potassium de l'essai de contrôle (point 11.) est comprise entre 0.6 mg/l et 2.1 mg/l.

14. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Wallonie et éventuellement à la méthode normalisée ;
- l'identification complète de l'échantillon ;
- les méthodes de préparation des échantillons (décantation, décongélation) ;
- l'origine et l'âge des *Daphnia magna* utilisées ;
- 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 aux **points 10.5. et 10.6.** ;
- les résultats de l'essai sous forme de EC₅₀-24h et éventuellement EC₅₀-48h, la méthode suivant laquelle ils ont été calculés et éventuellement les limites de confiance à 95 % ;
- la concentration minimale correspondant à 100 % d'immobilisation et la concentration maximale correspondant à 0 % d'immobilisation en 24 h et, éventuellement en 48 h ;
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

15. Références

Norme internationale ISO 6341: Qualité de l'eau – Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) – Essai de toxicité aiguë.

Recommandations pour la mise en élevage des daphnies et les recommandations générales relatives à cet élevage :

Environment Canada 1990. Biological test method. Reference method for determining acute lethality of effluents to *Daphnia magna*. EPS 1 /RM/14. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

Greene, J.C., Bartels, C.L., Warren-Hicks, W.J., Parkhurst, B.P., Linder, G.L., Peterson, S.A. and Miller, W.E. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, Oregon.

US. EPA 1982. Daphnid Acute Toxicity Test. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Toxic Substances. Document EG-1 /ES-I, Washington, D.C.



US. EPA 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms.

W.G. Peltier and C.I. Weber (eds). US. Environmental Protection Agency Report EPA/600/4-85/013, Cincinnati, Ohio.

POSTMA, J.F. et al (2002): Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 53 (2), p. 226-237.

ORIGINAL 2014

