

E-V-3v2-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 (éhippides ; 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 24/48h 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 $3,4 \pm 2$ °C sur le lieu du prélèvement et conservé à cette température afin d'être analysé dans les 48 heures qui suivent le prélèvement. ~~S'il ne peut être analysé dans les 48h suivant le prélèvement, l'échantillon peut également être congelé pour être expérimenté dans les 2 mois 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 ;
- Bêchers en verre de 600 ml par exemple (pour l'élevage des daphnies) ;
- Bêchers 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 béciers en polypropylène).

8. Matériel biologique

Les essais sont réalisés sur *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*) âgées de moins de 24h, obtenues par parthénogenèse acyclique dans des conditions d'élevage spécifiées. Il convient qu'elles ne soient pas issues d'une première génération de descendants. ~~de troisième génération de descendants au moins (3^{ème} ponte), obtenues par parthénogenèse aeyclique. Les individus utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 24 heures (= néonates).~~

Afin de récolter des néonates de moins 24h, il convient d'isoler les femelles porteuses dans du milieu frais et de recueillir les nouveau-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'éphippies, pas de décoloration des individus, aucun retard ne doit être observé dans l'obtention de la première ponte, 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 µS/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 (CaCl₂.2H₂O) 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 (MgSO₄.7H₂O) 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 (NaHCO₃) 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 $< 10\mu\text{S}/\text{cm}$). L'eau de dilution doit être aérée jusqu'à stabilisation du pH (minimum 2 heures, de préférence une nuit). Le pH doit être de $7,8 \pm 0,52$; si nécessaire, ajuster par ajout d'une solution de NaOH (1N) ou de HCl (1N). La dureté totale doit être de ~~22550~~ 5025 mg/l en CaCO_3 (soit ~~124,60~~ $24,84$ degré allemand équivalent à ~~22,55~~ $52,5$ °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.

Attention à la manipulation de cette substance cancérigène ! : porter tablier, gants et éviter toute inhalation de cette poudre toxique.

Pour plus d'information, la fiche de sécurité de cette substance est disponible sur le lien suivant (fiche INRS FT-180) :

<http://www.inrs.fr/publications/bdd/doc/fichetox.html?refINRS=FT%20180>.

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 (< 24h) 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 portée sont utilisés pour produire les jeunes servant aux essais.

10.2. Préparation de l'échantillon

Avant la préparation des dilutions, l'échantillon et l'eau de dilution sont amenés à une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. L'échantillon est mis à décanter minimum 2h. Le pH, la conductivité, et la concentration en oxygène dissous sont mesurés dans l'échantillon décanté et non dilué.

Si la concentration en oxygène dissous des échantillons est inférieure à 40% de la valeur de saturation, elle peut être amenée à minimum cette valeur (suivant instructions reçues avec l'échantillon) par aération de l'échantillon au moyen de méthodes appropriées (par exemple aération ou agitation), pendant un temps inférieur à 20 minutes. Il convient d'éviter toute sursaturation. Si une aération a été effectuée, celle-ci doit être consignée dans le rapport d'essai.

Le pH de l'échantillon peut également être corrigé (suivant instructions reçue avec l'échantillon). Cela est envisagé lorsque des effets toxiques sont observés aux concentrations/dilutions où le pH n'est pas compatible avec la survie des organismes (c'est-à-dire en dehors de l'intervalle de tolérance 6 à 9). Dans ce cas, l'essai peut être répété avec le pH qui aura été ajusté par ajout de HCl ou de NaOH (généralement utilisation d'une solution 1 M ; veiller à ce que la fraction volumique ajoutée ne dépasse pas 5 %). Attention que l'ajustement de pH peut dénaturer l'échantillon. C'est pour cette raison qu'il est important de d'abord réaliser l'essai sur échantillon non ajusté. Si l'ajustement de pH donne lieu à l'apparition de matières en suspension, il convient de réaliser une nouvelle décantation. Tout ajustement de pH doit être consigné dans le rapport d'essai.

10.3. 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 (EC_{50-24h} ou EC_{50-48h}). 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 %. Il convient que l'essai comprenne au moins 5 dilutions, en plus du témoin.

10.3.1. Dilutions des échantillons

~~Avant de préparer les dilutions, les échantillons et l'eau de dilution sont amenés à une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. 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 béchers 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.

10.3.2. Préparation des solutions des substances à expérimenter

10.3.2.1. 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.

10.3.2.2. Préparation des solutions d'essai

Les solutions d'essai doivent être préparées par ajout des solutions mères (**point 10.3.2.1**) 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.

10.4. Distribution des solutions dans les béchers

Les solutions à tester sont dispensées, à raison de 20 ml, dans les récipients adéquats, généralement des **béchers** en polypropylène de 30 ml pour les échantillons environnementaux (ou des **béchers** 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.

10.5.4. 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 **béchers** en débutant par la concentration la plus faible. Veiller à transférer le moins de liquide possible lors de ce transfert (si possible réaliser le transfert de 5 daphnies en une seule fois dans une même goutte d'eau).

Lors de ce transfert, il est important de veiller à ce que les daphnies ne soient pas retenues à l'interface milieu/air. Afin d'éviter ce problème, il est parfois nécessaire d'injecter les daphnies sous la surface du milieu à tester. Dans ce cas, il est alors important, afin d'éviter la contamination du réservoir de daphnies, de changer de pipette pour chaque transfert. Une autre solution, consiste en l'utilisation d'un réservoir intermédiaire pour chaque concentration de l'échantillon à tester, réservoir contenant 20 daphnies au moins (4x5). Réaliser les transferts dans l'ordre croissant des concentrations en partant du témoin. Dans ce cas, la concentration/dilution du milieu d'essai est minimisée.

Recouvrir chaque **bécher** contenant 5 daphnies d'un verre de montre afin de minimiser les risques d'évaporation et de contamination.

Incuber à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ à l'obscurité.

Si certains **bécher**s 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.

10.6. 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 la mise en contact est poursuivie à 48 h, immédiatement après le dénombrement de 24h, la concentration en oxygène dissous est mesurée pour la plus faible concentration pour laquelle toutes les daphnies sont immobilisées (1 réplique). Passer ensuite au point 10.7.

Si la mise en contact n'est pas poursuivie au-delà de 24h, mesurer la concentration en oxygène dissous immédiatement après le comptage dans les récipients du lot témoin et du lot d'essai le plus concentré. Si la concentration en oxygène dissous du lot d'essai le plus concentré est inférieure à 2 mg/l, la concentration en oxygène dissous doit être mesurée dans les autres lots d'essai afin de vérifier si leur concentration est conforme à la concentration minimale requise de 2 mg/l. Tous les lots d'essai dont la concentration en oxygène dissous est inférieure à 2 mg/l doivent être exclus du calcul final. Le pH et la conductivité des lots d'essai sont également mesurés de la même manière (limites : 6-9 pour le pH et 6500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pour la conductivité).

Ces mesures sont consignées dans le rapport d'essai.

Les béchers sont remis à l'obscurité si la mise en contact doit être poursuivie.

~~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 berlines sont replacés à l'obscurité.~~

10.7. 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 10.6.**).

Mesurer la concentration en oxygène dissous immédiatement après le comptage dans les récipients du lot témoin et du lot d'essai le plus concentré. Si la concentration en oxygène dissous du lot d'essai le plus concentré passe en dessous de 2mg/l, la concentration en oxygène dissous doit être mesurée dans les autres lots d'essai afin de vérifier si leur concentration est conforme à la concentration minimale requise de 2 mg/l. Tous les lots d'essai dont la concentration en oxygène dissous est inférieure à 2 mg/l doivent être exclus du calcul final. Le pH et la conductivité des lots d'essai sont également mesurés de la même manière (limites : 6-9 pour le pH et 6500 µS/cm pour la conductivité).

Ces mesures sont consignées dans le rapport d'essai.

~~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 10.4. à 10.6.** du mode opératoire. Les valeurs des essais de contrôles sont reportées en carte de contrôle d'acceptation, la EC₅₀-24h du dichromate de potassium devant être comprise entre 0,6 et 2,1 mg/l. En cas de dépassement des limites ~~d'acceptation d'action (3s), la fiabilité des résultats devra être évaluée et, le cas échéant, 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.~~

Important : les taux d'immobilisation des lots d'essai dont la concentration en oxygène dissous est inférieure à 2 mg/l doivent être exclus du calcul.

La EC₅₀-24h et, le cas échéant, la EC₅₀-48h sont déterminées par traitement informatique utilisant des méthodes statistiques. Cette méthode présente l'avantage, notamment, de déterminer les intervalles de confiance.

Les logiciels suivants sont disponibles sur simple demande chez Microbiotests :

- « LC50.exe » de l'US-EPA (méthode statistique binomiale, moyenne mobile et probit).
- REGTOX adapté au Daphtokit¹ (choix entre les modèles Hill, Weibull et Log-normal).

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 les informations suivantes :

Intitulé de la méthode d'essai	Détermination de la toxicité aiguë par <i>Daphnia magna</i> (inhibition de la mobilité)
Référence de la méthode utilisée	ISO6341 (2012) + référence méthode CWEA (élevage ou kit)
Identification du client	
Identification complète de l'échantillon	Référence échantillon du client + référence interne Date de réception Prélèvement réalisé par le client ou par le laboratoire + date de prélèvement Méthode de conservation de l'échantillon
Identification du laboratoire effectuant	Nom et adresse du laboratoire, nom du technicien, nom de la personne qui valide le rapport

¹ Il s'agit d'une adaptation du programme statistique « open access » développé par E. Vindimian. Plus d'information sur le lien suivant : http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html

Mis en forme : Avec puces + Niveau : 1 + Alignement : 0.63 cm + Tabulation après : 1.27 cm + Retrait : 1.27 cm, Taquets de tabulation : Pas à 2.65 cm

Mis en forme : Couleur de police : Noir

L'analyse																																																																												
Méthode(s) de préparation de l'échantillon	Précisez si il y a eu congélation, décantation, filtration, centrifugation, ajustement (pH, O ₂) Précisez le pH, l'oxygène dissous et la conductivité sur l'échantillon initial Précisez l'aspect de l'échantillon initial Rem: s'il y a lieu d'ajuster le pH, celui-ci sera ajusté lors d'un 2ème essai. Le 1er essai étant réalisé sur échantillon non ajusté.																																																																											
Daphnies utilisées pour l'essai	Précisez l'origine des daphnies utilisées (élevages + souche, kit) et leur âge																																																																											
Eau de dilution	Précisez le type d'eau utilisé (ex : eau synthétique selon ISO6341), sa date de préparation et ses pH, dureté et O ₂ dissous																																																																											
Conditions d'essai	Précisez les dilutions utilisées, le nombre de répliques et le nombre de daphnies utilisées par réplique Précisez la date et la durée de l'essai (24h-48h)																																																																											
Expression des résultats	Précisez sous forme de tableau et pour chaque concentration testée le dénombrement des daphnies immobiles, le pourcentage d'immobilisation et les teneurs en O ₂ , le pH et la conductivité tel que préconisé. Exemple de tableau : <table border="1" data-bbox="384 824 1155 963"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Concentration</th> <th colspan="5">Nbre daphnies immobiles/nbre total daphnies</th> <th rowspan="2">Pourcentage d'immobilisation</th> <th rowspan="2">O₂ dissous (mg/l)</th> <th rowspan="2">pH</th> <th rowspan="2">Conductivité (µS/cm)</th> </tr> <tr> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>Total</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 % (témoin)</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>12.5</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>...</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>..</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>Notez tout comportement anormal des daphnies dans les conditions d'essai (ex : léthargie, flottaison, mouvement anormal,...). Rapportez la EC₅₀-24h et, si il y a lieu, la EC₅₀-48h, la méthode de calcul employée (manuelle, nom du logiciel, méthode statistique utilisée), si possible les intervalles de confiance à 95 % Précisez si il y a eu lieu de ne pas employer certaines concentrations dans le calcul de le EC₅₀ (car O₂ < 2mg/l en fin d'essai). Précisez lesquelles. Rapportez la concentration minimale soumise à l'essai correspondant à 100 % d'immobilisation et la concentration maximale soumise à l'essai correspondant à 0 % d'immobilisation (à 24h et, le cas échéant, à 48h) Précisez si les critères de validité sont respectés, à savoir : - pourcentage d'immobilisation des témoins ≤ 10 % - CE₅₀-24h du dichromate de potassium compris entre 0.6 et 2.1 mg/l (précisez la date de l'essai et la valeur de la EC₅₀-24)</p>	Concentration	Nbre daphnies immobiles/nbre total daphnies					Pourcentage d'immobilisation	O ₂ dissous (mg/l)	pH	Conductivité (µS/cm)	1	2	3	4	Total	0 % (témoin)	-	-	-	-	100	-	-	-	-	50	-	-	-	-	25	-	-	-	-	12.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Concentration	Nbre daphnies immobiles/nbre total daphnies					Pourcentage d'immobilisation	O ₂ dissous (mg/l)					pH	Conductivité (µS/cm)																																																															
	1	2	3	4	Total																																																																							
0 % (témoin)	-	-	-	-																																																																			
100	-	-	-	-																																																																			
50	-	-	-	-																																																																			
25	-	-	-	-																																																																			
12.5	-	-	-	-																																																																			
...	-	-	-	-																																																																			
Remarque	Précisez toutes les informations relatives aux opérations non spécifiées dans la méthode et/ou tout incident susceptible d'avoir influencé les résultats																																																																											

- 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-belge enregistrée~~ **NBN EN ISO 6341 (20121996)** : 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.