

E-V-4v2-Détermination de la toxicité aiguë (~~EC₅₀-48h~~) par *Daphnia magna* Straus – Méthode en kit (DAPHTOXKIT F MAGNA).

1. Préambule

Il existe deux méthodes de détermination de la toxicité aiguë par *Daphnia magna* : la méthode dite « conventionnelle » qui utilise des daphnies ~~de 3^{ème} génération~~ maintenues en élevage et la présente méthode dite « en kit » qui utilise des daphnies directement écloses à partir d'œufs dormants (éhippies ; kit disponible par exemple auprès de la société belge Microbiotests Inc.). Cette dernière méthode est particulièrement – notamment 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 en kit qui utilise des daphnies directement écloses à partir d'œufs dormants (éhippies ; kit disponible par exemple auprès de la société belge Microbiotests Inc.). 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 avelique** : 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. 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.

6. Introduction au Daphtokit

6.1. Origine

Les bioessais de criblage utilisant les espèces de daphnies *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* et *Ceriodaphnia dubia* ont été développés par les équipes de recherche du Prof. Dr. G. Persoone au « Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution » (LABRAP) à l'Université de Gand en Belgique.¹ La société MicroBioTests a repris les activités découlant de ces recherches en produisant les Toxkits et en les commercialisant.

6.2. Champ d'application

Les TOXKITS sont des microbioessais contenant tout ce qui est nécessaire (y compris les organismes d'essai) pour réaliser des tests de toxicité simples, rapides, sensibles et reproductibles. Les tests Toxkits sont particulièrement adaptés pour les essais de toxicité en autocontrôle sur des produits chimiques et des rejets évacués dans les milieux aquatiques, à condition de respecter une rigueur dans la mise en œuvre, en particulier le respect de conditions d'ambiance reproductibles (température, milieu, ...).

6.3. Avantages des essais Toxkit

L'avantage majeur des microbioessais Toxkit par rapport aux bioessais conventionnels est que les organismes d'essai sont intégrés dans les kits sous une forme dormante ou immobilisée, à partir de laquelle ils peuvent être activés à la demande avant l'exécution de l'essai de toxicité. Ceci élimine la nécessité d'un approvisionnement continu et/ou d'un élevage d'organismes d'essai et donc diminue la charge de travail liée à l'entretien d'un élevage pour des laboratoires qui n'exécutent pas ce test en routine.

Tous les essais Toxkit ont été « miniaturisés » en microbioessais pratiques et faciles à utiliser qui peuvent être effectués avec du matériel de laboratoire et des équipements conventionnels, sur un espace de travail relativement réduit.

¹ * Le Laboratoire a récemment été renommé « Laboratory for Environmental Toxicology and Aquatic Ecology » (LETAE).

6.4. Caractéristiques biologiques des Daphtoxkits

Les Daphtoxkits sont basés sur l'utilisation d'œufs dormants des crustacés *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* et *Ceriodaphnia dubia*, qui sont utilisés dans le monde entier pour des essais de toxicité. Ces œufs sont protégés par une capsule chitineuse appelée éphippie, et peuvent être stockés pendant de longues périodes sans perdre leur viabilité. Quand les éphippies sont placées dans des conditions environnementales spécifiques pour déclencher l'éclosion, les œufs se développent en néonates en environ 3 jours. Ces néonates peuvent alors être employés immédiatement pour les essais de toxicité.

La présente procédure concerne le Daphtoxkit F *Magna* qui permet de travailler avec le crustacé *Daphnia magna*.

6.5. Principe du Daphtoxkits

L'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* (néonates issus d'éphippies homogènes en taille et en âge) 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. 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 EC_{50-24h} et/ou EC_{50-48h} .

La toxicité d'un échantillon ou d'une substance en solution peut également être exprimée en unités de toxicité : $TU_{50-24h(48h)} = 100/EC_{50-24h(48h)}$.

Les bioessais de détermination d' EC_{50} (ou LC_{50}) à 24 ou 48 h sont réalisés dans des plaques d'essai multipuits jetables au départ de néonates issus d'éphippies homogènes en taille et en âge.

6.6. Méthodologie d'essai

Les essais réalisés à l'aide du Daphtoxkit sont effectués conformément aux procédures d'essais prescrites par les organisations nationales et internationales (p. ex. OCDE, ISO, CEE, EPA, ASTM).

6.7. Dispositifs

Chaque Daphtoxkit contient tous les matériaux (jetables) nécessaires pour exécuter 6 bioessais complets (essai préliminaire ou EC_{50} à 24-48h définitif). Le seul équipement complémentaire requis est un incubateur ou une salle à température contrôlée à 20 ± 2 ~~20-25~~ °C, un frigo pour la conservation des éphippies, une petite table lumineuse ou une loupe binoculaire, de la verrerie de laboratoire conventionnelle, une balance analytique, un pHmètre, un oxymètre et un conductivimètre. Du $K_2Cr_2O_7$ sera nécessaire pour réaliser l'essai contrôle.

6.8. Sensibilité

La recherche comparative réalisée dans plusieurs laboratoires de différents pays a prouvé que la sensibilité des bioessais exécutés avec Daphtoxkits est semblable à celle des tests de toxicité conventionnels effectués avec des néonates d'élevage².

6.9. Précision

Etant donné que les Daphtoxkits contiennent les matériaux d'essai standards (et les matières biologiques), la répétabilité de ces microbioessais est très élevée.

6.10. Durée de conservation

Les éphippies doivent être conservées dans l'obscurité, à 5 ± 2 °C pour maintenir leur viabilité. Le succès de l'éclosion des éphippies conservées dans ces conditions est garanti pendant plusieurs mois, comme indiqué sur l'étiquette mentionnant la date de péremption de chaque kit.

6.11. Représentativité

Comme les rotifères et les copépodes, les cladocères sont des membres écologiquement importants des communautés aquatiques d'eau douce et au sein des réseaux trophiques. Les daphnies sont les espèces de crustacés les plus utilisées pour la détermination des effets des xénobiotiques sur les consommateurs primaires dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce.

7. Contenu du DAPHTOXKIT F MAGNA

Le DAPHTOXKIT F *MAGNA* contient :

- Six tubes en plastique de 1 ml couverts d'une feuille d'aluminium, contenant des éphippies de *Daphnia magna*, à stocker dans un réfrigérateur à 5 ± 2 °C jusqu'à utilisation. Le nombre de néonates issus de chaque flacon suffit pour un test de toxicité complet.
- Deux lots de 4 petites bouteilles en verre, contenant chacune une solution saline concentrée, pour composer 2 x 2 litres d'eau douce de référence (milieu ISO, formule selon ISO 6341) avec de l'eau déionisée ou de l'eau distillée, pour la préparation du milieu d'éclosion et la dilution de la substance toxique. Composition :
 - flacon 1 : NaHCO_3 (129,5 mg - à dissoudre dans 2 litres pour obtenir une concentration de 64.75 mg/l)
 - flacon 2 : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (588 mg - à dissoudre dans 2 litres pour obtenir une concentration de 294 mg/l)

² Publication disponible sur le lien suivant :

<http://www.kmae-journal.org/articles/kmae/abs/2009/02/kmae09009/kmae09009.html>

- flacon 3 : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (246,5 mg - à dissoudre dans 2 litres pour obtenir une concentration de 123.25 mg/l)
- flacon 4 : KCl (11,5 mg - à dissoudre dans 2 litres pour obtenir une concentration de 5,75 mg/l)
- Six boîtes de Pétri en polystyrène de 5 cm de diamètre pour l'éclosion des éphippies.
- Six plaques d'essai en polycarbonate composées de 6 puits de rinçage et 24 puits pour les dilutions de la substance toxique.
- Six tubes en plastique de 1 ml contenant une petite quantité de poudre de spiruline pour le "pré-nourrissage" des organismes d'essai avant l'essai de toxicité.
- Six bandes de Parafilm pour sceller les plaques multipuits afin de minimiser l'évaporation au cours de la période d'incubation.
- Six micropipettes en polyéthylène pour le transfert des organismes d'essai.
- Un petit tamis à mailles de 100 μm , pour le rinçage des éphippies.
- Un Manuel de Protocole Standard, c'est-à-dire une brochure détaillée contenant toutes les instructions pour l'exécution des essais préliminaires et / ou des essais définitifs sur les composés chimiques purs ou les déchets.
- Un protocole de laboratoire, c'est-à-dire une version abrégée du Manuel de Protocole Standard.
- Six feuilles pour le report des résultats et les calculs de pourcentages d'effets moyens.
- Six feuilles d'interpolation graphique pour le calcul manuel rapide de l' EC_{50} .
- Une fiche de spécification indiquant le numéro de lot et la durée de vie des éphippies, le numéro de lot des solutions salines concentrées, la date d'expiration du Daphtokit et les valeurs d' EC_{50} à 24 ou 48 h pour le dichromate de potassium (substance de référence).

Toutes les matières non biologiques prévues dans le Daphtokit *F magna* sont réalisées en matériaux inerte, non toxiques. Ces matériaux sont jetables et ne devraient donc être utilisés qu'une seule fois.

A noter que tout ce matériel peut être commandé séparément par exemple chez le fournisseur du Daphtokit (MicroBio Test) ou chez d'autres fournisseurs. De même, MicroBioTests Inc. est un exemple de fournisseur d'éphippies de *Daphnia magna* appropriées. Le projet de norme internationale ISO/DIS 6341 indique par ailleurs la marche à suivre pour la production d'éphippies à partir d'un élevage.

8. Préparation de l'eau douce de référence

Remarque générale: les solutions décrites ci-dessous sont préparées avec de l'eau déionisée ou d'une pureté équivalente (conductivité < 10 $\mu S/cm$, C_{OT} < 5ppb) ~~pour la préparation des solutions et de l'eau de dilution et de~~

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

L'eau douce de référence est préparée à l'aide des flacons de solutions salines concentrées disponibles dans le kit (voir **point 2**) et utilisée comme milieu d'éclosion pour les éphippies et comme milieu de dilution pour la préparation de la série de dilution de la substance toxique.

Protocole pour la préparation de 2 litres d'eau douce de référence (voir **figure 1**) :

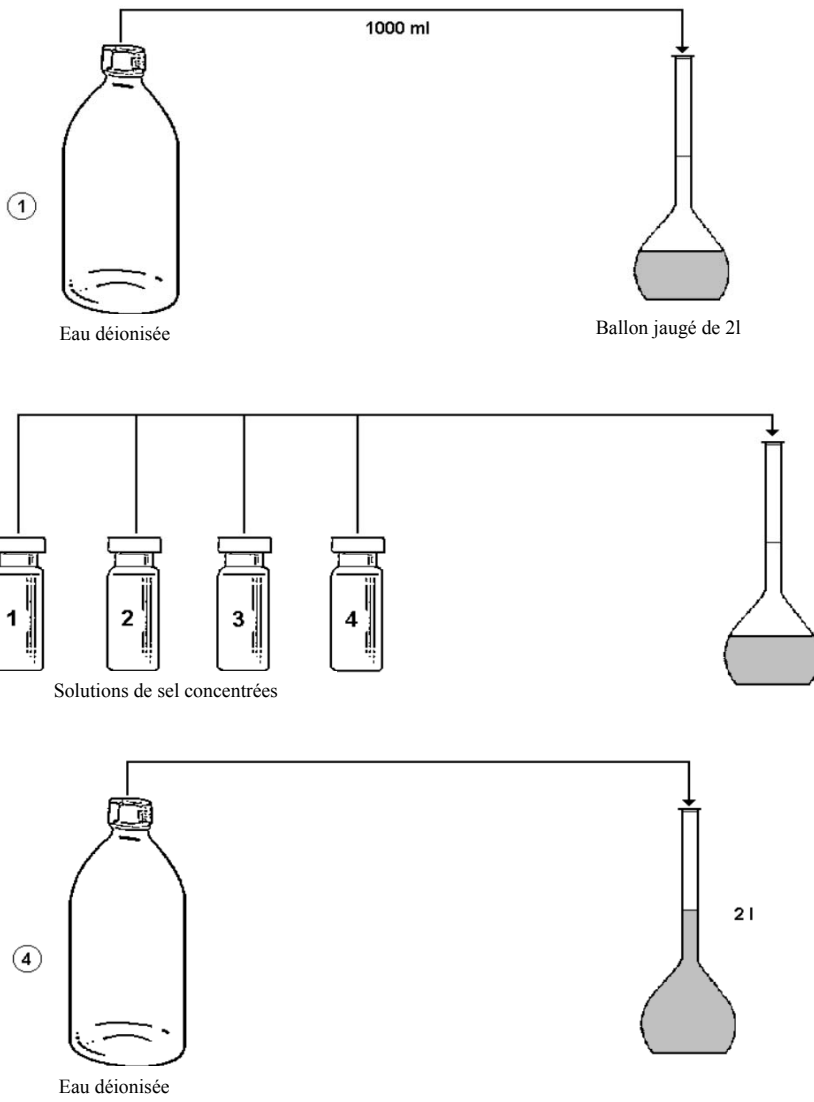
1. Remplir un ballon jaugé de 2 l avec environ un litre d'eau déionisée.
2. Déboucher le flacon étiqueté 1 (NaHCO_3), et en verser le contenu dans le ballon.
3. Répéter cette opération pour le flacon 2 (CaCl_2), le flacon 3 (MgSO_4) et le flacon 4 (KCl), en respectant cet ordre.
4. Ajouter de l'eau déionisée jusqu'au trait de 2 l, boucher le ballon jaugé et agiter pour homogénéiser le milieu.

N.B. un milieu d'eau douce concentré 2 fois peut être préparé dans un ballon jaugé de 1 litre, en prévoyant une dilution ultérieure de moitié au moment de l'utilisation du milieu.

9. Stockage du milieu d'éclosion et de dilution

Deux litres d'eau douce de référence suffisent pour l'exécution de 3 bioessais complets avec *Daphnia magna*. Si les 3 essais ne sont pas effectués dans les quelques jours après préparation de l'eau douce de référence, le milieu devrait être stocké dans un réfrigérateur à l'obscurité. Il est important de prendre soin d'amener le milieu froid (progressivement) à température ambiante avant de l'utiliser.

Figure 1: préparation de l'eau douce de référence (d'après la *standard operational procedure* du Daphtokit de MicroBio Tests).



10. Pré-aération de l'eau douce de référence

L'eau douce de référence doit être aérée pendant au moins 15 minutes (jusqu'à stabilisation du pH) avant d'être utilisée pour l'éclosion des œufs de dormance et pour la préparation des dilutions de substances toxiques. La pré-aération peut être effectuée très facilement par bullage d'air à travers un tube relié à une pompe à air d'aquarium.

Le pH doit être de $7,8 \pm 0,5$; si nécessaire, ajuster par ajout d'une solution de NaOH (1N) ou de HCl (1N). La dureté totale doit être de $225 \text{ mg/l} \pm 50 \text{ mg/l}$ en CaCO_3 (soit $12,6 \pm 2,8$ degré allemand équivalent à $22,5 \pm 5$ °F) et la concentration en oxygène dissous supérieure à 7 mg/l .

11. Éclosion des éphippies

L'éclosion des éphippies doit être initiée 3 jours avant le début de l'essai de toxicité. En effet, dans des conditions optimales, le développement embryonnaire des œufs de *Daphnia magna* prend environ 3 jours. Sous éclairage et dans les conditions de température indiquées ci-dessous (minimum 6000 lux et 20-22 °C), les premiers néonates peuvent même apparaître avant la fin de la période d'incubation de 72 h, mais la majorité des éclosions se produira entre 72 h et 80 h d'incubation. Le respect strict des conditions de température et d'intensité lumineuse est très important. En effet, un écart par rapport à ces conditions peut entraîner un délai ou au contraire une accélération dans l'éclosion des éphippies. En tenant compte du fait qu'un minimum de 120 néonates sont nécessaires pour effectuer un test complet et que les néonates ne devraient pas être plus âgés que 24 h au début de l'essai de toxicité, **les organismes doivent être collectés au plus tard 90 h après le début de l'incubation.**

Procédure (voir figure 2):

1. Verser le contenu d'un flacon d'éphippies dans le micro-tamis et s'assurer que toutes les éphippies soient transférées.
2. Rincer les éphippies abondamment à l'eau du robinet pour éliminer toute trace du milieu de conservation.
3. Transférer les éphippies dans la boîte de Pétri destinée à l'éclosion avec 15 ml d'eau douce de référence pré-aérée (on peut aussi utiliser une boîte de Pétri d'un diamètre de 10 cm contenant 50 ml d'eau douce de référence pré-aérée).
4. Couvrir la boîte de Pétri d'éclosion et incuber pendant 72 h, à 20-22 °C sous un éclairage continu de minimum 6000 lux (intensité lumineuse dirigée sur le haut de la boîte de Pétri).

12. Préparation des échantillons

Avant la préparation des dilutions, les échantillons 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.

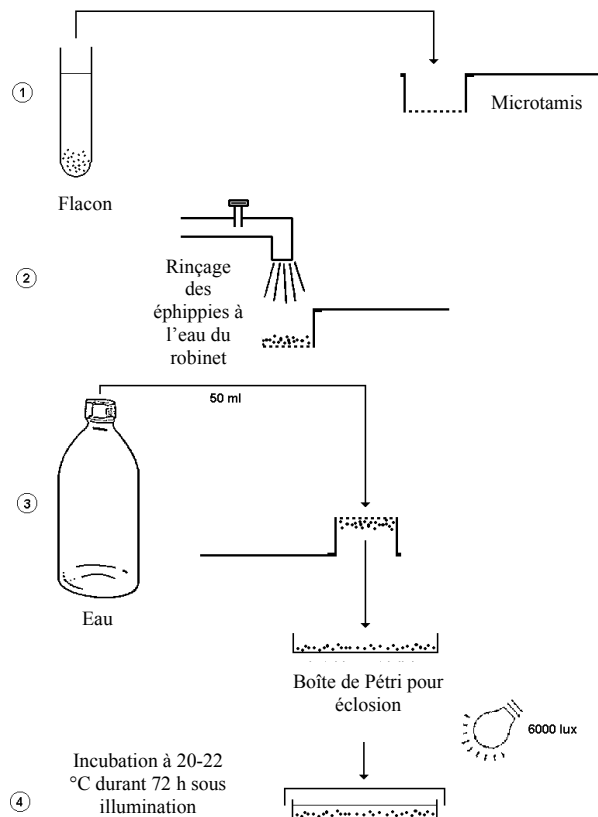
Le pH de l'échantillon peut également être corrigé (suivant instructions reçue avec l'échantillon). Cela est envisagé lorsque des effets toxiques sont observés aux concentrations/dilutions où le pH n'est pas compatible avec la survie des organismes (c'est-à-dire en dehors de l'intervalle de tolérance 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.

12.13. Préparation des dilutions d'échantillons

13.1. Essais sur effluents

La procédure décrite ci-dessous pour l'essai sur effluents (ou déchets liquides) peut également être appliquée à n'importe quel autre type de liquide contaminé tel que, par exemple, eaux de surface, eaux souterraines, eaux interstitielles de sédiments, de sol ou de déchets, lixiviats, etc.

Figure 2 : éclosion des éphippies (d'après la *standard operational procedure* du Daphtokit de MicroBio Tests).



Préparation des dilutions de l'échantillon (voir figure 3).

~~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.~~

Une série de dilutions (ici exemple de : 100 % - 50 % - 25 % - 12,5 % et 6,25 %) de l'échantillon d'effluent est préparée par dilution de 1:1 avec de l'eau douce de référence :

1. Prendre cinq ballons jaugés de 100 ml et les marquer de C1 à C5.
C1 est l'effluent non-dilué et C5 est la dilution la plus élevée (voir **tableau 1**).
2. Remplir le flacon C1 jusqu'au trait avec 100 ml d'effluent.
3. Mettre 50 ml d'eau douce de référence dans les flacons C2, C3, C4, et C5.
4. Transférer 50 ml à partir du flacon C1 dans le flacon C2. Boucher et bien agiter le flacon C2.
5. Répéter cette opération (étape 4) pour les dilutions suivantes c'est-à-dire 50 ml de C2 dans C3 ; 50 ml de C3 dans C4 et 50 ml de C4 dans C5
6. Voir **point 14 : Remplissage de la plaque d'essai**.

Tableau 1: série de dilutions de l'effluent

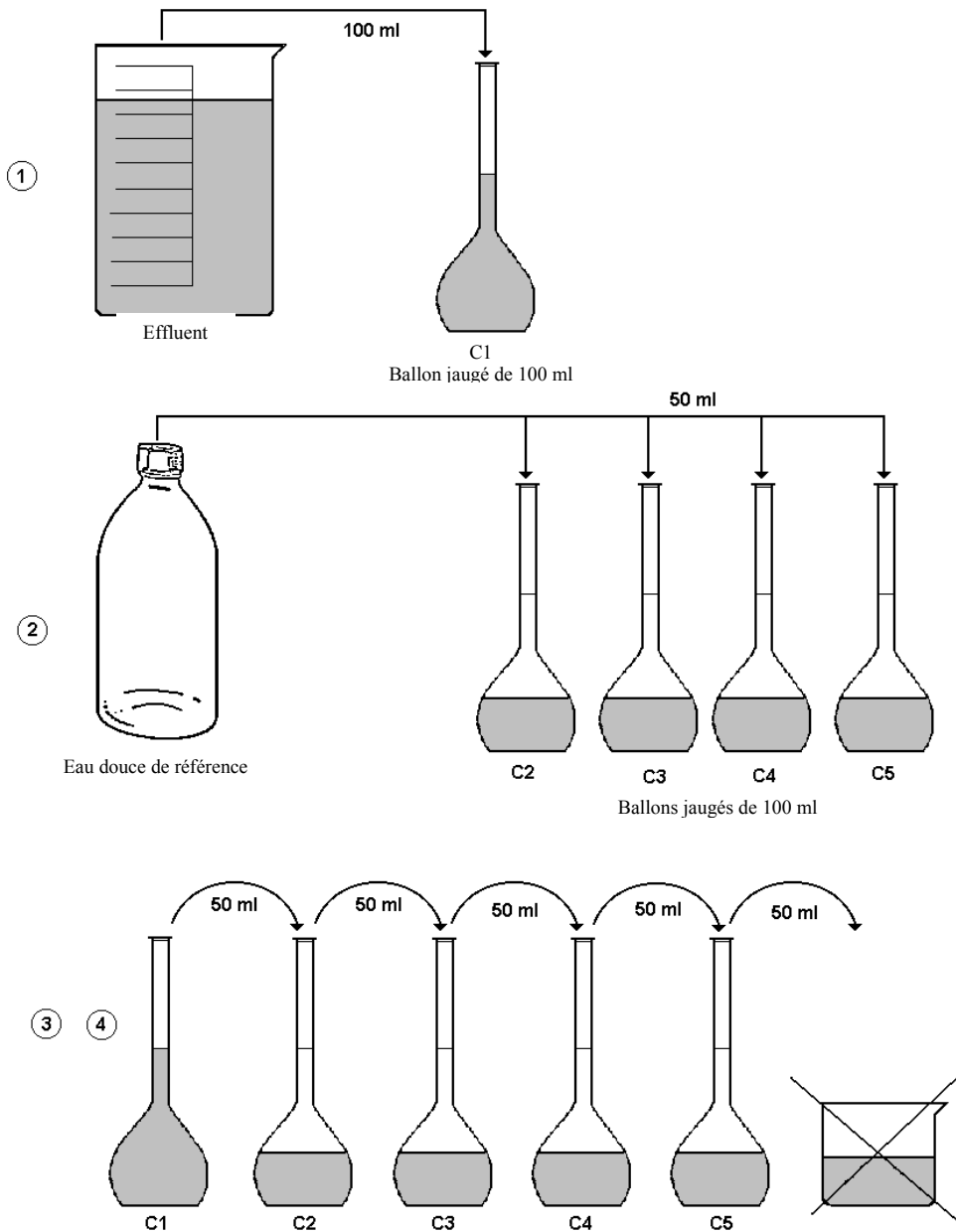
Flacon	Concentration d'effluent (en %)
C1	100
C2	50
C3	25
C4	12,5
C5	6,25

Remarque importante : 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 %.

Figure 3 : essais sur effluents, préparation des séries de dilution 1 : 1 (d'après la *standard operational procedure* du Daphtoxkit de MicroBio Tests).

Design de test : 100 – 50 – 25 – 12.5 – 6.25 %



13.2. Essais sur la substance de référence ($K_2Cr_2O_7$)

Afin de vérifier la bonne exécution de la procédure d'essai et la sensibilité des organismes d'essai, il est indispensable d'effectuer un test sur la substance de référence, le dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$).

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.~~

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>.

Procédure:

Une série de dilutions allant de 3,2 mg/l à 0,32 mg/l doit être préparée .

1. Prendre sept jaugés calibrés de 100 ml. Noter le premier jaugé «stock 1 », le deuxième flacon « stock 2 » et les autres C1 - C2 - C3 - C4 - C5.
2. Peser 100 mg de dichromate de potassium sur une balance analytique, les transférer dans le flacon « stock 1 » et remplir jusqu'au trait avec de l'eau déionisée. Cette solution peut se conserver 4 mois au frigo (4°C) et à l'obscurité.
3. Transférer 1 ml de solution « stock 1 » dans le flacon « stock 2 » et remplir ce flacon jusqu'au trait de façon à obtenir une concentration de substance de référence de 10 mg/l.
4. Transférer les volumes suivants de solution de substance de référence du flacon « stock 2 » dans les autres flacons de 100 ml:
 - 32 ml dans le flacon C1 (3,2 mg/l)
 - 18 ml dans le flacon C2 (1,8 mg/l)
 - 10 ml dans le flacon C3 (1 mg/l)
 - 5,6 ml dans le flacon C4 (0,56 mg/l)
 - 3,2 ml dans le flacon C5 (0,32 mg/l)
5. Pour chaque flacon, ajouter de l'eau douce de référence jusqu'au trait, boucher les flacons et les agiter pour homogénéiser les solutions.
6. Remplir la plaque multipuits avec les solutions de substance de référence, comme indiqué au **point 14. Remplissage de la plaque d'essai.**

Les valeurs des essais de contrôles sont reportées en carte de contrôle d'acceptation, la EC_{50-24h} 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).

Mis en forme : Pas de lignes solidaires, Ne pas ajuster l'espace entre le texte latin et asiatique, Ne pas ajuster l'espace entre le texte et les nombres asiatiques

DRAFT 2015

13.14. Pré-alimentation des organismes d'essai

Les néonates utilisés pour les essais Daphnies "classiques" sont nés dans des élevages où ils peuvent se nourrir jusqu'à ce qu'ils soient recueillis pour les essais. Cette absorption alimentaire leur fournit une «réserve énergétique» et empêche la mortalité résultant d'un manque de nourriture (ce qui fausserait les résultats des essais) durant les 48 heures d'essai au cours desquelles les organismes ne sont pas nourris.

Dans ce but, les néonates éclos à partir des éphippies sont pré-nourris avec une suspension de micro-algues spiruline avant le test lors d'une "pré-alimentation" de 2 heures.

Procédure:

1. Prendre un flacon de poudre de spiruline et le remplir avec l'eau douce de référence.
2. Agiter vigoureusement le flacon pour homogénéiser le contenu.
N.B. : l'utilisation d'un Vortex est conseillée pour obtenir une suspension très homogène des particules de spiruline.
3. Deux heures avant la collecte des néonates pour l'essai, verser la suspension d'algues dans la boîte de Pétri d'éclosion et mélanger doucement le contenu pour distribuer uniformément la nourriture.

14.15. Remplissage de la plaque d'essai

Pour une évaluation statistiquement acceptable des effets, chaque concentration d'essai ainsi que le contrôle doivent être testés en 4 répétitions.

Chaque plaque multipuits est fournie avec 4 puits d'essai pour les contrôles et 4 puits d'essai pour chaque concentration de substance toxique (voir **figure 4**).

En outre, une colonne de "puits de rinçage" se trouve sur le côté gauche des plaques d'essai fournies avec le Daphtokit. Ces puits de rinçage servent à limiter la dilution de la substance toxique dans les coupelles multipuits pendant le transfert des organismes d'essai de la boîte de Pétri d'éclosion à la plaque d'essai.

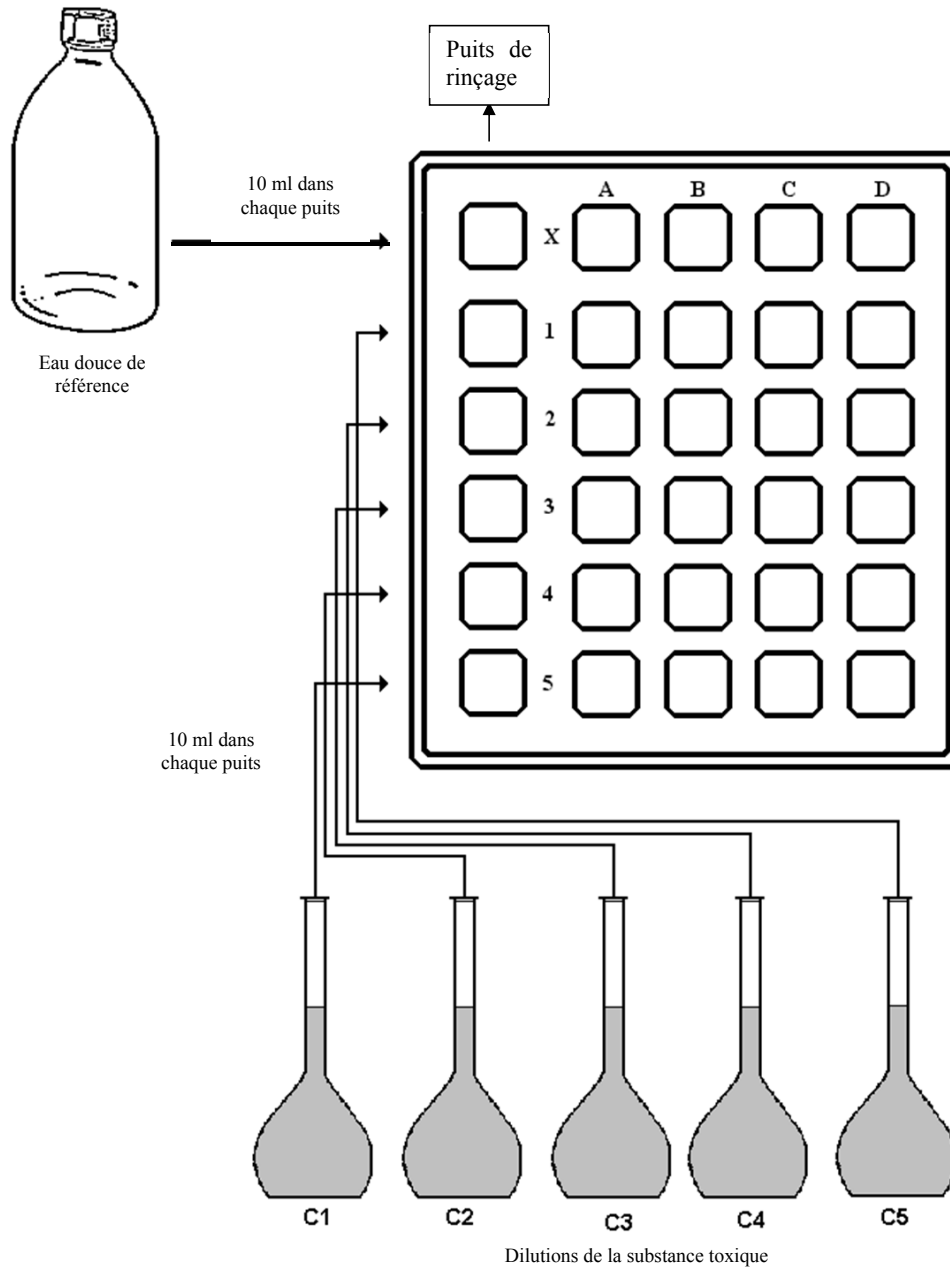
Les colonnes de puits d'essai sont étiquetées A, B, C et D (répliquats) et les lignes sont appelées X (contrôle), 1, 2, 3, 4 et 5 pour les cinq dilutions des échantillons.

Tous les puits de chaque rangée doivent être remplis avec une dilution de l'échantillon (ou avec le milieu de dilution dans la ligne de contrôle).

Procédure (voir **figure 4**):

Transférer 10 ml d'eau de dilution dans chaque puits de la rangée de contrôle et 10 ml de chaque concentration d'échantillon dans chaque puits de lignes correspondantes, dans l'ordre des concentrations de substances toxiques croissantes.

Figure 4 : remplissage de la plaque d'essai (d'après la *standard operational procedure* du Daphtokit de MicroBio Tests).

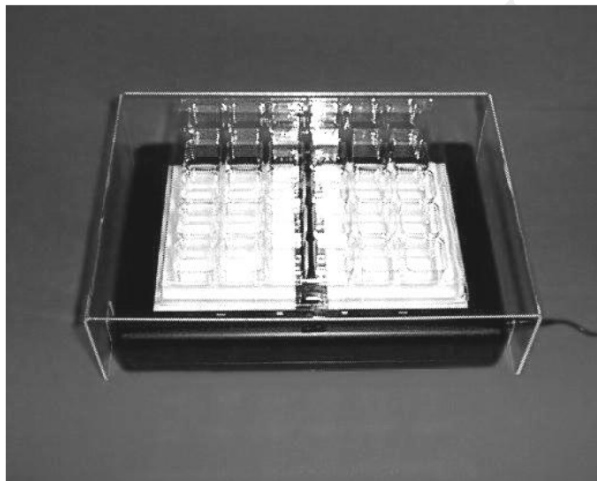


15.16. Transfert des néonates dans les puits d'essai

Le transfert des néonates de daphnies dans les puits d'essai est effectué à l'aide d'une micropipette. En raison de la petite taille des jeunes daphnies, ce transfert est habituellement effectué sous une loupe binoculaire à faible grossissement (par exemple 10X). On peut aussi utiliser une table lumineuse munie d'une bande sombre et surmontée d'une plaque transparente (voir **figure 5**). L'utilisation d'une bande de papier noir et du plateau transparent améliore considérablement le contraste entre les organismes d'essai et le fond blanc de la table lumineuse, ce qui facilite considérablement la visibilité des organismes d'essai.

Figure 5 : table lumineuse avec support transparent

Le plateau transparent, qui peut facilement être confectionné avec n'importe quel type de plastique transparent, doit être à une distance d'environ 3 cm de la table lumineuse. La largeur de la bande noire doit être d'environ 3 cm.



Le transfert des daphnies dans la plaque multipuits se fait en deux étapes:

- a. le transfert des néonates de la boîte de Pétri dans les puits de rinçage de la plaque multipuits (première colonne à gauche – figure 4).
- b. le transfert des néonates à partir des puits de rinçage vers les 4 puits d'essai des lignes correspondantes.

Procédure (voir figure 6):

1. Mettre la boîte de Pétri avec les néonates pré-nourris sur le plateau d'une loupe binoculaire ou sur le plateau transparent de la table lumineuse avec la bande de lumière noire.
2. Transférer au moins 20 néonates (nageant activement) dans chaque puits de rinçage dans l'ordre suivant: ligne X (contrôle), ligne 1, ligne 2, ligne 3, ligne 4 et ligne 5 (c'est-à-dire dans l'ordre croissant des concentrations d'échantillon et ce afin de minimiser la concentration du milieu d'essai). Afin de minimiser la dilution du milieu d'essai, essayer de transférer aussi peu de liquide que possible de la boîte de Pétri vers les puits au cours de ce transfert et rincer minutieusement la micropipette après chaque transfert.
3. Mettre la plaque multipuits sur le plateau du microscope à dissection ou sur le plateau transparent de la table lumineuse et transférer exactement 5 néonates de chaque puits de rinçage dans les 4 puits de chaque rangée.
Ce transfert doit également être effectué dans l'ordre des concentrations d'essai croissantes.
N.B. Compter les néonates à leur sortie de la micropipette pour être sûr d'avoir transféré exactement 5 organismes d'essai par puits.

Remarque importante

IMMOBILISATION DES ORGANISMES D'ESSAI FLOTTANT EN SURFACE

Les daphnies sont susceptibles d'être retenues à la surface du milieu liquide dans les puits d'essai, par le phénomène de « tension de surface ».

Lorsqu'ils flottent en surface, certains organismes d'essai peuvent ne pas être en mesure de se libérer et risquent de mourir.

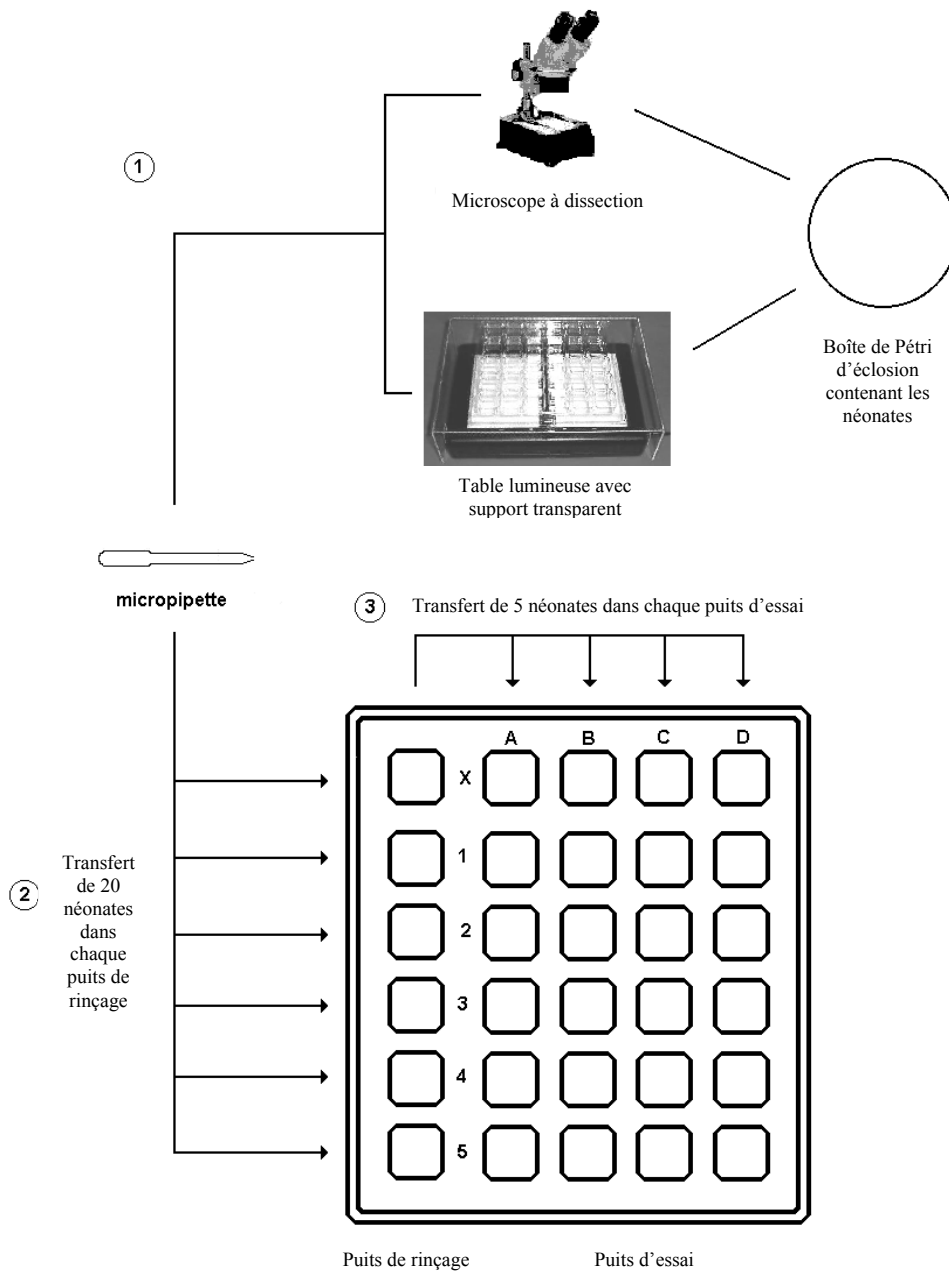
Afin d'éviter ce phénomène d'immobilisation en surface, qui peut sérieusement compromettre les résultats des bioessais, il est d'une importance capitale, lors du transfert des néonates dans les puits d'essai, de mettre la pointe de la micropipette dans le milieu, et de ne pas laisser tomber les organismes sur la surface du milieu.

16.17. Incubation de la plaque d'essai

Procédure:

1. Mettre la bande de Parafilm sur la plaque multipuits et poser hermétiquement le couvercle sur la plaque.
2. Mettre la plaque dans l'incubateur à 20 ± 2 °C, dans l'obscurité.

Figure 6 : transfert des néonates dans les puits de la plaque d'essai (d'après la *standard operational procedure* du Daphtoxkit de MicroBio Tests).



17,18. Lecture des plaques d'essais

Procédure Dénombrement des daphnies :

1. Après 24 h et/ou 48 h d'incubation, mettre la plaque multipuits sous le microscope à dissection ou sur le plateau de la table lumineuse.
2. Noter le nombre de néonates morts et immobilisés³, par rapport au nombre d'organismes d'essai nageant activement dans chaque puits.
3. Reporter les comptages sur la feuille de résultats. Un exemple de feuille de résultats est donné en **annexe I**.
4. Calculer la somme des néonates morts et immobiles pour chaque concentration de l'échantillon et calculer la moyenne et le pourcentage d'effet.

Mesure O₂, pH et conductivité :

- Si la mise en contact est limitée à 24 h : 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.
- Si la mise en contact totale est de 48 h :
 - o Après le dénombrement de 24h : mesurer la concentration en oxygène dissous dans la plus faible concentration pour laquelle toutes les daphnies sont immobilisées (1 réplique).
 - o Après le dénombrement de 48h : 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.

19. Essai de contrôle

Les valeurs des essais de contrôle 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

³ Les néonates qui ne sont pas en mesure de nager après une légère agitation du liquide pendant 15 secondes doivent être considérés comme immobilisés, même s'ils peuvent encore bouger leurs antennes.

des limites d'action (3s), la fiabilité des résultats devra être évaluée et, le cas échéant, l'essai devra être recommencé dans la mesure du possible (selon la disponibilité de l'échantillon).

- ~~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 $O_2 \geq 2$ mg/l) soit rencontré.~~

18.20. Validité de l'essai

~~Comme pour la méthode classique, les~~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 au point 17) 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 EC_{50-24h} du dichromate de potassium de l'essai de contrôle (**point 13.2**) est comprise entre 0,6 mg/l et 2,1 mg/l.

19.21. Estimation de l'EC50

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.

Bien que le protocole du Daphtokit mette en avant la méthode graphique, il est préférable de déterminer la EC_{50-24h} et, le cas échéant, la EC_{50-48h} 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 Daphtokit⁴ (choix entre les modèles Hill, Weibull et Log-normal).

Sur la feuille d'essai, la EC_{50-24h} , EC_{50-48h} 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.

~~Il existe de nombreuses méthodes pour le calcul des seuils d'effets à 50%. La plus simple (décrite ci-dessous) consiste à reporter les pourcentages d'effet calculés sur un graphique (log concentration/% mortalité). Chaque Daphtokit contient 6 feuilles pour réaliser cette estimation très simple et rapide de l' EC_{50} par « interpolation graphique ». Un exemple de feuille d'interpolation graphique est donné en annexe II.~~

⁴ 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 : Paragraphe de liste, Avec puces + Niveau : 2 + Alignement : 1.9 cm + Retrait : 2.54 cm

Mis en forme : Paragraphe de liste, Espacement automatique entre les caractères asiatiques et latins, Espacement automatique entre les caractères asiatiques et les chiffres

Procédure:

- ~~1. Indiquer les concentrations (ou les dilutions) utilisées dans la série de dilution de l'échantillon sur l'axe Y.~~
- ~~2. Tracer le pourcentage d'effet calculé sur la ligne horizontale à hauteur de chaque concentration ou dilution.~~
- ~~3. Relier les points tracés par une ligne droite.~~
- ~~4. Localiser les 2 points adjacents sur le graphe qui sont séparés par la ligne verticale de 50 % d'effet et lire l'EC₅₀ à l'intersection des deux lignes.~~

N.B. : La comparaison des résultats du calcul d'interpolation graphique avec ceux d'autres programmes de traitement de données de la toxicité révèle toujours que la méthode présentée, malgré sa simplicité, donne des valeurs de 50 % d'effet qui sont très proches de celles obtenues avec des méthodes plus sophistiquées. La méthode d'interpolation graphique a par contre l'inconvénient de ne pas donner de "limites de confiance".

22. Rapport d'essai

Les informations que doit contenir le rapport d'essai sont présentées en annexe II.

20,23. Références

- **DAPHTOXKIT F_{TM} MAGNA:** Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater, standard operational procedure.
- Norme belge enregistrée NBN EN ISO 6341 (2012) : Qualité de l'eau – Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Essai de toxicité aiguë.
- ~~Norme internationale ISO 6341 (1996) : Qualité de l'eau – Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Essai de toxicité aiguë.~~

ANNEXE I

DAPHTOXKIT F

FEUILLE DE RESULTATS

Nom de l'opérateur:

Date de l'essai de performance:

Echantillon testé:

Type d'essai:

- Essai préliminaire
- Essai définitif

Espèce utilisée:

- Daphnia magna*
- Daphnia pulex*

Série de dilutions:

Concentration 1 :

Concentration 2 :

Concentration 3 :

Concentration 4 :

Concentration 5 :

	Contrôle		Conc. 5		Conc. 4		Conc. 3		Conc. 2		Conc. 1	
	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
Exposition (h)												
A												
B												
C												
D												
Total	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20	/20
% Effet												

Effets observés:

24h EC₅₀:

48h EC₅₀:



ANNEXE II

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 l'analyse	Nom et adresse du laboratoire, nom du technicien, nom de la personne qui valide le rapport																																																																											
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" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <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...).</p> <p>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 %</p> <p>Précisez si il y a eu lieu de ne pas employer certaines concentrations dans le calcul de la EC50 (car O₂ < 2mg/l en fin d'essai). Précisez lesquelles.</p> <p>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)</p> <p>Précisez si les critères de validité sont respectés, à savoir :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 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) 	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																																																																											