

---

---

**Qualité de l'eau — Détermination de la  
toxicité à long terme de substances  
vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus  
(Cladocera, Crustacea)**

*Water quality — Determination of long term toxicity of substances to  
Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 10706:2000

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-c2e50c06b559/iso-10706-2000>



**PDF – Exonération de responsabilité**

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

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

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

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

[ISO 10706:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-c2e50c06b559/iso-10706-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-c2e50c06b559/iso-10706-2000>

© ISO 2000

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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

Imprimé en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Principe</b> .....	1
4 <b>Environnement de l'essai</b> .....	2
5 <b>Réactifs et produits</b> .....	2
6 <b>Appareillage</b> .....	3
7 <b>Traitement et préparation des échantillons</b> .....	3
7.1 <b>Précautions particulières concernant le prélèvement et le transport des échantillons d'eaux ou d'effluents</b> .....	3
7.2 <b>Préparation des solutions des substances à expérimenter</b> .....	3
8 <b>Mode opératoire</b> .....	4
8.1 <b>Témoins</b> .....	4
8.2 <b>Sélection des concentrations d'essai</b> .....	4
8.3 <b>Renouvellement des concentrations d'essai</b> .....	5
8.4 <b>Introduction des animaux dans le système d'essai</b> .....	5
8.5 <b>Alimentation des organismes</b> .....	5
8.6 <b>Observations et mesures</b> .....	6
8.7 <b>Validité des résultats</b> .....	6
9 <b>Analyse des données et expression des résultats</b> .....	7
10 <b>Rapport d'essai</b> .....	8
<b>Annexe A (informative) Milieux M4 et M7 de l'OCDE — Préparation et acclimatation des milieux M4 Elendt et M7</b> .....	10
<b>Annexe B (informative) Eau dure reconstituée ASTM</b> .....	13
<b>Annexe C (informative) Fiche de collecte de données</b> .....	14
<b>Annexe D (informative) Calcul de la concentration moyenne pondérée dans le temps</b> .....	16
<b>Bibliographie</b> .....	18

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

La Norme internationale ISO 10706 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Les annexes A, B, C et D de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

ISO 10706:2000  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-c2e50c06b559/iso-10706-2000>

## Introduction

La présente Norme internationale définit une méthode pour la détermination de la toxicité sub létale à long terme des substances chimiques, des eaux et des effluents vis-à-vis de la puce d'eau *Daphnia magna* Straus. La méthodologie est adaptée d'une ligne directrice élaborée par l'Organisation de coopération et de développement économiques (Ligne directrice 211 de l'OCDE, voir référence [1] de la Bibliographie).

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

[ISO 10706:2000](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-c2e50c06b559/iso-10706-2000)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-c2e50c06b559/iso-10706-2000>

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

ISO 10706:2000

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-c2e50c06b559/iso-10706-2000>

# Qualité de l'eau — Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)

**AVERTISSEMENT** — Les boues activées et les eaux usées peuvent contenir des organismes potentiellement pathogènes. Il est par conséquent recommandé de prendre les précautions d'usage lors de leur manipulation. Il convient de manipuler avec soin les composés d'essai toxiques et ceux dont les propriétés sont inconnues.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode pour la détermination de la toxicité sublétales à long terme vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) des substances suivantes:

- a) 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;
- b) effluents industriels ou urbains, épurés ou non, s'il y a lieu après décantation, filtration ou centrifugation;
- c) eaux de surface ou eaux souterraines.

NOTE La présente Norme internationale est adaptée de la Ligne directrice 211 de l'OCDE [1].

## 2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 5667-2, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage*.

ISO 5667-16, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*.

## 3 Principe

Exposition pendant 21 jours de *Daphnia magna* femelles âgées de moins de 24 heures à une substance d'essai, à des effluents industriels ou urbains ou à des eaux de surface/souterraines ajoutés à de l'eau de dilution, dans une gamme de concentrations d'un système semi-statique ou à renouvellement continu. Le nombre de parents survivants ainsi que le nombre de descendants vivants issus de parents vivants à la fin de l'essai sont consignés.

La survie est notée et la capacité reproductrice des parents mis en expérimentation, vivants en fin d'essai (exprimée en nombre d'individus) est comparée à celle des parents témoins.

## 4 Environnement de l'essai

L'enceinte d'essai doit être exempte de vapeurs ou de poussières toxiques vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus.

Les solutions d'essai ne doivent pas être aérées.

La concentration en oxygène dissous dans les solutions d'essai doit être supérieure à 3 mg/l et le pH doit se situer dans la gamme comprise entre 6 et 9 et ne doit pas varier de plus de 1,5 unités au cours de l'essai. La dureté doit avoir une valeur supérieure à 140 mg/l (exprimée en CaCO<sub>3</sub>) ayant démontré qu'elle favorise la capacité reproductrice pour être conforme aux critères de validité (voir 8.7).

Le cycle d'essai doit être de 16 h de lumière et de 8 h d'obscurité. L'intensité doit de préférence être comprise entre 600 lux et 800 lux mais ne doit pas excéder 1 200 lux.

La température des solutions d'essai doit être maintenue dans une gamme comprise entre 18 °C et 22 °C et ne pas varier de plus de 2 °C (par exemple 18 °C à 20 °C, 19 °C à 21 °C ou 20 °C à 22 °C) pendant toute la durée de l'essai.

## 5 Réactifs et produits

**5.1 Organismes pour essai:** *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*), notée *D. magna* dans la suite du texte, de troisième génération au moins, obtenue par parthénogenèse acyclique dans des conditions d'élevage définies.

La sensibilité de *D. magna* aux toxiques étant fonction de l'origine de l'élevage, l'âge et la provenance (y compris les clones, si possible) de l'élevage de *D. magna* doivent être mentionnés dans le rapport d'essai.

Les animaux utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 24 h et provenir de la seconde à la cinquième portée. Les *D. magna* doivent provenir d'un lot sain ne présentant aucun signe de stress tel que mortalité > 20 %, présence de mâles, ephippia ou animaux décolorés, et doivent produire sans retard la première génération.

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

**5.2 Eau de dilution:** eau synthétique comme décrit en 5.3 ou des eaux naturelles non contaminées ayant un pH et des caractéristiques de dureté similaires aux eaux de dilution utilisées pour l'élevage et les essais.

**5.3 Eau de dilution synthétique,** préparée au moyen de l'une des méthodes suivantes:

- a) milieux M4 et M7 de l'OCDE (voir annexe A);
- b) eau de source dure reconstituée ASTM (voir annexe B).

L'eau de dilution doit être aérée jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la valeur de saturation de 95 % et jusqu'à stabilisation du pH. Si nécessaire, ajuster le pH à  $8,0 \pm 0,5$  par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl). L'eau de dilution ainsi préparée ne doit plus être aérée avant emploi.

Il est recommandé que les niveaux de COT (carbone organique total) soient < 5 mg/l avant l'ajout d'algues. Il n'est pas recommandé d'utiliser de l'eau de dilution contenant de l'EDTA (par exemple M7 et M4) pour analyser des composés contenant des métaux dans la mesure où la chélation peut réduire la toxicité du composé.

Si l'essai doit être conduit en vue de besoins qui impliquent l'utilisation d'une eau de dilution dont les caractéristiques diffèrent de celles décrites ci-dessus, il convient de mentionner dans le rapport d'essai les principales caractéristiques (par exemple, pH, dureté, COT, DCO) de l'eau de dilution synthétique utilisée.

## 6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

**6.1 Appareils de contrôle de l'environnement**, pour le contrôle de la température, du cycle jour/nuit et de l'intensité de la lumière.

**6.2 Appareil et/ou instruments de mesure**, pour le mesurage de l'oxygène dissous, du pH, de la dureté, du carbone organique total, de la demande chimique en oxygène, de l'intensité de la lumière et de la température.

**6.3 Récipients d'essai**, en matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante pour les essais (par exemple tubes à essais ou béchers en verre de 50 ml ou 100 ml), propres et non contaminés.

## 7 Traitement et préparation des échantillons

### 7.1 Précautions particulières concernant le prélèvement et le transport des échantillons d'eaux ou d'effluents

Les échantillons d'eaux ou d'effluents doivent être prélevés conformément à la procédure générale définie dans l'ISO 5667-2. Les flacons doivent être complètement remplis pour ne plus contenir d'air.

Les échantillons d'eaux ou d'effluents doivent être conservés conformément à l'ISO 5667-16; ce qui suit n'en constitue qu'un résumé. Réaliser l'essai de toxicité le plus rapidement possible, idéalement dans les 12 h qui suivent le prélèvement. Si cette durée ne peut pas être respectée, refroidir l'échantillon (0 °C à 4 °C) et l'analyser dans les 24 h. Si l'essai ne peut être réalisé dans les 48 h, l'échantillon peut être congelé (au-dessous de -18 °C) pour être analysé dans les deux mois suivant le prélèvement.

Toutes les portions (sous-échantillons) doivent être prétraitées de la même manière (c'est-à-dire que lorsqu'il est nécessaire de congeler de l'eau instable, toutes les portions, y compris celles utilisées le premier jour, doivent être congelées avant les essais; voir l'ISO 5667-16).

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

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

### 7.2 Préparation des solutions des substances à expérimenter

#### 7.2.1 Préparation des solutions mères

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

Les solutions mères ou les suspensions de substance(s) de faible solubilité aqueuse peuvent être solubilisées ou dispersées directement dans le milieu par des dispositifs à ultrasons, et/ou des agitateurs ou des solvants ou des dispersants de faible toxicité vis-à-vis de *D. magna* comme traité dans l'ISO 5667-16. Si un solvant est utilisé, la concentration du solvant dans la solution mère doit être telle que la concentration dans la plus forte solution d'essai ne dépasse pas 0,1 ml/l.

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

### 7.2.2 Préparation des solutions d'essai

Les solutions d'essai doivent être préparées (8.2) par ajout des solutions mères (7.2.1) ou des échantillons d'effluents (7.1) à l'eau de dilution (5.2) en quantités définies (voir 8.2).

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

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

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

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

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Témoins

ISO 10706:2000

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/431cc787-13b6-4793-98f5-3e50c06b5559/iso-10706-2000)

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

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

### 8.2 Sélection des concentrations d'essai

Utiliser au moins cinq concentrations d'essai disposées en une série géométrique avec un facteur de séparation ne dépassant pas 3,2.

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

- a) Si l'objectif est d'obtenir la NOEC (concentration sans effet observé), la gamme de concentration doit inclure au moins une concentration produisant un effet significatif par rapport au témoin (LOEC: concentration la plus faible avec effet observé), précédée d'une NOEC.

Si ce n'est pas le cas, l'essai doit être répété avec une concentration plus faible. Voir la note de bas de page 1 de l'article 9.

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

NOTE La connaissance préalable de la toxicité de la substance d'essai par un essai de toxicité aiguë et/ou préliminaire (ISO 6341) est utile pour sélectionner les concentrations d'essai appropriées.

Lorsque les solutions mères sont préparées avec un solvant ou un dispersant, la concentration en solvant ou en dispersant dans la plus forte concentration ne doit pas être supérieure à 0,1 ml/l et doit, dans toute la mesure du possible, être identique dans tous les récipients.

### 8.3 Renouvellement des concentrations d'essai

Les concentrations d'essai doivent être renouvelées au moins trois fois par semaine. Lorsque les essais préliminaires de stabilité indiquent une chute de la concentration de la substance d'essai à plus de 80 % de la concentration initiale mesurée avant le troisième jour, il est nécessaire de procéder à une augmentation de la fréquence de renouvellement de la solution d'essai ou d'utiliser un essai à renouvellement continu. La fréquence de renouvellement de la solution ou la vitesse du débit de renouvellement continu doit être consignée.

Dans le cas d'essais semi-statiques, réduire le volume du milieu transféré avec les *D. magna*.

### 8.4 Introduction des animaux dans le système d'essai

Au début de l'essai, transférer les jeunes animaux (âgés de moins de 24 h) du système d'élevage dans le système d'essai. Placer chacun d'entre eux dans un seul récipient contenant 50 ml à 100 ml de solution d'essai.

Pour l'analyse chimique des concentrations d'essai, il peut être nécessaire d'utiliser des volumes plus importants de solution d'essai; des répliques peuvent également être regroupées.

Pour ce qui concerne les essais semi-statiques, au moins dix animaux doivent être expérimentés individuellement pour chaque concentration considérée et chaque témoin. De plus, préparer une seconde série de récipients d'essai au moment du renouvellement des solutions, et transférer les animaux parents dans les solutions au moyen d'une pipette en verre de diamètre approprié.

La durée d'exposition des organismes doit être de 21 jours.

Si un essai à renouvellement continu est effectué, il convient d'utiliser la présente Norme internationale en tant que ligne directrice.

### 8.5 Alimentation des organismes

Les animaux parents doivent être nourris avec des cellules d'algues vivantes de l'une des espèces suivantes: *Chlorella* spp, *Pseudokirchneriella subcapitata* (officiellement appelée *Selenastrum capricornutum*) ou *Scenedesmus subspicatus*. Il est préférable de nourrir les animaux chaque jour mais au minimum chaque fois que les solutions sont renouvelées. La ration de nourriture doit être comprise entre 0,1 mg et 0,2 mg de carbone par animal et par jour. La ration doit être distribuée soit de manière régulière tout au long de l'essai ou de manière progressive en fonction de la croissance des animaux parents. Lorsque l'essai utilise des volumes supérieurs à 100 ml, la ration de nourriture doit être augmentée en conséquence.

NOTE L'ajout d'autres aliments à base de carbone particulière à la nourriture d'algues s'est avéré efficace pour éviter toute carence nutritionnelle susceptible de survenir avec les algues monospécifiques et pures mises en culture, sous réserve que le carbone total ne dépasse pas les limites indiquées ci-dessus.

Lorsqu'on utilise une autre mesure du carbone, telle que le dénombrement de cellules d'algues ou l'absorbance lumineuse, le laboratoire d'essai doit produire un nomogramme analysant le rapport de la mesure de substitution à la teneur en carbone. Les nomogrammes doivent être confirmés au moins tous les ans ou en cas de modifications apportées aux conditions de mise en culture des algues.

Une suspension d'algues concentrée obtenue par centrifugation ou décantation, suivie d'une remise en suspension dans le milieu de culture doit être utilisée pour les animaux afin de réduire le volume du milieu de culture d'algues transféré dans les récipients d'essai.