



Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Essai de toxicité aiguë

RECTIFICATIF TECHNIQUE 1

Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test

TECHNICAL CORRIGENDUM 1

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Le Rectificatif technique 1 à la Norme internationale ISO 6341:1996 a été élaboré par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/917e2dd9-3a79-45be-a636-2ad40773796e/iso-6341-1996>

Page 4

Paragraphe 8.4

Dans le deuxième alinéa, troisième ligne, remplacer le texte «... comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l, ...» par le texte «... comprise entre 0,6 mg/l et 2,1 mg/l, ...».

Page 5

Paragraphe 9.2

Dans la deuxième ligne du terme c), remplacer le texte «... comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l.» par le texte «... comprise entre 0,6 mg/l et 2,1 mg/l.».

ICS 13.060.01

Réf. n° ISO 6341:1996/Cor.1:1998(F)

Descripteurs: eau, qualité, pollution de l'eau, essai, essai des eaux, essai biologique, détermination, toxicité, daphnie.

© ISO 1998

Imprimé en Suisse

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6341:1996

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/917e2dd9-8a79-45be-a636-2ad40773796e/iso-6341-1996>

NORME
INTERNATIONALE

ISO
6341

Troisième édition
1996-04-01

**Qualité de l'eau — Détermination de
l'inhibition de la mobilité de *Daphnia
magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) —
Essai de toxicité aiguë**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*) — Acute toxicity test*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/917e2dd9-8a79-45be-a636-2ad40773796e/iso-6341-1996>



Numéro de référence
ISO 6341:1996(F)

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 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.

La Norme internationale ISO 6341 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 5, *Méthodes biologiques*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 6341:1989), dont elle constitue une révision technique.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale. L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1996

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'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Qualité de l'eau — Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Essai de toxicité aiguë

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour la détermination de la toxicité aiguë vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)

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

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 5667-2:1991, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage*.

ISO 5725-2:1994, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 2: Mé-*

thode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée.

ISO 5813:1983, *Qualité de l'eau — Dosage de l'oxygène dissous — Méthode iodométrique.*

ISO 5814:1990, *Qualité de l'eau — Dosage de l'oxygène dissous — Méthode électrochimique à la sonde.*

3 Principe

Détermination, dans les conditions définies par la présente Norme internationale, de la concentration initiale (c'est-à-dire la concentration présente au début de l'essai) qui, en 24 h, immobilise 50 % de *Daphnia magna* mises en expérimentation.

Cette concentration, dite concentration efficace initiale inhibitrice, est désignée par CE50_i — 24 h.

Si possible et si nécessaire, la concentration initiale qui, en 48 h, immobilise 50 % de *Daphnia magna* mises en expérimentation peut être également déterminée. Cette concentration est désignée par CE50_i — 48 h.

Dans les cas où il est impossible de déterminer la CE50_i — 24 h et éventuellement la CE50_i — 48 h, l'indication de la plus faible concentration testée qui immobilise toutes les *Daphnia magna* et de la plus forte concentration testée qui n'immobilise aucune *Daphnia magna* est souhaitable et constitue une information utile.

L'essai est conduit en une ou deux étapes:

— un essai préliminaire qui sert à déterminer la gamme des concentrations pour l'essai définitif et

qui donne une indication approximative de la CE50_i — 24 h et éventuellement de la CE50_i — 48 h;

- un essai définitif, effectué lorsque la valeur approximative fournie par l'essai préliminaire ne peut suffire, qui permet de calculer la CE50_i — 24 h et la CE50_i — 48 h et qui sert à déterminer les concentrations correspondant à 0 % et à 100 % d'immobilisation.

Lorsque la méthode décrite dans la présente Norme internationale est appliquée aux substances chimiques, un essai limite peut être effectué à 100 mg/l ou à une concentration inférieure à laquelle la substance est soluble ou en suspension stable, dans les conditions de l'essai (voir 8.5).

Il est recommandé d'effectuer des analyses de ces substances dès que possible. Si ces analyses montrent que, pour chaque concentration expérimentée, l'écart-type des concentrations mesurées au cours de l'essai, variant de façon aléatoire, ne s'écarte pas de ± 20 % de la moyenne, les concentrations inhibitrices médianes peuvent être calculées à partir des moyennes des mesures plutôt qu'à partir des concentrations initiales; elles sont alors désignées par CE50 — 24 h et éventuellement, CE50 — 48 h.

4 Environnement de l'essai

La conservation des solutions et la mise en expérimentation des organismes comme décrites dans la présente Norme internationale doivent être effectuées soit dans l'obscurité, soit sous un cycle jour/nuit de 16 h/8 h. L'enceinte d'essai doit être maintenue à $20 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ et être exempte de poussières ou de vapeurs toxiques vis-à-vis de *Daphnia magna*. Les substances chimiques photodégradables doivent être testées dans l'obscurité.

5 Réactifs et produits

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

Les animaux utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 24 h. Transférer les femelles porteuses dans des récipients contenant de l'eau de dilution fraîche et recueillir les nouveau-nés juste libérés dans les 24 h.

La sensibilité des *Daphnia magna* aux toxiques étant fonction de leur âge et de leur provenance, l'âge et la

provenance de l'élevage de *Daphnia magna* doivent être mentionnés dans le rapport d'essai.

5.2 Eau de dilution

Dissoudre des quantités connues de réactifs de qualité analytique reconnue dans de l'eau souterraine, de l'eau distillée ou de l'eau déionisée de pureté au moins équivalente et de conductivité au plus égale à $10 \text{ }\mu\text{S/cm}$.

L'eau de dilution ainsi préparée doit avoir un pH de $7,8 \pm 0,2$, une dureté totale de $250 \text{ mg/l} \pm 25 \text{ mg/l}$ (exprimée en CaCO_3), un rapport molaire Ca/Mg voisin de 4:1 et une concentration en oxygène dissous supérieure à 7 mg/l .

Les eaux naturelles de pH et de caractéristiques de dureté similaires à l'eau de dilution peuvent être utilisées pour les cultures.

À titre d'exemple, la préparation d'une eau répondant à ces caractéristiques est décrite ci-après.

a) Préparer les solutions suivantes:

1) Solution de chlorure de calcium

Dissoudre 11,76 g de chlorure de calcium dihydraté ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée ou déionisée et compléter à 1 litre.

2) Solution de sulfate de magnésium

Dissoudre 4,93 g de sulfate de magnésium heptahydraté ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau distillée ou déionisée et compléter à 1 litre.

3) Solution d'hydrogénocarbonate de sodium

Dissoudre 2,59 g d'hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) dans de l'eau distillée ou déionisée et compléter à 1 litre.

4) Solution de chlorure de potassium

Dissoudre 0,23 g de chlorure de potassium (KCl) dans de l'eau distillée ou déionisée et compléter à 1 litre.

b) Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions 1) à 4) et amener le volume total à 1 litre avec de l'eau distillée ou déionisée.

L'eau de dilution doit être aérée jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la valeur de saturation dans l'air et jusqu'à stabilisation du pH. Si nécessaire, ajuster le pH à $7,8 \pm 0,2$ 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.

NOTE 1 Si l'essai est 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 de l'eau de dilution synthétique utilisée.

5.3 Dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), de qualité analytique reconnue.

6 Appareillage

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

6.1 Appareil de mesurage de l'oxygène dissous.

6.2 Récipients pour essai, en matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante (par exemple: tubes à essais ou béchers en verre).

Avant utilisation, les récipients pour essai doivent être soigneusement lavés puis rincés successivement avec de l'eau distillée et de l'eau de dilution (5.2). À la fin de l'essai, les récipients doivent être vidés, rincés avec de l'eau pour éliminer toute trace de la solution d'essai, puis séchés.

7 Traitement et préparation des échantillons

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

Pour le prélèvement des échantillons d'eaux ou d'effluents, se référer à la procédure générale définie dans l'ISO 5667-2. Les flacons doivent être complètement remplis pour ne plus contenir d'air.

L'essai de toxicité doit être effectué dès que possible, dans les 6 h qui suivent le prélèvement. Si ce délai ne peut être respecté, refroidir l'échantillon (+ 4 °C) sur le lieu du prélèvement. Dans ce cas, l'échantillon doit être analysé dans les 48 h suivant le prélèvement.

NOTE 2 Si l'essai ne peut être réalisé dans les 48 h, l'échantillon peut être congelé pour être expérimenté dans les 2 mois suivant le prélèvement.

7.2 Préparation des solutions des substances à expérimenter

7.2.1 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 (5.2), d'eau déionisée ou d'eau distillée 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.

Les solutions mères de substances de faible solubilité aqueuse peuvent être solubilisées ou dispersées directement dans le milieu par des moyens adéquats, incluant des dispositifs à ultrasons ou des solvants de faible toxicité vis-à-vis de *Daphnia magna*. Il convient d'utiliser des solvants seulement si la CE50 est supérieure à la solubilité de la substance d'essai. Si un solvant est utilisé, la concentration du solvant dans la solution d'essai finale ne doit pas dépasser 0,1 ml/l et deux essais témoins, l'un ne contenant aucun solvant, l'autre contenant la concentration maximale en solvant, doivent être inclus dans l'essai.

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 (voir 8.1) par ajout des solutions mères ou des échantillons d'effluents (7.2.1) à l'eau de dilution (5.2) en quantités définies.

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.

8 Mode opératoire

8.1 Généralités

Dans une série de récipients pour essai (6.2), introduire des volumes croissants de solution d'essai (7.2.2) ou d'échantillons d'effluents ou d'eaux (7.1) et compléter avec de l'eau de dilution (5.2), de façon à obtenir les concentrations souhaitées pour l'essai. Placer les *Daphnia magna* dans les récipients pour essai de façon que le nombre total de *Daphnia magna* par récipient ne dépasse pas 20, et que la densité de

Daphnia magna par récipient ne dépasse pas 5 *Daphnia magna* pour 10 ml de solution.

Pour chaque série d'essais, prévoir un récipient témoin dans lequel sont introduits un volume d'eau de dilution (5.2) égal au volume des solutions d'essai et le même nombre de *Daphnia magna* que les solutions d'essai. Lorsqu'un solvant est utilisé pour solubiliser ou disperser les substances, préparer un second récipient témoin avec de l'eau de dilution contenant le solvant à la concentration maximale utilisée (c'est-à-dire inférieure à 0,1 ml/l).

Les animaux ne doivent pas être nourris durant l'essai et les récipients doivent être maintenus à une température de $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

À la fin de la période d'essai de 24 h (et éventuellement de 48 h), dénombrer, dans chaque récipient, les *Daphnia magna* encore mobiles. Celles qui sont incapables de se déplacer après 15 s de légère agitation du liquide doivent être considérées comme étant immobilisées, même si elles agitent leurs antennes.

Déterminer la gamme de concentrations qui fait varier le pourcentage d'immobilisation de 0 % à 100 % et noter éventuellement les anomalies de comportement des *Daphnia magna*.

8.2 Essai préliminaire

Cet essai permet de déterminer la gamme de concentrations à retenir pour l'essai définitif. Dans ce dessein, utiliser une seule série de concentrations (généralement choisies en progression géométrique) de la solution mère ou de l'effluent étudié.

Un exemple est donné dans l'annexe A.

8.3 Essai définitif

Cet essai permet de déterminer les pourcentages de *Daphnia magna* immobilisées pour les différentes concentrations, la CE50_i — 24 h et éventuellement la CE50_i — 48 h.

Il est souhaitable que la gamme de concentrations choisie résulte d'au moins trois pourcentages d'immobilisation compris entre 10 % et 90 %.

Un exemple de gamme de concentrations est donné dans l'annexe A.

Pour chaque concentration et pour chaque témoin, utiliser un minimum de 20 *Daphnia magna*.

Immédiatement après avoir dénombré les *Daphnia magna* immobilisées, mesurer la concentration en

oxygène dissous (voir l'ISO 5813 et l'ISO 5814) dans le récipient pour essai correspondant à la plus faible concentration pour laquelle toutes les *Daphnia magna* ont été immobilisées (si besoin est, réunir pour cela, dans un seul récipient, le contenu des récipients correspondant à cette concentration, en opérant avec les précautions nécessaires pour ne pas modifier la concentration en oxygène dissous).

8.4 Contrôle de la sensibilité de *Daphnia magna* et de la conformité d'application du mode opératoire

Périodiquement, déterminer la CE50_i — 24 h du dichromate de potassium (5.3) en utilisant l'eau de dilution (5.2), de façon à vérifier la sensibilité de *Daphnia magna*. Mentionner cette CE50_i — 24 h dans le rapport d'essai (en ayant en mémoire qu'elle ne représente que la toxicité du dichromate de potassium vis-à-vis de *Daphnia magna* et qu'elle n'est pas représentative de leur sensibilité vis-à-vis d'autres produits).

Effectuer ce contrôle conformément à 8.3. Si la CE50_i — 24 h du dichromate de potassium n'est pas comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l, vérifier la stricte application du mode opératoire et les conditions d'élevage des *Daphnia magna* et, s'il y a lieu, utiliser une nouvelle souche de *Daphnia magna*.

8.5 Essai limite

L'essai limite (voir l'article 3) est effectué avec 20 *Daphnia magna* et en utilisant la méthode décrite en 8.1.

9 Interprétation et validité des résultats

9.1 Estimation de la CE50_i

À la fin de la période d'essai de 24 h, calculer, pour chaque concentration, les pourcentages d'immobilisation par rapport au nombre total de *Daphnia magna* utilisées. Déterminer la CE50_i — 24 h par une méthode statistique appropriée (méthodes des probits, des moyennes mobiles, binomiales ou estimation graphique sur un diagramme gaussien-logarithmique).

Lorsque la présente Norme internationale est appliquée aux substances chimiques et que des analyses de chaque concentration ont été effectuées au début de l'essai et au cours de celui-ci, montrant que l'écart-type relatif des concentrations individuelles mesurées n'est pas supérieur à 20 %, il est possible d'utiliser ces valeurs mesurées pour calculer la CE50 — 24 h plutôt que la CE50_i — 24 h fondée sur

les concentrations initiales. Si la concentration mesurée est inférieure à 80 % de la concentration initiale, il est impossible de calculer la CE50. Dans ce cas, utiliser les données obtenues avec précaution. Si une estimation de la CE50_i — 24 h (ou de la CE50 — 24 h) ne peut être raisonnablement obtenue, en rechercher les causes et recommencer l'essai.

Dans les cas où les données sont insuffisantes ou non nécessaires pour calculer la CE50_i — 24 h (ou la CE50 — 24 h), indiquer la concentration minimale correspondant à 100 % d'immobilisation et la concentration maximale correspondant à 0 % d'immobilisation. Procéder de la même façon que ci-dessus pour calculer la CE50_i — 48 h (ou la CE50 — 48 h), ou s'il existe des données suffisantes, indiquer la concentration minimale correspondant à 100 % d'immobilisation et la concentration maximale correspondant à 0 % d'immobilisation.

9.2 Validité des résultats

Considérer les résultats comme valables si les conditions suivantes sont satisfaites à la fin de l'essai:

- la teneur en oxygène dissous en fin d'essai (mesurée comme indiqué en 8.3) est supérieure ou égale à 2 mg/l;
- le pourcentage d'immobilisation observé dans les récipients témoins est inférieur ou égal à 10 %;
- la CE50_i — 24 h du dichromate de potassium est comprise entre 0,6 mg/l et 1,7 mg/l.

10 Expression des résultats

Exprimer la CE50_i — 24 h, la CE50_i — 48 h (ou la CE50 — 24 h et la CE50 — 48 h), ainsi que les limites correspondant à 0 % et à 100 % d'immobilisation

— en pourcentage dans le cas des effluents ou des eaux;

— en milligrammes par litre dans le cas des substances chimiques.

NOTE 3 Les données peuvent être consignées en d'autres unités.

11 Fidélité

Dans le cadre de la Commission des Communautés européennes, un essai interlaboratoire a été réalisé au cours de l'année 1978. Cet essai a consisté à appliquer la méthode décrite dans la présente Norme

internationale, en particulier pour les substances suivantes:

- acide tétrapropylbenzène sulfonique (T.P.B.S. n° 1);
- tétrapropylbenzène sulfonate de sodium (T.P.B.S. n° 2);
- trichloro-2,4,5 phénoxyacétate de potassium (sel potassique de 2,4,5-T).

Cette dernière substance, bien que peu toxique et peu soluble dans l'eau, a été retenue de façon à disposer de résultats concernant une substance considérée comme étant à la limite du domaine d'application de la méthode décrite dans la présente Norme internationale.

En 1994, il a été demandé aux participants de soumettre les données de CE50_i — 24 h relatives au dichromate de potassium, à partir des essais réalisés depuis 1978. Ces données ont été utilisées pour calculer la gamme acceptable de sensibilités du toxique de référence.

À titre indicatif, les résultats de ces essais interlaboratoires (évalués selon l'ISO 5725-2) sont rassemblés dans le tableau 1.

12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

- une référence à la présente Norme internationale;
- toutes les données nécessaires à l'identification de l'échantillon ou de la substance expérimentée;
- les méthodes de préparation des échantillons:
 - pour les effluents ou les eaux, le mode et la durée de conservation des échantillons, éventuellement, les conditions dans lesquelles ont été effectuées la décantation ou la filtration de l'échantillon et la décongélation,
 - pour les substances chimiques, la méthode de préparation des solutions mères et des solutions d'essai;
- toutes les informations biologiques, chimiques et physiques relatives à l'essai et non prescrites dans la présente Norme internationale, y compris l'origine et l'âge des *Daphnia magna* utilisées;