

---

---

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

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

**iTeh Standards**  
**(<https://standards.iteh.ai>)**  
**Document Preview**

[ISO 6341:2012](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>



Numéro de référence  
ISO 6341:2012(F)

© ISO 2012

# iTeh Standards

## (<https://standards.iteh.ai>)

### Document Preview

[ISO 6341:2012](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>



#### DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2012

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.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

**Sommaire**

Page

<b>Avant-propos .....</b>	<b>iv</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>v</b>
<b>1      Domaine d'application .....</b>	<b>1</b>
<b>2      Références normatives .....</b>	<b>1</b>
<b>3      Termes et définitions .....</b>	<b>1</b>
<b>4      Principe .....</b>	<b>2</b>
<b>5      Environnement d'essai .....</b>	<b>3</b>
<b>6      Réactifs, organismes et milieux d'essai .....</b>	<b>3</b>
<b>7      Appareillage et matériel .....</b>	<b>4</b>
<b>8      Traitement et préparation des échantillons .....</b>	<b>5</b>
<b>8.1     Précautions particulières de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons d'eau, d'effluents ou d'extraits aqueux à soumettre à essai .....</b>	<b>5</b>
<b>8.2     Préparation des solutions de substances à soumettre à essai .....</b>	<b>6</b>
<b>9      Mode opératoire .....</b>	<b>7</b>
<b>9.1     Généralités .....</b>	<b>7</b>
<b>9.2     Essai préliminaire .....</b>	<b>8</b>
<b>9.3     Essai définitif .....</b>	<b>8</b>
<b>9.4     Vérification de la sensibilité de <i>Daphnia magna</i> et de la conformité au mode opératoire .....</b>	<b>8</b>
<b>9.5     Essai limite .....</b>	<b>8</b>
<b>10     Interprétation et validité des résultats .....</b>	<b>8</b>
<b>10.1    Estimation de la CE<sub>50</sub> .....</b>	<b>8</b>
<b>10.2    Critères de validité .....</b>	<b>9</b>
<b>11     Expression des résultats .....</b>	<b>9</b>
<b>12     Rapport d'essai .....</b>	<b>9</b>
<b>Annexe A (informative) Préparation du milieu Elendt M4 .....</b>	<b>11</b>
<b>Annexe B (informative) Exemple de détermination graphique de l'inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i> par un effluent ou une solution mère d'une substance à une concentration de 1 000 mg/l .....</b>	<b>14</b>
<b>Annexe C (informative) Recommandations générales pour l'élevage .....</b>	<b>17</b>
<b>Annexe D (informative) Cultures de <i>Daphnia magna</i> pour la production des œufs de résistance .....</b>	<b>18</b>
<b>Annexe E (informative) Données de fidélité .....</b>	<b>21</b>
<b>Annexe F (informative) Niveau de dilution D — Préparation de la série de dilutions pour la détermination de la plus faible dilution sans effet (LID) .....</b>	<b>22</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>24</b>

## 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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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 du présent document 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.

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

Cette quatrième édition annule et remplace la troisième édition (ISO 6341:1996), qui a fait l'objet d'une révision technique. Elle incorpore également le Rectificatif technique ISO 6341:1996/Cor.1:1998.

**iTeh Standards**  
**(<https://standards.iteh.ai>)**  
**Document Preview**

[ISO 6341:2012](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>

## Introduction

La présente Norme internationale spécifie un mode opératoire de détermination de la toxicité aiguë des substances chimiques, eaux et eaux usées vis-à-vis de la puce d'eau *Daphnia magna* Straus.

L'évaluation des effets nocifs sur la qualité de l'eau s'appuie sur la réalisation d'essais biologiques depuis plusieurs années. Les crustacés présentent un intérêt d'un point de vue écotoxicologique parce qu'ils sont des consommateurs primaires et constituent un élément essentiel du zooplancton des écosystèmes aquatiques.

L'essai spécifié dans la présente Norme internationale concerne la détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus après 24 h ou 48 h d'exposition (selon l'exigence des utilisateurs ou des autorités nationales) à l'échantillon soumis à essai dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale.

iTeh Standards  
(<https://standards.iteh.ai>)  
Document Preview

[ISO 6341:2012](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>



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

**AVERTISSEMENT** — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

**IMPORTANT** — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément à la présente Norme internationale soient exécutés par un personnel ayant reçu une formation adéquate.

## 1 Domaine d'application

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

Cette méthode s'applique aux:

- 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;
- effluents industriels ou domestiques;
- eaux usées traitées ou non;
- extraits aqueux et lixiviats;
- eaux douces (eaux de surface et eaux souterraines);
- élutats de sédiments d'eaux douces;
- eaux interstitielles de sédiments d'eau douce.

## 2 Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 5667-16:1998, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 16: Lignes directrices pour les essais biologiques des échantillons*

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

ISO 10523, *Qualité de l'eau — Détermination du pH*

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

**3.1**

**lot témoin**

série de répliques contenant la solution témoin

[ISO 20665:2008<sup>[3]</sup>, 3.3]

**3.2**

**solution témoin**

milieu d'essai ne contenant pas d'échantillon soumis à essai

**3.3**

**immobilisation**

incapacité des organismes à nager pendant les 15 s qui suivent une agitation légère des solutions d'essai et de contrôle, même s'ils peuvent encore bouger leurs antennes

**3.4**

**CE<sub>50</sub>**

concentration à laquelle un effet conforme au critère d'essai est observé sur 50 % des organismes

[ISO 15088:2007<sup>[1]</sup>, 3.3]

**3.5**

**nouveau-né**

individu qui vient de naître ou qui vient d'éclore

NOTE Dans la présente Norme internationale, un nouveau-né désigne une daphnie au premier stade de développement larvaire, c'est-à-dire d'âge inférieur à 24 h.

[ISO 20665:2008<sup>[3]</sup>, 3.6]

<https://standards.iteh.ai>

**3.6**

**lot d'essai**

série de répliques contenant la même solution d'essai

[ISO 20665:2008<sup>[3]</sup>, 3.8]

[ISO 6341:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>

## 4 Principes

Détermination de la concentration initiale (c'est-à-dire la concentration présente au début de l'essai) qui, en 24 h ou 48 h, immobilise 50 % des *D. magna* exposées, dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale. Cette concentration, connue comme la concentration inhibitrice initiale efficace, est désignée par CE<sub>50</sub> – 24 h ou CE<sub>50</sub> – 48 h.

Une indication de la plus faible concentration soumise à essai qui immobilise toutes les *D. magna* et de la concentration la plus élevée qui n'immobilise aucune *D. magna* est souhaitable et fournit des informations utiles dans les cas où la CE<sub>50</sub> ne peut pas être déterminée.

L'essai est réalisé en une ou deux étapes:

- un essai préliminaire qui détermine la gamme de concentrations à tester dans l'essai définitif de toxicité et qui donne une valeur approximative de la CE<sub>50</sub> – 24 h ou de la CE<sub>50</sub> – 48 h;
- un essai définitif, réalisé lorsque la valeur approximative donnée par l'essai préliminaire est insuffisante, qui permet de calculer la CE<sub>50</sub> – 24 h ou la CE<sub>50</sub> – 48 h et qui détermine les concentrations correspondant à des pourcentages d'immobilisation de 0 % et de 100 %.

Si la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale est utilisée pour les essais biologiques des 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 dispersion stable dans les conditions de l'essai (voir 9.5). Un essai limite peut également être réalisé à des concentrations supérieures à 100 mg/l, si cela donne des informations utiles, tant que la substance est soluble ou en dispersion stable.

## 5 Environnement d'essai

L'exposition des organismes, telle que spécifiée dans la présente Norme internationale, doit être effectuée dans l'obscurité ou en appliquant une photopériode de 16 h de lumière suivies de 8 h d'obscurité, dans une pièce climatisée ou un incubateur à une température de  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  dans les récipients d'essai.

L'atmosphère d'essai doit être exempte de vapeurs ou poussières toxiques vis-à-vis de *D. magna*. Les substances chimiques photodégradables doivent être soumises à essai dans l'obscurité, ou avec un éclairage minimal dans les conditions de photopériode spécifiées, ou avec un éclairage minimal de type lumière rouge, selon le cas.

L'utilisation de témoins (3.1) permet également de vérifier que l'essai est réalisé dans une atmosphère exempte de poussières et vapeurs toxiques.

## 6 Réactifs, organismes et milieux d'essai

Sauf spécification contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue.

**6.1 Organismes d'essai.** Les organismes d'essai sont des nouveau-nés de l'espèce *D. magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*), obtenus par parthénogénèse acyclique dans des conditions d'élevage spécifiées (voir Annexe C).

Les animaux utilisés pour l'essai doivent être âgés de moins de 24 h et il convient qu'ils ne soient pas issus d'une première génération de descendants. Les *D. magna* doivent provenir d'une culture saine, ne montrant aucun signe de stress tel qu'une mortalité supérieure à 20 % en deux jours, la présence de mâles, d'éphippies ou d'animaux décolorés, et aucun retard ne doit être observé dans l'obtention de la première ponte. Isoler les femelles gravides et recueillir les nouveau-nés qui viennent d'éclore dans les 24 h.

Si les conditions de culture diffèrent significativement des conditions d'essai, il est recommandé d'acclimater une génération pendant environ une semaine dans les conditions d'essai afin d'éviter de soumettre les parents et les descendants à un stress.

L'âge de la culture et l'origine (y compris le clone, si possible) de la culture de *D. magna* doivent être indiqués dans le rapport d'essai car la sensibilité de *D. magna* aux substances toxiques peut être affectée par l'origine de la culture.

<http://www.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>

Les *D. magna* peuvent également provenir de l'éclosion d'éphippies obtenues à partir de cultures de laboratoire de ce crustacé, comme décrit à l'Annexe D, ou peuvent être achetées auprès d'une entreprise spécialisée<sup>1)</sup>. Les nouveau-nés éclos des éphippies peuvent être utilisés directement comme organismes d'essai s'ils remplissent tous les critères de validité indiqués dans la présente Norme internationale.

**6.2 Eau pure**, de conductivité inférieure à 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

**6.3 Eau pour l'élevage et eau de dilution.**

**6.3.1 Généralités.** Les eaux naturelles (eau de surface ou eau souterraine), l'eau reconstituée ou l'eau du robinet déchlorée sont acceptables comme eau pour l'élevage et comme eau de dilution si les *D. magna* y survivent pendant les temps de mise en culture, d'acclimatation et d'essai sans montrer de signes de stress. Ces eaux peuvent être utilisées si elles remplissent tous les critères et toutes les conditions établis dans la présente Norme internationale. Les eaux dont le pH est compris entre pH 6 et pH 9 et dont la dureté est comprise entre 140 mg/l et 275 mg/l (en  $\text{CaCO}_3$ ) sont recommandées.

Pour l'élevage de *D. magna* en laboratoire, le milieu M4 (voir Annexe A) peut également être utilisé.

Il convient de ne pas utiliser le milieu M4 (Annexe A) comme eau de dilution pour les échantillons contenant des ions métalliques bivalents. La présence d'EDTA dans ce milieu peut réduire la biodisponibilité des ions

1) MicroBioTests Inc., Mariakerke, Belgique, est un exemple de fournisseur approprié. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande le fournisseur ainsi désigné.

métalliques bivalents, donnant lieu à une diminution de leur toxicité apparente. Et pour la même raison, il convient de ne pas utiliser le milieu M4 comme eau de dilution pour des échantillons de composition inconnue.

**NOTE** Si l'essai est réalisé à des fins nécessitant l'utilisation d'une eau de dilution ayant des propriétés différentes de celles décrites dans les trois alinéas précédents, indiquer les caractéristiques principales de l'eau de dilution synthétique utilisée dans le rapport d'essai.

À titre d'exemple, la préparation d'une eau de dilution satisfaisant à ces exigences est décrite ci-dessous.

Dissoudre des quantités connues de réactifs dans de l'eau pure (6.2). L'eau de dilution ainsi préparée doit avoir un pH de  $7,8 \pm 0,5$ , une dureté de  $(225 \pm 50)$  mg/l (exprimée en  $\text{CaCO}_3$ ), un rapport molaire  $\text{Ca} + \text{Mg}$  proche de 4 + 1 et une concentration en oxygène dissous supérieure à 7 mg/l.

Préparer les solutions spécifiées en 6.3.2 à 6.3.5.

**6.3.2 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 pure (6.2) et compléter à 1 l avec de l'eau pure (6.2).

**6.3.3 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 pure (6.2) et compléter à 1 l avec de l'eau pure (6.2).

**6.3.4 Solution de bicarbonate de sodium.** Dissoudre 2,59 g de bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) dans de l'eau pure (6.2) et compléter à 1 l avec de l'eau pure (6.2).

**6.3.5 Solution de chlorure de potassium.** Dissoudre 0,23 g de chlorure de potassium (KCl) dans de l'eau pure (6.2) et compléter à 1 l avec de l'eau pure (6.2).

**6.3.6 Mélange.** Mélanger 25 ml de chacune des quatre solutions (6.3.2 à 6.3.5) et compléter à 1 l avec de l'eau pure (6.2).

L'eau de dilution doit être aérée jusqu'à ce que la concentration en oxygène dissous ait atteint la saturation et jusqu'à stabilisation du pH. Si nécessaire, ajuster le pH à  $7,8 \pm 0,5$  en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou de l'acide chlorhydrique (HCl). L'eau de dilution ainsi préparée ne doit pas être de nouveau aérée avant utilisation.  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/2d02f429-4473-4403-bd6c-b45d51f40d93/iso-6341-2012>

**6.4 Substance de référence.** Le dichromate de potassium ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) est recommandé.

Étant donné que le dichromate de potassium est une substance cancérogène dont l'inhalation peut s'avérer toxique, l'utilisation d'une solution disponible dans le commerce à concentration définie en  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ <sup>2)</sup> pour la préparation de la solution mère de référence peut réduire le risque d'inhalation des poussières toxiques au laboratoire.

**6.5 Solution d'hydroxyde de sodium**, par exemple  $[\text{NaOH}] = 1 \text{ mol/l}$ .

**6.6 Acide chlorhydrique**, par exemple  $[\text{HCl}] = 1 \text{ mol/l}$ .

## 7 Appareillage et matériel

Appareillage courant de laboratoire et, en particulier, les éléments suivants.

**7.1 Pièce ou enceinte climatisée.**

**7.2 Appareil de mesure de l'oxygène dissous.**

2) Une solution de dichromate de potassium Titrisol est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande le produit ainsi désigné.

**7.3 Récipients d'élevage**, en matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante, par exemple béchers en verre de 2 l.

**7.4 Récipients d'essai**, en matériau chimiquement inerte et de capacité suffisante, par exemple tubes à essai ou béchers en verre.

**7.5 Pipette** pour le prélèvement des organismes d'essai, de diamètre suffisant pour capturer les animaux tout en ne prélevant qu'un volume faible du milieu.

Des micropipettes en matériau plastique inerte munies d'un bulbe à l'extrémité sont parfaitement adaptées à ces opérations.

**7.6 Flacons d'échantillonnage**, tels que spécifiés dans l'ISO 5667-16.

**7.7 Tamis**. Des tamis adaptés (par exemple à mailles de 1,0 mm et 0,3 mm) pour transférer les organismes adultes dans le cadre de l'élevage et pour séparer les jeunes des individus adultes.

## 8 Traitement et préparation des échantillons

### 8.1 Précautions particulières de prélèvement, de transport, de conservation et de traitement des échantillons d'eau, d'effluents ou d'extraits aqueux à soumettre à essai

Il convient que l'échantillonnage, le transport et la conservation des échantillons soient réalisés comme spécifié dans l'ISO 5667-16.

Effectuer l'essai de toxicité dès que possible, de préférence dans les 12 h qui suivent le prélèvement. Si ce délai ne peut pas être respecté, refroidir l'échantillon à une température comprise entre 0 °C et 5 °C et réaliser l'essai dans les 24 h. S'il est impossible de réaliser l'essai dans les 72 h, l'échantillon peut être congelé immédiatement après le prélèvement et maintenu congelé (à une température inférieure à –18 °C) pour être soumis à essai dans les deux mois qui suivent le prélèvement (voir l'ISO 5667-16:1998, Article 5).

Effectuer l'essai immédiatement après la décongélation complète des échantillons, par exemple dans un bain-marie à une température maximale de 30 °C. Ne pas utiliser un four à micro-ondes pour décongeler les échantillons.

Au moment de l'essai, homogénéiser l'échantillon à analyser en l'agitant manuellement. Des concentrations élevées en solides organiques ou inorganiques en suspension dans l'échantillon peuvent nuire aux *D. magna* qui se nourrissent par filtration. Il est possible d'atténuer cette perturbation en clarifiant l'échantillon. Si nécessaire, laisser reposer pendant 2 h au maximum dans un récipient et prélever, par exemple à l'aide d'une pipette, la quantité nécessaire de surnageant, en maintenant l'extrémité de la pipette au centre du récipient d'essai et à mi-distance entre la surface des substances déposées et la surface du liquide. Si l'échantillon brut du surnageant décanté est susceptible de perturber l'essai (en raison de la présence de matière résiduelle en suspension, de protozoaires, de micro-organismes, etc.), centrifuger par exemple pendant 10 min à 5 000g ou filtrer l'échantillon brut ou décanté. Tester la toxicité résiduelle du surnageant. Il convient de vérifier les types de filtres à utiliser par un essai de filtration avec un milieu témoin.

**NOTE** Certains filtres et appareillages peuvent induire une toxicité supplémentaire mesurable, parfois en raison d'agents mouillants ajoutés aux filtres. Un papier filtre peut également absorber les substances toxiques et les éliminer de l'échantillon filtré.

L'échantillon obtenu par l'une de ces méthodes est l'échantillon soumis à essai.

Normalement, aucune aération de l'échantillon ou des concentrations d'essai préparées n'est nécessaire. Si, et seulement si, l'oxygène dissous est inférieur à 40 % de la valeur de saturation, une aération préalable de l'échantillon ou de toutes les solutions d'essai pendant un temps inférieur à 20 min et au moyen de méthodes appropriées, par exemple aération ou agitation, peut être effectuée. Il convient de remédier à toute sursaturation.