

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Daphnia sp., Essai d'immobilisation immédiate

INTRODUCTION

1. Les Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques sont régulièrement mises à jour pour intégrer les progrès de la science. La Ligne directrice 202 «Daphnia sp., Essai d'immobilisation immédiate et Essai de reproduction», adoptée en avril 1984, comportait deux parties : Partie I, l'essai CE50 24h (immobilisation immédiate), et Partie II, l'essai de reproduction (au moins 14 jours). Suite à la révision de l'essai de reproduction, la Ligne directrice 211, «Daphnia magna, Essai de reproduction» a été adoptée et publiée en septembre 1998. Par conséquent, la nouvelle version de la Ligne directrice 202 porte uniquement sur l'essai d'immobilisation immédiate.

2. Cette Ligne directrice décrit un essai de toxicité aiguë pour évaluer les effets des substances chimiques sur des daphnies. Les méthodes d'essai existantes ont été utilisées dans toute la mesure du possible (1)(2)(3). Les principales différences par rapport à la version antérieure sont : l'extension de la durée de l'essai à 48 heures, des informations supplémentaires sur les milieux d'essai et de culture recommandés, et l'introduction d'un essai limite à 100 mg/l de substance d'essai.

PRINCIPE DE L'ESSAI

3. De jeunes daphnies, âgées de moins de 24 heures au début de l'essai, sont exposées à la substance d'essai à différentes concentrations pendant une période de 48 heures. L'immobilisation est enregistrée à 24 et à 48 heures, puis comparée à des valeurs de contrôle. Les résultats sont analysés pour calculer le CE₅₀ à 48 heures (voir l'Annexe 1 pour les définitions). La détermination de la CE₅₀ à 24 heures est facultative.

INFORMATION CONCERNANT LA SUBSTANCE D'ESSAI

4. La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur de la substance d'essai doivent être connues. De même, il faut disposer d'une méthode d'analyse fiable pour doser la substance dans les solutions d'essai dont le rendement de récupération et la limite de détermination sont connus. Des informations utiles comprennent la formule structurale, la pureté de la substance, la stabilité dans l'eau et à la lumière, le P_{oc} et les résultats d'un essai de biodégradabilité immédiate (voir la Ligne directrice 301).

Remarque : Un document guide séparé (4) propose des informations pour les substances avec lesquelles les essais sont rendus difficiles du fait de leurs propriétés physico-chimiques.

SUBSTANCES DE RÉFÉRENCE

5. Dans l'essai d'immobilisation, on peut déterminer la CE₅₀ d'une substance de référence, de manière à s'assurer que les conditions d'essai sont fiables. Les toxiques utilisés dans les essais tournants

internationaux (1)(5) sont recommandés pour cet usage¹. Les essais avec une substance de référence doivent être effectués de préférence tous les mois et au moins deux fois par an.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

6. Pour qu'un essai soit valide, les critères de performance suivants s'appliquent :

- pas plus de 10 pour cent des daphnies ne doivent être immobilisées dans le groupe témoin, y compris le témoin contenant l'agent solubilisant ;
- la concentration d'oxygène dissous à la fin de l'essai doit être ≥ 3 mg/l dans les récipients d'essai et les récipients témoins.

Remarque : Pour le premier critère, pas plus de 10 pour cent des daphnies du témoin ne doivent être immobilisées ou montrer d'autres signes de défaillance ou de stress, tels qu'une décoloration ou un comportement inhabituel (piégées à la surface de l'eau, par exemple).

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

7. Les récipients et autres équipements qui sont amenés à entrer en contact avec les solutions d'essai doivent être intégralement en verre, ou en un autre matériau chimiquement inerte. Les récipients d'essai sont le plus souvent des éprouvettes ou des béchers en verre. Avant chaque usage, ils doivent être nettoyés selon les procédures de laboratoire standard. Afin de réduire la déperdition d'eau par évaporation et de prévenir l'entrée de poussière dans les solutions, les récipients d'essai doivent être couverts. Les essais sur les substances volatiles doivent être conduits dans des récipients complètement remplis et fermés, suffisamment grands pour éviter que l'oxygène ne soit trop bas ou ne devienne un facteur limitant (voir les paragraphes 6 et 22).

8. Par ailleurs, tout ou partie des équipements suivants est nécessaire : un appareil pour mesurer la concentration de l'oxygène (à l'aide d'une microélectrode ou d'un autre dispositif destiné à mesurer l'oxygène dissous dans des échantillons de faible volume) ; un pH-mètre ; un thermostat adéquat ; un appareil pour déterminer la concentration de carbone organique totale (COT) ; un appareil pour déterminer la demande chimique en oxygène (DCO) ; un appareil pour déterminer la dureté de l'eau, etc.

Organisme d'essai

9. L'espèce à utiliser de préférence dans cet essai est *Daphnia magna* Straus, mais d'autres espèces de *Daphnia* peuvent aussi être utilisées (*Daphnia pulex*, par exemple). Au début de l'essai, les animaux doivent être âgés de 24 heures au maximum, et pour réduire la variabilité, il est fortement recommandé qu'ils ne proviennent pas d'une première génération de descendants. Ils doivent être issus d'un lot sain (c'est-à-dire qui ne présente pas de signes de stress, tels qu'une mortalité élevée, la présence de mâles et d'éphippies, un retard dans la production des premiers descendants, des animaux décolorés, etc.). Tous les organismes utilisés dans un essai donné doivent provenir de cultures établies à partir d'un même lot de daphnies. Le lot d'animaux doit être maintenu dans des conditions de culture (lumière, température,

¹ Les résultats de ces essais inter-laboratoires, ainsi qu'un Corrigendum technique à l'ISO 6341, donnent une CE₅₀ 24h du dichromate de potassium (K₂Cr₂O₇) comprise entre 0,6 mg/l et 2,1 mg/l.

milieu) semblables à celles qui seront appliquées au cours de l'essai. Si le milieu utilisé dans l'essai est différent de celui où sont normalement élevées les daphnies, il convient de leur laisser une période d'acclimatation avant l'essai. En l'occurrence, il convient de les maintenir dans de l'eau de dilution à la température de l'essai pendant au moins 48 heures avant le début de l'essai.

Eau d'acclimatation et de dilution

10. On peut utiliser, comme eau d'acclimatation et de dilution, de l'eau naturelle (eau de surface ou eau souterraine), de l'eau reconstituée ou de l'eau du robinet déchlorée, du moment que les daphnies y survivent sans montrer de signes de stress pendant toute la durée de l'élevage, de l'acclimatation et de l'essai. Toute eau conforme aux caractéristiques chimiques d'une eau de dilution acceptable données dans la liste de l'Annexe 2 convient pour cet essai. Sa qualité doit rester constante tout au long de l'essai. Les eaux reconstituées peuvent être composées d'eau distillée ou déionisée auxquelles on ajoute certaines quantités spécifiques de réactifs de qualité pour analyse. Des exemples d'eau reconstituée sont donnés dans les documents (1)(6) et dans l'Annexe 3. Il convient de noter que les milieux contenant des agents chélatants connus, tels que les milieux M4 et M7 présentés dans l'Annexe 3, doivent être évités pour les essais de substances contenant des métaux. Le pH doit être compris entre 6 et 9. Une dureté comprise entre 140 et 250 mg/l (en CaCO₃) est recommandée pour les *Daphnia magna*, mais des duretés inférieures conviennent également pour d'autres espèces de *Daphnia*. L'eau de dilution peut être aérée avant utilisation dans l'essai, de façon à ce que la concentration de l'oxygène dissous atteigne la saturation.

11. Lorsque de l'eau naturelle est utilisée, les paramètres de sa qualité doivent être mesurés au moins deux fois par an, ou chaque fois que ses caractéristiques sont susceptibles d'avoir été significativement modifiées (voir le paragraphe 10 et l'Annexe 2). Les métaux lourds (Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni, par exemple) doivent être mesurés. Si de l'eau du robinet déchlorée est utilisée, il est souhaitable de procéder chaque jour à une analyse de sa teneur en chlore. Si l'eau de dilution provient d'une eau souterraine ou d'une eau de surface, sa conductivité et son carbone organique total (COT) ou sa demande chimique en oxygène (DCO) doivent être mesurés.

Solutions d'essai

12. Les solutions d'essai sont généralement amenées à la concentration voulue par dilution d'une solution mère. De préférence, les solutions mères doivent être préparées par dissolution de la substance d'essai dans l'eau de dilution. Le recours à des solvants, émulsifiants ou dispersants doit être évité dans toute la mesure du possible. Néanmoins, ces additifs sont parfois nécessaires pour obtenir une solution mère à la concentration voulue. Le document guide (4) donne des informations sur le choix des solvants, émulsifiants et dispersants appropriés. En tout cas, la substance d'essai dans la solution d'essai ne doit pas excéder sa limite de solubilité dans l'eau de dilution.

13. L'essai doit être mené sans ajustement du pH. Si le pH ne reste pas dans la plage comprise entre 6 et 9, alors il convient de procéder à un deuxième essai, en ajustant le pH de la solution mère à celui de l'eau de dilution avant d'ajouter la substance d'essai. Lors de l'ajustement du pH, il faut que la concentration de la solution mère ne soit quasiment pas modifiée, ni qu'aucune réaction chimique, ni précipitation de la substance d'essai ne soit provoquée. De préférence, il convient d'employer du HCl et du NaOH.

MODE OPÉRATOIRE

Conditions d'exposition

Témoins et groupes d'essai

14. On remplit les récipients d'essai avec les volumes voulus d'eau de dilution et de solutions de la substance d'essai. Le rapport air/volume d'eau à l'intérieur des récipients doit être identique pour les témoins et groupes d'essai. On place ensuite les daphnies dans les récipients. Il faut utiliser, pour chaque concentration d'essai et pour les témoins, au moins 20 animaux, répartis de préférence en quatre groupes de cinq animaux. Un volume d'au moins 2 ml de solution d'essai doit être prévu pour chaque animal (soit un volume de 10 ml pour cinq daphnies par récipient). Si la concentration de la substance d'essai n'est pas stable, un système de renouvellement semi statique ou continu peut être utilisé pour l'essai.

15. Parallèlement aux séries traitées, il faut tester une série de témoins de l'eau de dilution et, le cas échéant, une série de témoins contenant l'agent solubilisant (solvant) en quantité utilisée dans les séries traitées.

Concentrations d'essai

16. A moins qu'une information soit déjà disponible sur la toxicité de la substance d'essai, un essai peut le cas échéant être mené pour déterminer la plage des concentrations de l'essai définitif. A cette fin, les daphnies sont exposées à une série de concentrations de la substance d'essai largement espacées. Cinq daphnies sont exposées à chaque concentration pendant 48 heures ou moins. Aucun essai identique n'est nécessaire. La période d'exposition peut être raccourcie (24 heures ou moins, par exemple) s'il est possible d'obtenir plus rapidement les données voulues.

17. Il faut utiliser au moins cinq concentrations formant une série géométrique de concentrations successives séparées, de préférence, par un facteur inférieur ou égal à 2,2. L'utilisation de moins de cinq concentrations doit être justifiée. De préférence, la concentration la plus élevée doit provoquer 100 pour cent d'immobilisation, et la moins élevée ne doit donner lieu à aucun effet observable.

Conditions d'incubation

18. La température doit être comprise entre 18 °C et 22 °C, et pour chaque essai elle doit être constante à ± 1 °C. Une alternance de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité est recommandée. Une obscurité complète est également acceptable, en particulier pour les substances d'essai instables à la lumière.

19. Les récipients d'essai ne doivent pas être aérés durant l'essai. L'essai est mené sans ajustement du pH. Les daphnies ne doivent pas être nourries pendant l'essai.

Durée

20. La durée de l'essai est de 48 heures.

Observations

21. A échéances de 24 et 48 heures après le début de l'essai, la présence de daphnies immobiles doit être contrôlée dans chaque récipient d'essai (voir l'Annexe 1 pour les définitions). Outre l'immobilité, tout comportement ou signe anormal doit être signalé.

Mesures analytiques

22. L'oxygène dissous et le pH sont mesurés au début et à la fin de l'essai dans les récipients témoins et dans ceux contenant la concentration de la substance d'essai la plus élevée. La concentration de l'oxygène dissous dans les témoins doit être conforme au critère de validité (voir le paragraphe 6). Normalement, le pH ne doit pas varier de plus de 1,5 unité au cours d'un essai. En règle générale, on mesure la température dans les récipients témoins ou la température ambiante, et de préférence il y a lieu de l'enregistrer en continu au cours de l'essai ou, au minimum, au début et à la fin de l'essai.

23. La concentration de la substance d'essai doit être mesurée, au minimum, dans les récipients contenant la concentration la plus élevée et la concentration la plus basse, au début et à la fin de l'essai (4). Il est recommandé de baser les résultats sur les concentrations mesurées. Toutefois, si l'on peut démontrer de façon suffisamment convaincante que la concentration de la substance d'essai a été maintenue tout au long de l'essai de manière satisfaisante dans un intervalle de ± 20 pour cent de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée, alors les résultats peuvent être basés sur les valeurs nominales ou les valeurs initiales mesurées.

ESSAI LIMITE

24. Sur la base du mode opératoire décrit dans cette Ligne directrice, un essai limite peut être conduit à 100 mg/l de substance d'essai ou jusqu'à sa limite de solubilité dans le milieu d'essai (selon la valeur la plus basse), de façon à démontrer que la CE_{50} est supérieure à cette concentration. L'essai limite doit être mené sur 20 daphnies (de préférence réparties en quatre groupes de cinq), avec un nombre équivalent d'animaux dans les récipients témoins. Si le pourcentage d'immobilisations dépasse les 10 pour cent à la fin de l'essai, il y a lieu de mener une étude complète. Tout comportement anormal observé doit être enregistré.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Résultats

25. Les résultats doivent être synthétisés dans des tableaux mettant en évidence, pour chaque groupe d'essai et chaque témoin, le nombre de daphnies utilisées et l'immobilisation à chaque observation. En outre, une représentation graphique doit montrer les pourcentages immobilisés à 24 et 48 heures par concentration d'essai. Les résultats sont analysés au moyen des méthodes statistiques appropriées (analyse probit, par exemple) permettant de calculer les pentes des courbes et la CE_{50} avec des limites de confiance de 95 pour cent ($p = 0,95$) (7)(8).

26. Lorsque les données obtenues ne se prêtent pas au calcul de la CE_{50} par les méthodes standard, on doit utiliser la concentration la plus élevée qui ne donne aucune immobilisation et la plus faible qui donne 100 pour cent d'immobilisation pour en déduire une valeur approximative de la CE_{50} (en prenant la moyenne géométrique de ces deux concentrations).

Rapport d'essai

27. Le rapport d'essai doit mentionner les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique et propriétés physico-chimiques pertinentes ;
- données permettant l'identification chimique, y compris la pureté.

Espèce d'essai :

- source et espèce de *Daphnia*, fournisseur (s'il est connu) et conditions de culture appliquées (notamment source, type et quantités de nourriture, fréquence de l'alimentation).

Conditions expérimentales :

- description des récipients d'essai : type et volume des récipients, volume de la solution, nombre de daphnies par récipient, nombre de récipients d'essai (essais identiques) par concentration ;
- méthodes de préparation des solutions mères et d'essai, et notamment l'utilisation éventuelle de tout solvant ou agent dispersant, et les concentrations utilisées ;
- détails concernant l'eau de dilution : source et caractéristiques (pH, dureté, rapport Ca/Mg, rapport Na/K, alcalinité, conductivité, etc.) ; le cas échéant, composition de l'eau reconstituée ;
- conditions d'incubation : température, intensité et périodicité de la lumière, oxygène dissous, pH, etc.

Résultats :

- nombre et pourcentage de daphnies immobilisées ou ayant manifesté un effet adverse quelconque (y compris un comportement anormal) parmi les témoins et les groupes traités à chaque période d'observation, et une description de la nature des effets constatés ;
- résultats et date de l'essai effectué avec une substance de référence, le cas échéant ;
- concentrations d'essai nominales et résultat de toutes les analyses visant à déterminer la concentration de la substance d'essai dans les récipients d'essai ; l'efficacité de la méthode de récupération et la limite de détermination doivent également être signalées ;
- toutes les mesures physico-chimiques (température, pH et oxygène dissous) effectuées au cours de l'essai ;
- CE₅₀ à 48 heures (immobilisation) avec les intervalles de confiance et les graphiques du modèle utilisé pour le calcul, les pentes des courbes dose-effet et leur erreur standard ; procédures statistiques utilisées pour déterminer la CE₅₀ ; (ces informations doivent aussi être précisées pour l'immobilisation à 24 heures lorsque les mesures ont été effectuées) ;
- explication de tout écart par rapport à la Ligne directrice, et des conséquences éventuelles sur les résultats de l'essai.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) ISO 6341. (1996). Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Essai de toxicité aiguë. Troisième édition, 1996.
- (2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines - Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.
- (3) Environnement Canada. (1996) Méthode d'essai biologique. Essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environnement Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

- (4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.
- (5) Commission des Communautés Européennes. Etude D8369. (1979). Programme d'essais interlaboratoires concernant l'étude de l'écotoxicité d'une substance chimique vis-à-vis de la *Daphnia*.
- (6) OCDE, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques. Ligne directrice 211 : *Daphnia magna*, essai de reproduction, adoptée en septembre 1998.
- (7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC50. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 - American Society for Testing and Materials. p.65-84
- (8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, Royaume-Uni.

ANNEXE 1**DÉFINITIONS**

Les définitions suivantes sont utilisées dans le cadre de la présente Ligne directrice :

CE₅₀ : concentration estimée capable d'immobiliser 50 pour cent des daphnies après une période d'exposition définie. Si une autre définition est utilisée, elle doit être indiquée avec sa référence.

Immobilisation : les animaux incapables de nager au bout de 15 secondes après agitation douce du récipient utilisé pour l'essai sont considérés comme immobiles (même s'ils sont toujours capables de bouger leurs antennes).

ANNEXE 2QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CHIMIQUES D'UNE EAU DE DILUTION ACCEPTABLE

Substances	Concentration
Particules	<20 mg/l
Carbone organique total	< 2 mg/l
Ammoniac non ionisé	< 1 µg/l
Chlore résiduel	< 10 µg/l
Total des pesticides organophosphorés	< 50 ng/l
Total des pesticides organochlorés plus biphényles polychlorés	< 50 ng/l
Chlore organique total	< 25 ng/l

ANNEXE 3EXEMPLES D'EAU D'ESSAI RECONSTITUÉE ACCEPTABLEEau d'essai ISO (1)

Solutions mères (substance unique)		Pour préparer l'eau reconstituée, ajouter les volumes suivants de solutions mères à 1 litre d'eau*
Substance	Quantité ajoutée à 1 litre d'eau*	
Chlorure de calcium dihydraté CaCl ₂ , 2H ₂ O	11,76 g	25 ml
Sulfate de magnésium hydraté MgSO ₄ , 7H ₂ O	4,93 g	25 ml
Hydrogénocarbonate de sodium NaHCO ₃	2,59 g	25 ml
Chlorure de potassium KCl	0,23 g	25 ml

* Eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau déionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse, avec une conductivité de préférence inférieure à 10 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

ANNEXE 3 (suite)Milieux Elendt M7 et M4Acclimatation aux milieux Elendt M4 et M7

Certains laboratoires ont rencontré des difficultés pour transférer directement les *Daphnia* dans les milieux M4 et M7. Ils sont toutefois parvenus à un certain résultat en les acclimatant progressivement, c'est-à-dire en les transférant de leur milieu vers un milieu à 30 pour cent d'Elendt, puis à 60 pour cent d'Elendt et enfin à 100 pour cent d'Elendt. Les périodes d'acclimatation peuvent prendre jusqu'à un mois.

PréparationÉléments en traces

Différentes solutions mères (I), contenant chacune une seule substance en traces, sont tout d'abord préparées avec une eau d'une pureté adéquate, par exemple de l'eau déionisée, distillée ou obtenue par osmose inverse. A partir de ces différentes solutions mères (I), on prépare une deuxième solution mère unique (II) renfermant toutes les substances en traces (solution combinée), à savoir :

Solution(s) mère(s) I (substance unique)	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Pour préparer la solution mère combinée II, ajouter la quantité suivante de solution mère I à l'eau (ml/l)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000 fois	1,0	0,25
MnCl ₂ •4H ₂ O	7 210	20 000 fois	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000 fois	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000 fois	1,0	0,25
SrCl ₂ •6H ₂ O	3 040	20 000 fois	1,0	0,25
NaBr	320	20 000 fois	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	1 230	20 000 fois	1,0	0,25
CuCl ₂ •2H ₂ O	335	20 000 fois	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000 fois	1,0	1,0
CoCl ₂ •6H ₂ O	200	20 000 fois	1,0	1,0
KI	65	20 000 fois	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000 fois	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000 fois	1,0	1,0
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	5 000	2 000 fois	-	-
FeSO ₄ •7H ₂ O	1991	2 000 fois	-	-
Les solutions de Na ₂ EDTA et de FeSO ₄ sont préparées séparément, puis mélangées et immédiatement autoclavées. Cela donne :				
Solution 21 Fe- EDTA		1 000 fois	20,0	5,0

Milieux M4 et M7

Les milieux M4 et M7 sont préparés à partir de la solution mère II, de macronutriments et de vitamines, de la façon suivante :

	Quantité ajoutée à l'eau (mg/l)	Concentration (par rapport au milieu M4)	Quantité de solution mère II ajoutée pour préparer le milieu (ml/l)	
			M4	M7
Solution mère II (combinaison de substances en traces)		20 fois	50	50
Solutions mères contenant les macronutriments (une substance par solution)				
CaCl ₂ •2H ₂ O	293 800	1 000 fois	1,0	1,0
MgSO ₄ •7H ₂ O	246 600	2 000 fois	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000 fois	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000 fois	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ •9H ₂ O	50 000	5 000 fois	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000 fois	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000 fois	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000 fois	0,1	0,1
Solution mère de vitamines combinées	-	10 000 fois	0,1	0,1
La solution mère de vitamines combinées est préparée en additionnant 3 vitamines à 1 litre d'eau, comme indiqué ci-dessous :				
Chlorhydrate de thiamine	750	10 000 fois		
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10 000 fois		
Biotine	7.5	10 000 fois		

La solution mère de vitamines combinées est congelée par petites parties aliquotes. Les vitamines sont ajoutées au milieu peu avant son utilisation.

N.B: Afin d'éviter que les sels ne précipitent lorsqu'on prépare le milieu complet, il faut ajouter les parties aliquotes de solution mère à quelque 500 à 800 ml d'eau déionisée et amener le volume à 1 litre.

N.N.B: La première publication relative au milieu M4 se trouve dans Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.