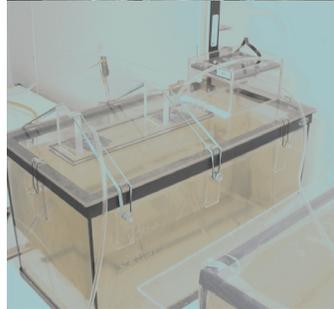


SPE 1/RM/50 – Mars 2008

Centre des sciences et technologies environnementales
Direction des sciences et de la technologie
Environnement Canada



**SÉRIE DE LA
PROTECTION DE
L'ENVIRONNEMENT**

Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc en ciel



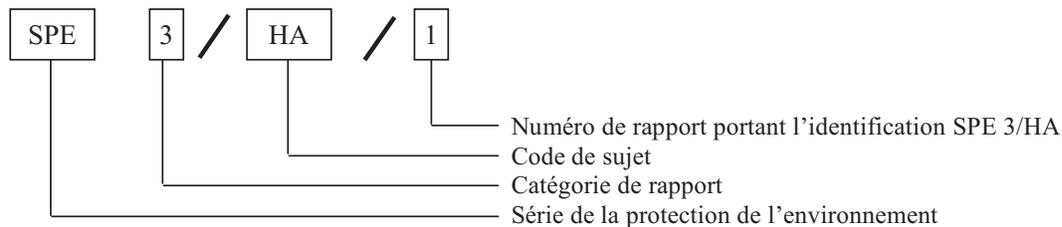
Environnement
Canada

Environment
Canada

Canada

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation



Catégories

- 1 Règlements/Lignes directrices/Codes de pratiques
- 2 Évaluation des problèmes et options de contrôle
- 3 Recherche et développement technologique
- 4 Revues de la documentation
- 5 Inventaires, examens et enquêtes
- 6 Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux
- 7 Surveillance
- 8 Propositions, analyses et énoncés de principes généraux
- 9 Guides

Sujets

- AG** Agriculture
AN Technologie anaérobie
AP Pollution atmosphérique
AT Toxicité aquatique
CC Produits chimiques commerciaux
CE Consommateurs et environnement
CI Industries chimiques
FA Activités fédérales
FP Traitement des aliments
HA Déchets dangereux
IC Produits chimiques inorganiques
MA Pollution marine
MM Exploitation minière et traitement des minéraux
NR Régions nordiques et rurales
PF Papier et fibres
PG Production d'électricité
PN Pétrole et gaz naturel
RA Réfrigération et conditionnement d'air
RM Méthodes de référence
SF Traitement des surfaces
SP Déversements de pétrole et de produits chimiques
SRM Méthodes de référence normalisées
TS Transports
TX Textiles
UP Pollution urbaine
WP Protection et préservation du bois

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la Série de la protection de l'environnement à l'adresse suivante : Services des communications, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.



Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre des sciences et technologies environnementales
Direction des sciences et de la technologie
Environnement Canada
Ottawa

Rapport SPE 1/RM/50
Mars 2008

Catalogage avant publication de Bibliothèque et Archives Canada

Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel [ressource électronique] /Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre des sciences et technologies environnementales, Direction générale des sciences et de la technologie, Environnement Canada.

(Rapport ; SPE 1/RM/50)

Monographie électronique en version PDF.

Mode d'accès: World Wide Web.

Publ. aussi en anglais sous le titre: Procedure for pH stabilization during the testing of acute lethality of wastewater effluent to rainbow trout.

Comprend des réf. bibliogr.

Également publ. en version imprimée

ISBN 978-0-662-09449-4

No de cat.: En49-7/1-50F-PDF

1. Eaux usées--Qualité--Essais--Normes--Canada.

2. Toxicité--Méthodologie--Normes--Canada.

3. Eau--Qualité--Essais biologiques.

4. Truite-arc-en-ciel, Effets de la pollution de l'eau sur la.

I. Canada. Environnement Canada

II. Centre des sciences et technologies environnementales (Canada). Section de l'élaboration et de l'application des méthodes

III. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada : En ligne) ; SPE 1/RM/50.

QH90.57.B5P7614 2008

628.1'61

C2008-980126-1

Commentaires des lecteurs

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins
Chef, Division des méthodes biologiques
Centre des sciences et technologies environnementales
Environnement Canada
335, River Road
K1A 0H3

Lisa Taylor
Gestionnaire, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre des sciences et technologies environnementales
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa
K1A 0A3

This publication is also available in English from:

Communications Services
Environment Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue pas une recommandation de leur emploi par Environnement Canada. D'autres produits de valeur semblable existent.

Résumé

Le présent document expose dans le détail des techniques, des conditions et des conseils permettant la stabilisation du pH d'échantillons d'effluent d'eau usée. Les modes opératoires décrits doivent être utilisés conjointement avec les consignes explicites données dans la méthode de référence SPE 1/RM/13 intitulée Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel (Environnement Canada, 2000). Cette procédure n'est pas autonome ; elle est complémentaire à la méthode de la détermination de la létalité aiguë chez la truite arc-en-ciel.

Dans beaucoup d'échantillons d'effluent d'eau usée, la teneur en dioxyde de carbone (CO₂) risque d'être élevée en raison d'une forte activité biologique. L'aération de ces échantillons peut provoquer l'augmentation du pH, celle-ci causée par la perte de CO₂, ce qui peut modifier la toxicité de l'ammoniac présent. La stabilisation du pH a pour but de remplacer le CO₂ perdu à cause de l'aération pour maintenir le pH durant l'essai aux valeurs où il se trouvait initialement dans les échantillons.

Pour qu'on lui applique cette procédure complémentaire, l'échantillon doit satisfaire à trois conditions : (i) il faut doser l'ammoniac total de tous les échantillons d'effluent d'eau usée soumis à un essai par la méthode SPE 1/RM/13 ; (ii) un échantillon antérieur de l'effluent doit avoir échoué à un essai de létalité aiguë pour la truite arc-en-ciel (SPE 1/RM/13) ; (iii) les techniques de stabilisation du pH ne peuvent être utilisées que lorsque la concentration d'ammoniac non ionisé présent dans l'échantillon d'effluent d'eau usée non dilué est inférieure à 1,25 mg/L à 15 °C ou lorsque la concentration d'ammoniac total est inférieure à la concentration maximale d'ammoniac total (y) en mg/L déterminée à l'aide de la formule suivante et du pH initial de l'échantillon à 15 °C :

$$y = 1,25 \times (10^{(9,564\ 136\ 638 - \text{pH})} + 1)$$

Dans le présent document, on décrit trois techniques de stabilisation du pH utilisables en complément de la méthode SPE 1/RM/13 : (i) l'injection de CO₂ ; (ii) le recyclage ; (iii) la technique du pH-mètre régulateur.

Cette procédure de stabilisation du pH s'applique aux essais à concentration unique comme aux essais à concentrations multiples visant à déterminer la concentration létale médiane (CL50). Elle comprend des instructions sur le montage de l'appareillage, les observations et mesures à effectuer et la régulation du pH durant l'essai. On expose brièvement les critères de validité de la procédure auxquels il faut satisfaire en plus de ceux qui sont exposés dans la méthode SPE 1/RM/13.

Abstract

This document provides detailed techniques, conditions, and guidance for the pH stabilization of wastewater effluent samples. The procedure described herein must be used in conjunction with the explicit instructions given in the reference method EPS 1/RM/13 “Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout” (Environment Canada, 2000). This procedure is not stand-alone; it is an add-on to the rainbow trout method for acute lethality.

In many wastewater effluent samples, the carbon dioxide (CO₂) content may be elevated as a result of high biological activity. Aeration of these samples may cause the pH to rise because of a loss of CO₂, and this change in pH can alter the toxicity of the ammonia present in the wastewater effluent sample. The purpose of pH stabilization is to replace the CO₂ lost due to aeration in order to maintain the pH throughout the test at the same levels found in the initial samples.

In order to use this add-on procedure, the wastewater effluent sample must meet three conditions: (i) total ammonia must be measured on all wastewater effluent samples submitted for testing with EPS 1/RM/13, (ii) the wastewater effluent must have failed an acute lethality test using rainbow trout (EPS 1/RM/13) on a previously collected sample, and (iii) pH stabilization techniques may only be used when the un-ionized ammonia concentration present in the 100% wastewater effluent sample does not equal or exceed 1.25 mg/L at 15°C or when the total ammonia concentration does not equal or exceed the maximum total ammonia concentration (y) in mg/L determined using the following formula and the initial pH of the wastewater effluent sample at 15°C:

$$y = 1.25 \times (10^{(9.564136638 - \text{pH})} + 1)$$

This procedure document describes three pH stabilization techniques that can be used as an add-on to EPS 1/RM/13: (i) CO₂ injection; (ii) Recycling; and (iii) pH Controller.

This pH stabilization procedure applies to both single-concentration tests and multi-concentration tests to determine the median lethal concentration (LC50). Instructions are included on the apparatus setup, observations and measurements to be made, and maintaining pH control throughout the test. Validity criteria for this add-on procedure are outlined, and these must be met in addition to those outlined in EPS 1/RM/13.

Avant-propos

Les trois techniques de stabilisation du pH d'un effluent d'eau usée pendant un essai de létalité aiguë fonctionnent comme modes opératoires complémentaires de la méthode de référence SPE 1/RM/13 ; la technique choisie doit être utilisée conjointement avec cette méthode de référence pour mesurer et évaluer l'effet ou les effets toxiques de l'effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel. On ne peut l'utiliser que lorsque l'échantillon d'essai satisfait aux trois conditions exposées dans le document ; ces conditions concernent le dosage de l'ammoniac total dans tous les échantillons d'effluent d'eau usée soumis à l'essai de toxicité, l'échec de la méthode de référence sur un échantillon antérieur d'effluent d'eau usée et la quantité d'ammoniac non ionisé dans l'échantillon d'effluent à l'étude.

Cette procédure complémentaire expose un ensemble explicite d'instructions et de conditions à employer avec la méthode SPE 1/RM/13 et qu'on n'applique qu'aux échantillons d'effluent d'eau usée définis dans le document.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Avant propos	vii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	x
Terminologie	xi
Remerciements	xiv

Section 1

Introduction	1
1.1 Première condition — dosage de l’ammoniac total.....	2
1.2 2e condition — échec de la méthode de référence SPE 1/RM/13 sur la létalité aiguë	2
1.3 3e condition — Concentration maximale d’ammoniac	2
1.4 Survol des techniques de stabilisation du pH	3

Section 2

Options pour la stabilisation du pH d’effluents d’eau usée	4
2.1 Exigences générales	4
2.1.1 Observations et mesures	5
2.1.2 Échantillons d’eau usée chlorée.....	6
2.1.3 Critères de validité de l’essai	6
2.2 Stabilisation du pH par injection de CO ₂	6
2.2.1 Appareillage pour la fourniture du mélange de CO ₂	7
2.2.2 Estimation du pourcentage de mélange de CO ₂ dont on a besoin pour stabiliser le pH	7
2.2.3 Réglages des débits du mélange de CO ₂ et de l’air du laboratoire	10
2.2.4 Maîtrise de la dérive du pH.....	11
2.3 Stabilisation du pH par recyclage	12
2.3.1 Montage de la technique de recyclage	13
2.3.2 Maîtrise de la dérive du pH.....	13
2.4 Stabilisation du pH au moyen d’un pH-mètre régulateur	15
2.4.1 Bloc détenteur et solénoïde	15
2.4.2 pH-mètre régulateur	19
2.4.3 Maîtrise de la dérive du pH.....	19

Section 3

Présentation des résultats	21
Références	22

Liste des tableaux

1. — Table d'étalonnage du CO₂ permettant d'estimer le taux de CO₂ requis pour maintenir le pH, en fonction du pH et de l'alcalinité de la solution d'essai10

Liste des figures

1. — Schéma du montage nécessaire à un essai à six concentrations employant la technique d'injection de CO₂8
2. — Vue de face du tableau de contrôle et des débitmètres pour l'application de la technique d'injection de CO₂8
3. — Vue de derrière du tableau de contrôle pour l'application de la technique d'injection de CO₂ montrant les liaisons.....9
4. — Aquariums de verre employés pour la technique d'injection de CO₂9
5. — Seaux de plastique employés pour la technique d'injection de CO₂ 9
6. — Schéma du montage employé pour la technique de recyclage14
7. — Aquariums de verre avec point de prise d'échantillons, pompe à air et couvercle pour l'application de la technique de recyclage14
8. — Schéma du montage employé pour un essai à six concentrations utilisant la technique du pH-mètre régulateur16
9. — Bloc solénoïde, détendeur et vanne à pointeau pour la technique du pH-mètre régulateur17
10. —Montage expérimental pour la technique du pH-mètre régulateur17
11. —Vue générale du montage employé pour l'essai de détermination de la CL50 utilisant la technique du pH-mètre régulateur18
12. —Exemple de pH-mètre régulateur18
13. —Conduite de CO₂ et antiretour19

Terminologie

Les mots ou expressions définis sous la présente rubrique sont mis en italique lorsqu'ils paraissent pour la première fois dans le corps du texte conformément à leur définition. Toutes les définitions s'inscrivent dans le contexte du présent rapport. Elles pourraient ne pas être adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) et *il faut* expriment l'obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait* (*devraient*) et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*) expriment une recommandation ou la nécessité de respecter, dans la mesure du possible, la condition ou la marche à suivre.

L'auxiliaire *peut* (*peuvent*) exprime l'autorisation ou la capacité d'accomplir une action.

Termes techniques

aigu, Survenant dans un bref délai (≤ 96 h dans le cas de l'essai de létalité aiguë pour la truite arc-en-ciel).

alcalinité, Capacité de l'eau de neutraliser l'acidité, exprimée en milligrammes de carbonate de calcium (CaCO_3) par litre (mg/L) [voir APHA *et al.*, 2005].

ammoniac, L'ammoniac total [$\text{NH}_3 + \text{NH}_4$, en tant qu'azote (N)], l'ammoniac non ionisé (NH_3 en tant que N) et l'ammoniac ionisé (NH_4^+ en tant que N). Le pourcentage d'ammoniac non ionisé (NH_3) dans l'ammoniac total est déterminé par le pH et la température. Les formules suivantes permettent de calculer les fractions non ionisée et ionisée. Comme $\text{NH}_3 = 1/(1 + 10^{\text{pK} - \text{pH}})$, que $\text{NH}_4^+ = 1/(1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}})$ et que l'ammoniac total = $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, la concentration d'ammoniac non ionisé (en posant $\text{pK} = 9,56$ à 15°C) se calcule comme suit : ammoniac non ionisé = (ammoniac total) $\times [1/(1 + 10^{\text{pK} - \text{pH}})]$ (USEPA, 1999).

CL50 (concentration létale médiane), Concentration d'effluent dans l'eau que l'on estime létale pour la moitié des organismes soumis à l'essai, après 96 h d'exposition. La CL50 et ses limites de confiance au seuil de 95 % sont obtenues par analyse statistique des pourcentages de mortalité obtenus à plusieurs concentrations d'essai, après une période fixe d'exposition.

contrôle, Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer sur les résultats d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité en milieu aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais ne doit pas renfermer de la substance à l'étude. Le contrôle sert à établir l'absence de toxicité mesurable des conditions de base de l'essai, telles que la température, la qualité de l'eau de dilution, l'état de santé des organismes d'essai ou les effets dus à leur manipulation.

DBO, La demande biologique d'oxygène, c'est-à-dire la quantité d'oxygène consommé lors de la biodégradation de la matière organique dans un volume d'eau (voir APHA *et al.*, 2005).

dureté, Concentration des cations dans l'eau qui réagissent avec un savon de soude pour précipiter en un résidu insoluble. Dans la présente méthode, la dureté est une mesure de la concentration des ions calcium (Ca^{++}) et magnésium (Mg^{++}) dans l'eau, exprimée en milligrammes de carbonate de calcium (CaCO_3) par litre [voir APHA *et al.*, 2005].

eau de contrôle/de dilution, Eau utilisée pour diluer l'échantillon d'effluent et pour l'essai de contrôle.

eau usée, Mélange de liquides résiduaux principalement constitué d'eaux usées domestiques, qui peut également comprendre d'autres déchets liquides provenant d'établissements industriels, commerciaux et publics.

effluent, Tout déchet liquide (par exemple industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique. Voir la définition d'*effluent d'eau usée*, pour cette catégorie particulière d'effluent.

effluent d'eau usée, Eau usée brute ou traitée, évacuée par l'émissaire ou les émissaires d'un réseau d'assainissement, à l'exclusion des déversoirs d'eau excédentaire de ce réseau.

essai avec stabilisation du pH, Essai effectué selon la méthode SPE 1/RM/13, au cours duquel on applique une technique de stabilisation du pH à un échantillon d'effluent d'eau usée.

léthal, Causant directement la mort.

méthode de référence, Méthode d'essai biologique spécifique pour réaliser un essai de toxicité, c'est-à-dire comportant un ensemble d'instructions et de conditions explicitées dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes publiées par Environnement Canada, la *méthode de référence* n'est fréquemment utilisée que pour répondre aux besoins d'un règlement particulier, c'est-à-dire pour vérifier si les dispositions générales de la *Loi canadienne sur les pêches* ont été enfreintes.

pH, Logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène, en équivalents grammes par litre. Il exprime le degré d'intensité des réactions acides et alcalines sur une échelle de 0 à 14, où 7 représente la neutralité, les nombres inférieurs à 7 une acidité croissante, et les nombres supérieurs à 7 une basicité ou alcalinité croissante.

pH initial, pH mesuré à 15 ± 1 °C, sur un échantillon composite à 100 %, avant toute aération de la solution expérimentale au laboratoire.

poisson mort, Poisson chez qui tous les signes visibles de mouvement ou d'autre activité ont cessé (voir le § 4.5 de la méthode SPE 1/RM/13).

pouvoir tampon, Capacité de l'eau de maintenir la stabilité du pH, grâce à la quantité d'ions carbonate (alcalinité) présents dans l'eau.

réseau d'assainissement, Tout ouvrage ou partie d'ouvrage servant à la collecte ou au traitement et à l'évacuation des eaux usées.

statique, Se dit de l'essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.
(Syn. ESSAI SANS RENOUVELLEMENT)

sublétales, Nocif pour les poissons, mais à une concentration moindre que celle qui les tue directement pendant les 96 h de l'essai.

toxicité, Potentiel ou capacité propre d'une substance de provoquer un ou des effets nocifs chez les poissons. L'effet ou les effets peuvent être létaux ou sublétaux.

Remerciements

Le présent document a été rédigé par Lesley Novak et Keith Holtze (Stantec Consulting Ltd., Guelph, Ont.). En tant que responsable scientifique du projet, Rick Scroggins (chef de la Division des méthodes biologiques, Environnement Canada, Ottawa) lui a imprimé une orientation stratégique, en formulant des observations détaillées et en accordant son aide technique tout au long de sa réalisation. Lisa Taylor (gestionnaire de la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa) y est allée de ses conseils techniques et de ses observations. Nous voudrions remercier Graham van Aggelen et Grant Schroeder (Environnement Canada, Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon, North Vancouver (C.-B.)), Julie Schroeder et Richard Chong-Kit (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Toronto) ainsi que Garth Elliott et Nancy Kruper (Environnement Canada, Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord, Edmonton) d'avoir fourni les modes opératoires normalisés des procédures de stabilisation du pH ainsi que des conseils techniques et des observations sur les versions antérieures. Merci également à Ken Doe et à Paula Jackman (Environnement Canada, Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique, Moncton) ainsi qu'à Brian Walker et à Manon Harwood (Environnement Canada, Laboratoire des essais environnementaux du Québec, Montréal) pour leur apport technique et leurs commentaires. Tous les laboratoires susmentionnés ont aussi participé à la validation des trois techniques de stabilisation du pH pour leur application aux effluents d'eau usée.

Introduction

En 1990, Environnement Canada a publié une méthode d'essai biologique pour la réalisation d'essais de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel : *Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel* (SPE 1/RM/13) [EC, 2000]. La méthode (révisée en 2007) a été élaborée expressément pour déterminer la létalité aiguë d'un effluent ; un peu partout au Canada les administrations fédérale, provinciales et territoriales l'ont employée à la surveillance et le contrôle des effluents industriels et des *effluents d'eau usée*.

L'essai se déroule à 15 ± 1 °C pendant 96 h en conditions *statiques* (c'est-à-dire sans renouvellement de la solution d'essai). Il *peut* porter uniquement sur une eau usée non diluée (à 100 %) ou sur des concentrations multiples (par exemple 100 %, 50 %, etc.) pour déterminer la *CL50* (concentration d'échantillon d'eau usée que l'on estime être *létale*, au bout d'une période définie, pour 50 % des animaux qui y sont exposés,). En vertu de la plupart des règlements provinciaux et fédéraux en vigueur, un échantillon est considéré comme « échouant » à l'essai de létalité aiguë si on observe, chez la truite arc-en-ciel, un taux de mortalité supérieur à 50 % dans l'eau usée non diluée.

La méthode d'essai exige l'aération du *contrôle* et des solutions d'essai au débit de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L. Ce débit est suffisant pour maintenir la concentration d'oxygène dissous dans le contrôle à 70 à 100 % de la saturation en oxygène. Cependant, on maintient le débit d'aération au minimum, parce qu'une aération excessive de l'eau usée risque d'accélérer la variation du *pH* et l'élimination des composés volatils (ESG, 2002).

L'aération des eaux usées pendant un essai de létalité aiguë *peut* élever le pH, du fait de

l'équilibrage de la pression partielle du dioxyde de carbone (CO₂) dans l'eau usée avec celle du même gaz dans l'atmosphère. La perte de CO₂ à cause de l'aération modifie le pouvoir tampon carbonaté de l'effluent, ce qui conduit à une élévation du pH. Dans beaucoup d'échantillons d'effluent d'eau usée, la teneur en CO₂ peut être artificiellement élevée du fait d'une forte activité biologique ou du fait de l'acidification de l'eau usée avant son rejet (Mount et Mount, 1992). Toute modification du pH de l'eau usée pendant l'essai de létalité aiguë risque de modifier le taux de mortalité si la *toxicité* de la substance dépend du pH.

L'*ammoniac*, qui pourrait être préoccupant dans un effluent d'eau usée, serait un exemple de toxique dépendant du pH. La toxicité de l'ammoniac est attribuable à la forme libre ou non ionisée (NH₃) par opposition à la forme ionisée. La concentration relative d'ammoniac non ionisé augmente avec le pH et la température de l'eau. Selon le pH initial de l'eau usée non diluée et l'intensité de l'augmentation du pH pendant l'essai, les concentrations d'ammoniac non ionisé qui étaient inférieures aux concentrations létales au début de l'essai pourraient augmenter suffisamment pendant ce dernier pour provoquer une mortalité des truites arc-en-ciel avant la fin de l'essai.

Pour parer à l'éventualité de la toxicité de l'ammoniac résiduel dans un effluent d'eau usée en raison de l'augmentation du pH, Environnement Canada a normalisé trois techniques de stabilisation du pH applicables à l'essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel. Ces techniques sont complémentaires à la méthode d'essai SPE 1/RM/13. Cependant, on peut effectuer un *essai avec stabilisation du pH* uniquement si on respecte trois conditions énoncées dans les § 1.1, 1.2 et 1.3.

On trouvera des renseignements de base à l'appui de l'emploi de ces techniques de stabilisation du pH dans le document intitulé *Renseignements de base et conseils supplémentaires pour l'étude de la létalité aiguë d'un effluent d'eau usée pour la truite arc-en-ciel* (EC, 2008).

1.1 Première condition — dosage de l'ammoniac total

Dans tous les échantillons d'effluent d'eau usée soumis à un essai de toxicité par la méthode SPE 1/RM/13, il faut doser l'ammoniac total (en milligrammes/litre). On peut ainsi déterminer si la stabilisation du pH convient aux échantillons ultérieurs. Cette concentration d'ammoniac total sert au calcul de la teneur en ammoniac non ionisé au pH initial (pH_i)¹ de l'effluent à 15 °C (cf. la condition 3, § 1.3).

1.2 2^e condition — échec de la méthode de référence SPE 1/RM/13 sur la létalité aiguë

Les techniques décrites dans le présent document pour la stabilisation du pH de l'effluent d'eau usée doivent uniquement être utilisées lorsqu'il a été montré qu'un échantillon antérieur d'effluent d'eau usée de la même source a échoué à l'essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel (SPE 1/RM/13 ; c'est-à-dire que le taux de mortalité des truites a excédé 50 %) ².

1. La méthode SPE 1/RM/13 exige déjà la mesure du pH initial de l'effluent d'eau usée à 15 °C.
2. Si l'échantillon n'a pas présenté de létalité aiguë selon la méthode de référence normalisée, nul besoin d'utiliser une procédure complémentaire de stabilisation du pH. Dans le cas contraire, on peut utiliser la concentration dosée de l'ammoniac (en application de la première condition, § 1.1) et la valeur du pH pendant l'essai auquel l'échantillon a échoué pour déterminer si la cause probable de la mortalité des truites est l'ammoniac non ionisé.

1.3 3^e condition — Concentration maximale d'ammoniac

Les procédures décrites dans le présent document ne peuvent être utilisées que lorsque la concentration d'ammoniac non ionisé présent dans l'échantillon d'effluent usé non dilué est inférieure à 1,25 mg/L à 15 °C ou que la concentration d'ammoniac total est inférieure au maximum (y), en milligrammes/litre, déterminé à l'aide de la formule ci-dessous et du pH initial de l'échantillon à 15 °C :

$$y = 1,25 \times (10^{(9,564\ 136\ 638 - \text{pH})} + 1)$$

On a fixé ces concentrations maximales de l'ammoniac pour dépister les eaux usées qui feraient mourir les truites arc-en-ciel, peu importe la dérive du pH observée pendant l'essai de létalité aiguë. Autrement dit, les techniques de stabilisation du pH ne conviennent pas si la concentration d'ammoniac est déjà suffisamment élevée pour provoquer une mortalité chez la truite arc-en-ciel au début de l'essai de létalité aiguë. Si l'ammoniac non ionisé excède ce maximum, il est évident que, en raison de la piètre qualité de l'effluent d'eau usée, il est inutile de prendre en considération le phénomène de dérive du pH (c'est-à-dire que l'ammoniac se trouve déjà à une concentration létale aiguë avant le début de l'essai). Pour de plus amples renseignements et un exposé du fondement logique, prière de consulter Environnement Canada (2008).

Comme l'« ammoniac total » = $\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$, il faut calculer la concentration d'ammoniac non ionisé, en milligrammes/litre, à l'aide de la formule suivante (USEPA, 1999) :

$$\text{Ammoniac non ionisé} = (\text{ammoniac total}) \times [1/(1 + 10^{\text{pK} - \text{pH}})]$$

Où :

pK = 9,56 à 15 °C ;

pH est le pH initial de l'effluent d'eau usée à 15 °C ; et

la concentration d'ammoniac total est exprimée en milligrammes/litre, telle qu'elle a été mesurée pour satisfaire à la première condition, § 1.1.

1.4 Survol des techniques de stabilisation du pH

Pendant l'essai de létalité aiguë d'échantillons d'effluent d'eau usée employant la truite arc-en-ciel, on peut utiliser trois techniques de stabilisation du pH, lorsque l'on satisfait à leurs conditions d'emploi. Ces techniques sont les suivantes :

- (1) la technique d'injection de CO₂ ;
- (2) la technique de recyclage ou recirculation ;
- (3) la technique du pH-mètre régulateur.

Peu importe la technique choisie, l'application d'une procédure de stabilisation du pH à un

essai de létalité aiguë employant la truite arc-en-ciel exige une formation pratique préalable à l'essai sur un échantillon réel d'effluent d'eau usée. Il faudra probablement effectuer des expériences avec chaque échantillon, puisque la chimie particulière de l'eau variera d'un *réseau d'assainissement* à l'autre ou même à l'intérieur d'un réseau donné.

Pendant la réalisation des essais, il faut respecter, outre les exigences expérimentales particulières des techniques de stabilisation du pH, toutes les procédures et exigences méthodologiques de la méthode SPE 1/RM/13. La raison d'être de chaque technique est de remplacer le CO₂ perdu pendant l'aération en cours d'essai afin de maintenir le pH de l'échantillon à sa valeur initiale (*pH_i*). Les techniques ne visent pas à ajouter plus de CO₂ qu'il ne s'en trouve déjà dans l'effluent d'eau usée. La section 2 renferme une description détaillée de chacune de ces techniques.

Options pour la stabilisation du pH d'effluents d'eau usée

Dans la présente section, on expose en détail chaque technique de stabilisation du pH d'un effluent d'eau usée :

- (1) la technique d'injection de CO₂ ;
- (2) la technique de recyclage ou recirculation ;
- (3) la technique du pH-mètre régulateur.

Dans l'essai de stabilisation du pH, on maintient le pH de l'échantillon à la valeur mesurée au début de l'essai (pH_i) au moyen de l'une des trois techniques exposées ci-dessous. La procédure de stabilisation du pH n'annule pas et ne remplace pas la méthode d'essai de létalité aiguë en vigueur qui emploie la truite arc-en-ciel (EC, 2000), mais elle décrit des techniques « complémentaires ». Tous les essais doivent se conformer aux exigences et aux modes opératoires exposés dans la méthode SPE 1/RM/13. Cependant, l'emploi de ces techniques de stabilisation exige une surveillance et des rapports supplémentaires (respectivement le § 2.1 et la section 3).

2.1 Exigences générales

Les procédures de stabilisation du pH s'appliquent pendant les essais découlant de la méthode SPE 1/RM/13 [section 5 — essai à concentration unique ; section 6 — essai à concentrations multiples (CL50)]. Dans les deux cas, la concentration maximale analysée est celle de l'effluent d'eau usée non dilué.

Avant la réalisation des essais à des fins réglementaires, certaines études préliminaires peuvent être nécessaires sur chaque échantillon d'eau usée, puisque les caractéristiques chimiques de ce dernier peuvent varier d'une installation à l'autre (ou même à l'intérieur

d'une même installation). Par exemple, les échantillons d'eau usée ou d'*eau de contrôle /de dilution* de faible *alcalinité* ou de faible *dureté* sont susceptibles d'importantes dérives du pH en raison de leur *pouvoir tampon* minimal et, par conséquent, ils exigent moins de CO₂. Les données obtenues au cours de la mise au point de la technique d'injection de CO₂ et de la technique du pH-mètre régulateur ont montré que les deux pouvaient donner de bons résultats avec des échantillons d'effluent d'eau usée sans baisse significative du pH. On peut éviter les difficultés posées par les eaux de contrôle/de dilution ayant un faible pouvoir tampon en injectant dans chacune des solutions d'essai et dans le contrôle uniquement la quantité de CO₂ suffisante pour maintenir le pH stable. On s'assure ainsi qu'un contrôle à faible pouvoir tampon recevra probablement moins de CO₂ que la solution d'eau usée d'essai possédant un pouvoir tampon plus grand. On réduit ainsi la probabilité de surmortalité chez les organismes de contrôle par suite de l'ajout d'une quantité excessive de CO₂, tout en atteignant l'objectif de la stabilisation du pH, qui est de maintenir le pH de l'échantillon à sa valeur initiale.

Si on applique les techniques d'injection de CO₂ ou du pH-mètre régulateur, les essais *devraient* se dérouler dans des aquariums de verre ou dans des récipients en matériaux non toxiques (par ex. polyéthylène, polypropylène). Avec la technique de recyclage, il est recommandé d'employer des aquariums de verre, en raison de la nécessité d'employer des couvercles spécialement adaptés, dont on a besoin pour maîtriser l'espace de tête au-dessus de la solution d'essai.

Durant l'essai, il faut, pour l'aération de toutes les solutions, utiliser de l'air comprimé du laboratoire exempt d'huile, au débit régulé de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L. Il faut préparer toutes les

solutions pour les essais avant le début de l'aération. Les solutions d'essai étant prêtes, il faut les aérer toutes pendant 30 min. au débit de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L. Il faut commencer à stabiliser le pH quand l'aération débute. Après 30 min. d'aération, il faut doser l'oxygène dissous dans au moins la solution la plus concentrée (normalement l'effluent à 100 %). Si (et seulement si) le taux d'oxygène dans la solution la plus concentrée représente moins de 70 % ou plus de 100 % de saturation de l'air, il faut poursuivre l'aération (c'est-à-dire avant l'exposition du poisson) de toutes les solutions, y compris du ou des contrôles, au débit de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L. Cette période d'aération doit se terminer à la survenue de la première de l'une des éventualités suivantes : après 90 min. d'aération ou à l'atteinte de 70 % de saturation dans la solution d'essai la plus concentrée (ou de 100 %, si la sursaturation est manifeste). Immédiatement après, il faut répartir les poissons au hasard dans chaque solution d'essai, et il faut faire débiter l'essai, qu'un taux de 70 à 100 % de saturation ait été atteint ou non dans toutes les solutions d'essai.

Environnement Canada (2000) exige un diffuseur propre pour le bullage de l'air comprimé. Pour la technique d'injection de CO₂, il faut des diffuseurs pour injecter le mélange de CO₂. Pour la technique de recyclage et celle qui utilise un pH-mètre régulateur, il faut utiliser des diffuseurs pour l'air de laboratoire. Pour la technique employant le pH-mètre régulateur, on recommande fortement l'emploi d'une pipette de verre pour la fourniture du CO₂ gazeux. L'emploi d'une pipette de verre assure une meilleure maîtrise de la quantité de CO₂ fourni à l'échantillon lorsque l'on met en marche le pH-mètre régulateur.

Les résultats expérimentaux peuvent être confus ou difficiles à interpréter dans les cas où il existe une différence de pH (> 0,2 unité de pH) entre l'échantillon d'effluent d'eau usée à 100 % et l'eau de dilution du laboratoire utilisé pour la préparation des solutions filles pour un essai à concentrations multiples. Il faut

maintenir le pH de chaque concentration d'effluent (c'est-à-dire à 100, 50, 25, 12,5, 6,25 %) à la valeur mesurée au début de l'essai (préalablement à toute aération) à chaque concentration d'exposition et dans le contrôle. Toutefois, un gradient des valeurs observées du pH pendant l'essai pourrait entraîner une réponse sans rapport avec la dose. Dans ce cas (c'est-à-dire lorsque l'on observe une mortalité dans les dilutions de l'effluent, mais non dans l'effluent à 100 %), on ne devrait pas calculer de CL50. Les résultats correspondant à l'échantillon d'effluent d'eau usée à 100 % continueront d'être considérés comme acceptables, à la condition de satisfaire à tous les autres critères de validité (voir § 2.1.3).

2.1.1 Observations et mesures

Outre les observations et les mesures décrites dans la méthode SPE 1/RM/13 (par ex. la température, l'oxygène dissous, la couleur, la turbidité, l'odeur ainsi que les matières flottantes ou les matières décantables), le laboratoire doit mesurer le pH, la teneur en ammoniac total et la dureté de chaque échantillon d'effluent d'eau usée. Il faut doser l'ammoniac total avec une précision d'au moins deux décimales. Il faut mesurer l'alcalinité si l'on doit utiliser la technique d'injection de CO₂. On ne doit effectuer les mesures qu'après avoir mélangé à fond le contenu de tous les récipients et avoir ajusté la température à 15 ± 1 °C. Il faut mesurer ces variables dans l'échantillon non dilué après combinaison des sous-échantillons (par exemple aliquotes d'un échantillon réparties entre au moins deux récipients). Dans l'essai à concentrations multiples (CL50), il faut mesurer le pH, la teneur en ammoniac et la dureté de chaque solution d'essai ; avec la technique d'injection de CO₂, il faut mesurer l'alcalinité dans l'échantillon d'effluent d'eau usée à 100 %.

Avant d'aérer les solutions d'essai, il faut calculer la concentration d'ammoniac non ionisé à partir du résultat du dosage de l'ammoniac total et du pH initial (pH_i) de l'échantillon, la température de 15 °C et du pH initial (pH_i = pH

mesuré dans l'échantillon composé à 100 %, à 15 °C, avant toute aération des solutions d'essai). Il ne faut pas utiliser de technique de stabilisation du pH si la concentration d'ammoniac non ionisé dans un échantillon d'eau usée égale ou dépasse 1,25 mg/L.

Il faut mesurer et consigner le pH au début de l'essai (lors du transfert des poissons dans l'effluent d'eau usée et dans le contrôle) ainsi qu'à la fréquence exigée par chaque mode opératoire, à toutes les concentrations et dans le contrôle (§ 2.2.4, 2.3.2, 2.4.3). En outre, on peut devoir surveiller le pH pendant les 8 premières heures de l'essai lorsque l'on utilise la procédure de stabilisation du pH. Pendant le reste de l'essai, il faut mesurer le pH à toutes les 24 h (au moins) pour faire le suivi des variations du pH et s'assurer que ce dernier respecte les critères de validité de l'essai (§ 2.1.3). Une surveillance plus fréquente (par exemple deux fois par jour) peut être nécessaire si l'échantillon d'effluent d'eau usée possède un faible pouvoir tampon (faible alcalinité), ce qui peut entraîner des variations rapides du pH.

2.1.2 Échantillons d'eau usée chlorée

Le laboratoire devrait doser le chlore résiduel total (C.R.T.) de chaque échantillon d'effluent d'eau usée qu'il a reçu (c'est-à-dire en même temps que l'ammoniac). Ce dosage est obligatoire si le poisson manifeste du stress ou un comportement atypique au début de l'essai. Si l'échantillon renferme du chlore (C.R.T. > 0,1 mg/L), on ne devrait pas employer de procédures de stabilisation du pH, puisqu'il y aura mortalité de truites, que celles-ci se montreront stressées ou qu'elles présenteront un comportement atypique, indépendamment de la dérive du pH. Le laboratoire d'essais devrait contacter la station de traitement des eaux usées pour en revoir les opérations (c'est-à-dire pour déterminer si l'eau usée est chlorée, puis déchlorée avant son rejet) et obtenir des données sur les antécédents de l'eau usée (c'est-à-dire pour déterminer les concentrations typiques de chlore total dans le rejet final), parce que la stabilisation du pH serait inutile si la teneur en

chlore total dans les échantillons d'effluent d'eau usée était létale. On trouvera dans Environnement Canada (2008) des renseignements supplémentaires sur la marche à suivre pour éliminer le chlore des échantillons d'effluent d'eau usée à des fins d'étude.

2.1.3 Critères de validité de l'essai

L'essai n'est pas considéré comme valide si l'une des éventualités suivantes se présente :

- (1) le pH moyen de la solution d'essai de l'effluent d'eau usée à 100 % dont on a stabilisé le pH s'écarte de $\pm 0,2$ unité par rapport au pH initial ;
- (2) le pH instantané dans la solution d'essai de l'effluent d'eau usée à 100 % dont on a stabilisé le pH s'écarte de $\pm 0,3$ unité par rapport au pH initial ;
- (3) plus de 10 % des poissons (données combinées si on utilise des répétitions) dans le contrôle dont on a stabilisé le pH meurent ou manifestent un comportement atypique ou stressé.

Dans le cas d'un essai à concentrations multiples, le calcul de la CL50 ne doit pas tenir compte des concentrations d'exposition n'ayant pas satisfait aux critères relatifs au pH³.

2.2 Stabilisation du pH par injection de CO₂

Dans la technique de stabilisation du pH par injection de CO₂, on neutralise l'augmentation du pH par aération des solutions d'essai d'eau usée (y compris du contrôle) à l'aide d'un mélange constitué de 15 % de CO₂, de 21 % d'oxygène (O₂) et de 64 % d'azote (N₂) [dit

3. Si la série de concentrations utilisée pour l'essai visant à estimer la CL50 est de 100, 50, 25, 12,5 et 6,25 % (plus un contrôle) et que le pH moyen dans la solution à 12,5 % n'est pas maintenu à l'intérieur de $\pm 0,2$ unité de pH par rapport à sa valeur initiale, il ne faut pas tenir compte des résultats de la mortalité observée à cette concentration dans le calcul de la CL50.

mélange de CO₂] mélangé avec de l'air du laboratoire fourni par une autre source.

Outre l'équipement et les installations ordinaires exigés pour la réalisation de la méthode SPE 1/RM/13, cette technique exige le matériel et l'équipement ci-dessous :

- bouteille certifiée de gaz comprimé contenant un mélange de 15 % de CO₂, de 21 % d'O₂ et de 64 % de N₂, avec raccord de sortie CGA 590, d'un fournisseur homologué de gaz comprimés (par exemple Praxair, Air Liquide, BOC Gases) ;
- détendeur CGA 590 en laiton chromé, à double détente (par exemple Concoa, Fisherbrand, Restek, Cole-Parmer, VWR) ;
- six débitmètres de 150 mm à vannes réglables (plage approximative de mesure de 0 à 137 mL/min.) [par exemple Cole Parmer, Gilmont, Scienceware]⁴ ;
- six débitmètres de 150 mm à vannes réglables (plage approximative de mesure de 0 à 300 mL/min.) [par exemple Cole Parmer, Gilmont, Scienceware]⁴ ;
- raccords mâles en plastique 1/8 sur 3/16 po (0,32 sur 0,48 cm) ou l'équivalent pour relier débitmètres et tubes de plastique ;
- tubes d'air flexibles en plastique ;
- tuyaux en Tygon® (R-3606) ou l'équivalent ;
- raccords tronconiques en Y, en plastique, pour les tubes d'air (par exemple VWR, Fisherbrand) ;
- raccords assortis de plastique ;
- clavatures de vannes à deux et à quatre voies (par exemple Cole Parmer).

Des schémas et des photos des montages employés pour la technique d'injection de CO₂ sont montrés dans les figures 1 à 5.

2.2.1 *Appareillage pour la fourniture du mélange de CO₂*

Le CO₂ est débité dans le récipient d'essai par une bouteille de gaz comprimé constitué d'un mélange de 15 % de CO₂, de 21 %, d'O₂, de 64 % de N₂, via un détendeur, un tube d'air flexible en Tygon® puis une clavature de vannes à quatre voies, un débitmètre, le mélange étant ensuite combiné à l'air normal du laboratoire par l'entremise d'un raccord de plastique en Y, puis alimentant les solutions d'essai au moyen d'un diffuseur. L'air normal du laboratoire est fourni via un tube d'air flexible en Tygon® R-3603, traverse un débitmètre et se combine à la veine du mélange de CO₂ au moyen du raccord en Y susmentionné (fig. 1 et 3).

On devrait bien arrimer la bouteille du mélange de CO₂ à proximité des enceintes expérimentales en l'enchaînant à un mur ou à une autre structure solide. Ne jamais utiliser d'huile ni de graisse sur le détendeur ou les raccords de la bouteille, ce qui pourrait contaminer le mélange de gaz purs ou créer un risque d'incendie.

2.2.2 *Estimation du pourcentage de mélange de CO₂ dont on a besoin pour stabiliser le pH*

On estime le pourcentage initial du mélange de CO₂ dont on a besoin pour stabiliser le pH en mesurant le pH initial (pH_i) et l'alcalinité de la solution d'essai à 100 %. Dans un essai à concentrations multiples (CL50), on procède comme suit pour déterminer le pourcentage du mélange de CO₂ au début de l'essai : (i) il faut mesurer le pH initial (pH_i) de chaque concentration ; (ii) il faut mesurer l'alcalinité de l'effluent d'eau usée à 100 %. On peut estimer l'alcalinité dans les solutions diluées restantes, d'après les valeurs connues de l'alcalinité de l'eau de contrôle/de dilution et de l'effluent d'eau usée à 100 %.

4. Il faudra des débitmètres supplémentaires si on utilise plus que le nombre minimal de concentrations (0, 6,25, 12,5, 25, 50 et 100 %).

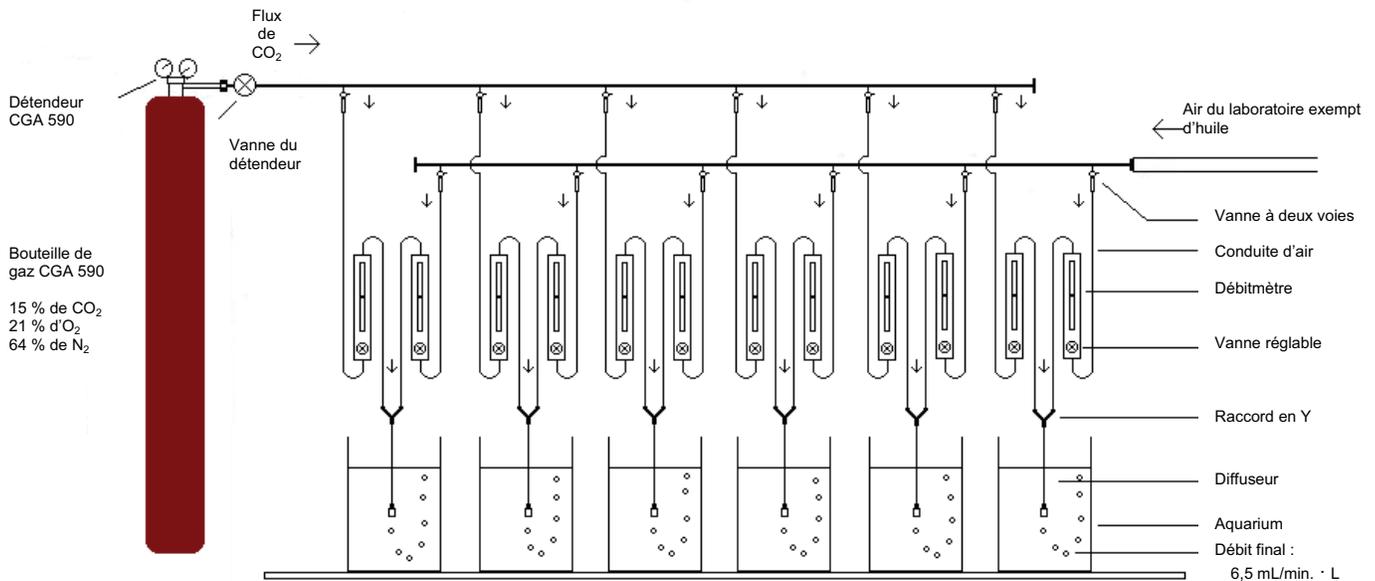


Figure 1. — Schéma du montage nécessaire à un essai à six concentrations employant la technique d'injection de CO₂.

Deux débitmètres sont affectés à chaque concentration. L'un mesure le débit du mélange de CO₂, l'autre le débit de l'air du laboratoire. Un débitmètre mesure un débit maximal de 300 mL/min., l'autre un débit maximal de 137 mL/min. Cela permet une fourchette de 0,5 à 15 % de CO₂ pour des volumes d'échantillon de 20 à 40 L. le pourcentage final de CO₂ détermine quel débitmètre régule les débits de CO₂ et de l'air du laboratoire. Se reporter au paragraphe sur la technique d'injection de CO₂ pour connaître la façon de déterminer le pourcentage final de CO₂. Le débit final alimentant un aquarium doit être de 6,5 mL/min. · L (c'est-à-dire que, pour 20 L d'échantillon, le débit final sortant des deux débitmètres doit totaliser 130 mL/min.).

Débitmètre d'une capacité maximale de 137 mL/min. (un par concentration)



Figure 2. — Vue de face du tableau de contrôle et des débitmètres pour l'application de la technique d'injection de CO₂.

À chaque concentration correspondent deux débitmètres, dont les plages de mesure sont respectivement de 137 et de 300 mL/min. Le pourcentage requis de CO₂ détermine lequel régule le débit du mélange de CO₂ ou celui de l'air du laboratoire.

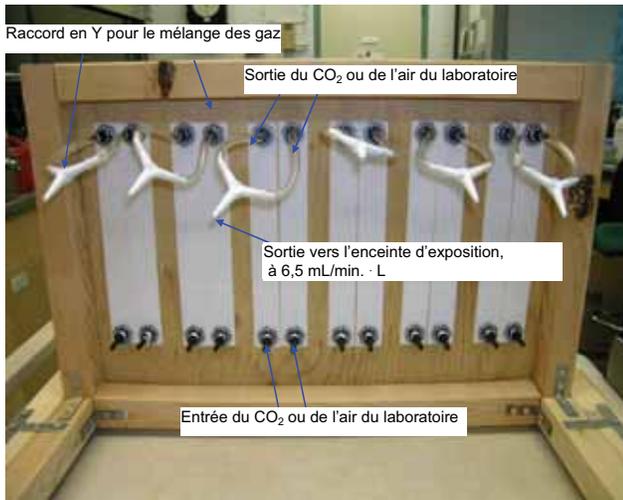


Figure 3. — Vue de derrière du tableau de contrôle pour l'application de la technique d'injection de CO₂ montrant les liaisons



Figure 4. — Aquariums de verre employés pour la technique d'injection de CO₂

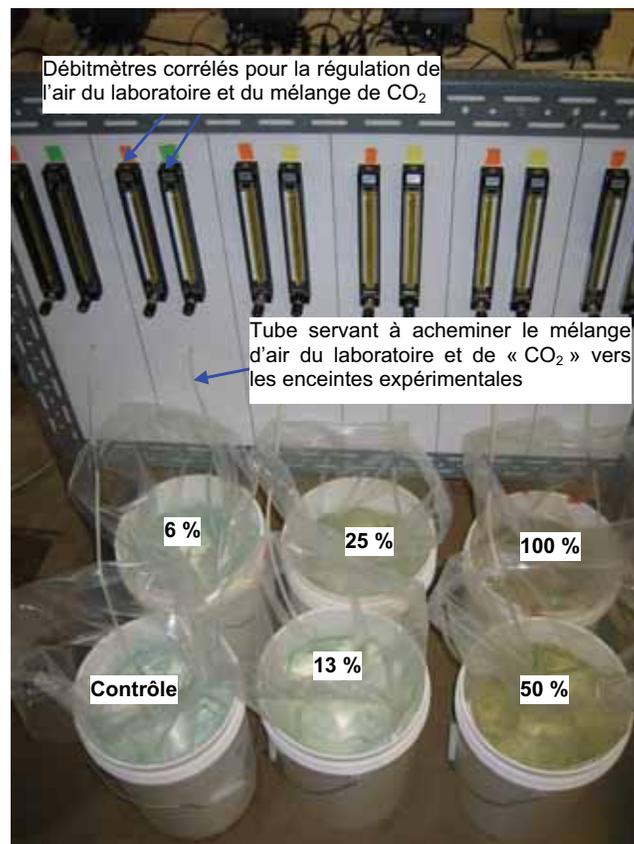


Figure 5. — Seaux de plastique employés pour la technique d'injection de CO₂

Tableau 1. — Table d'étalonnage du CO₂ permettant d'estimer le taux de CO₂ requis pour maintenir le pH, en fonction du pH et de l'alcalinité de la solution d'essai^a

Pourcentage de CO ₂ (%)	Alcalinité (mg/L de CaCO ₃)					
	100	200	300	400	500	600
	pH					
0,5	7,68	7,91	8,05	8,15	8,22	8,29
1	7,11	7,31	7,52	7,73	7,93	8,14
2	6,97	7,17	7,38	7,58	7,78	7,98
3	6,89	7,10	7,31	7,52	7,73	7,94
4	6,80	6,92	7,15	7,38	7,61	7,84
5	6,76	6,89	7,10	7,27	7,44	7,61
6	6,68	6,85	7,03	7,20	7,37	7,55
7	6,56	6,81	7,01	7,15	7,30	7,48
8	6,54	6,78	6,94	7,09	7,25	7,41
9	6,48	6,66	6,84	7,02	7,20	7,38
10	6,39	6,56	6,73	6,91	7,08	7,26
15	6,23	6,41	6,60	6,78	6,96	7,14

^a Tous les pourcentages de CO₂ se fondent sur les régressions linéaires des résultats d'essais effectués sur des volumes de 20 litres d'eau synthétique préparés de la façon décrite par l'USEPA (2002) ; le pourcentage de CO₂ effectivement requis pour obtenir tel pH à telle alcalinité peut différer.

Une fois le pH initial et l'alcalinité déterminés, on consulte la table d'étalonnage du CO₂ (tableau 1) pour estimer le pourcentage de CO₂ à appliquer à un pH initial et à une alcalinité donnés pour réguler le pH. Par exemple, une solution d'essai d'une alcalinité de 300 mg/L, en carbonate de calcium (CaCO₃), dont le pH initial est 7,1, exigera un apport final de 5 % de CO₂ pour maintenir le pH à sa valeur initiale. La table d'étalonnage du CO₂ sert uniquement à des fins d'estimation et d'approximation.

Il faudra corriger le pourcentage de CO₂ si le pH présente une tendance à la hausse ou à la baisse après le début de l'aération avec le mélange de CO₂. Par exemple, il faudrait augmenter le pourcentage du mélange de CO₂ si le pH présente une tendance à la hausse ou l'abaisser dans le cas contraire.

Le pourcentage de mélange de CO₂ exigé pour stabiliser le pH dépend des caractéristiques chimiques (c'est-à-dire de l'alcalinité ou du pouvoir tampon) de la solution d'essai. Par exemple, les échantillons d'effluent d'eau usée possédant un faible pouvoir tampon ont besoin de moins de CO₂ pour stabiliser le pH que les échantillons au pouvoir tampon élevé.

2.2.3 Réglages des débits du mélange de CO₂ et de l'air du laboratoire

Pour un essai à concentrations multiples (CL50) [5 concentrations d'essai plus contrôle], on aura besoin de six débitmètres dans la plage de 0 à 137 mL/min. et de six débitmètres dans la plage de 0 à 300 mL/min. Les vannes de tous les débitmètres sont réglables. Chaque

concentration d'essai et chaque contrôle possède un débitmètre de chaque type : un pour réguler le débit du mélange de CO₂, l'autre pour réguler le débit de l'air du laboratoire.

Après avoir déterminé le pourcentage nécessaire de CO₂ (tableau 1), on peut ajuster le débit du mélange de CO₂ et de l'air du laboratoire pour obtenir le pourcentage requis de CO₂ au moyen des vannes ajustables des débitmètres. Le volume de la solution d'essai et le pourcentage final requis de CO₂ déterminent lequel des débitmètres servira à réguler soit le débit du mélange de CO₂, soit celui de l'air du laboratoire.

Les équations suivantes servent à déterminer les débits du mélange de CO₂ et d'air du laboratoire ⁵

(1) Débit combiné acheminé vers l'enceinte expérimentale (ml/min.) =

6,5 mL/min. · L × volume de l'enceinte (L)

(2) Débit du mélange de CO₂ =

$$\frac{\% \text{ de CO}_2 \text{ (d'après le tableau 1)}}{\% \text{ de CO}_2 \text{ dans le mélange (c'est-à-dire 15 \%)}} \times \text{Débit combiné acheminé vers l'enceinte expérimentale (1)}$$

5. Par exemple, pour obtenir un débit final de 10 % de mélange de CO₂ dans un volume d'exposition de 20 L, on fixe le débit du mélange de 15 % de CO₂, de 21 % d'O₂ et de 64 % de N₂ à 86,7 mL/min. et celui de l'air du laboratoire à 43,3 mL/min. pour un débit total de 130 mL/min. (6,5 ± 1 mL/min. · L). Comme, en général, les débitmètres dont la plage va de 0 à 137 mL/min. permettent des réglages plus fins, leur emploi pour régler le débit du mélange de CO₂, dans cet exemple, permet une maîtrise plus précise du pH. Dans un autre exemple, pour obtenir un débit final de 10 % de mélange de CO₂ dans un volume d'exposition de 40 L, on fixe le débit du mélange de 15 % de CO₂, de 21 % d'O₂ et de 64 % de N₂ à 173,3 mL/min. et celui de l'air du laboratoire à 86,7 mL/min., soit, en tout, 260 mL/min. (6,5 ± 1 mL/min. · L). Dans ce cas, le débitmètre dont la plage va de 0 à 137 mL/min. sert au réglage du débit de l'air du laboratoire et le débitmètre dont la plage va de 0 à 300 mL/min. au réglage du débit du CO₂.

(3) Débit de l'air du laboratoire =

$$\text{Débit combiné acheminé vers l'enceinte expérimentale (1)} - \text{Débit du mélange de CO}_2 \text{ (2)}$$

En tout temps pendant l'essai, on peut ajuster le débit de CO₂ pour assurer la maîtrise du pH.

2.2.4 Maîtrise de la dérive du pH

La stabilisation du pH commence dès le début de l'aération au débit de 6,5 ± 1 mL/min. · L (voir § 2.1). Les débits d'aération (CO₂ et air du laboratoire) doivent totaliser 6,5 ± 1 mL/min. · L durant l'essai à toutes les concentrations d'exposition, y compris le contrôle (suivant la méthode SPE 1/RM/13). Par l'entremise d'un diffuseur, chaque enceinte expérimentale est aérée par un mélange d'air du laboratoire et de CO₂ au débit combiné de 6,5 ± 1 mL/min. · L dont le pourcentage de CO₂ permet de maintenir le pH moyen (à toutes les concentrations d'effluent, à l'exclusion du contrôle) dans l'intervalle de ± 0,2 unité de pH et le pH instantané dans l'intervalle de ± 0,3 unité de pH par rapport au pH initial ⁶.

Il faut mesurer fréquemment le pH et apporter les ajustements appropriés au débit du mélange de CO₂ pour stabiliser le pH, particulièrement pendant les trois premières heures de l'essai. Pour la plupart, les ajustements du débit du mélange de CO₂ ont lieu dans les quelques premières heures de l'aération. Dans les jours suivants, probablement moins de corrections seront nécessaires (une ou deux fois par jour).

Il faut mesurer et consigner le pH immédiatement avant l'aération (pH_i), à t = 0 h (début de l'essai, lors de l'introduction des poissons), puis à t = 0,5, 1, 2, 3, 24, 48, 72 et 96 h dans les enceintes de contrôle et les

6. Par exemple, un volume expérimental de 20 L est aéré au débit de 130 mL/min. Bien que la contribution de chaque débit (air normal du laboratoire et mélange de CO₂) au débit final puisse varier selon les nécessités de la maîtrise du pH dans chaque solution d'essai, le débit doit totaliser 6,5 ± 1 mL/min. · L.

enceintes renfermant les concentrations d'exposition. On disposera ainsi de données montrant le maintien du pH durant l'essai. Il faut également mesurer et consigner le pH toutes les fois que l'on ajuste le débit du CO₂, après quoi il faut mesurer le pH dans les 30 min. ou moins qui suivent, pour s'assurer du maintien du pH. On consigne le pH final avant la fin de la période d'essai de 96 h si, à une concentration expérimentale, toutes les truites meurent.

Si le pH de la solution d'essai commence à diminuer dans les 30 premières minutes du début de l'aération, on devrait diminuer le pourcentage de CO₂ par pas de 0,5 % jusqu'à ce que le pH se maintienne à $\pm 0,2$ unité de pH par rapport au pH initial. Si le pH de la solution d'essai commence à augmenter dans les 30 premières minutes du début de l'aération, on augmente le pourcentage de CO₂ par pas de 0,5 % jusqu'à ce que le pH se maintienne à $\pm 0,2$ unité de pH par rapport au pH initial. On poursuit les ajustements du pourcentage de CO₂ par pas de 0,5 % jusqu'à ce que le pH se maintienne à $\pm 0,2$ unité de pH par rapport au pH initial. Il faut consigner le pourcentage de CO₂ acheminé vers chaque enceinte expérimentale.

Dans les cas où l'eau de contrôle/de dilution possède un pouvoir tampon inférieur à celui de la solution d'essai de l'effluent d'eau usée, la quantité de CO₂ nécessaire au maintien du pH dans l'échantillon ne parviendrait probablement pas à le maintenir dans la fourchette de $\pm 0,2$ unité par rapport au pH initial de l'eau de contrôle/de dilution du laboratoire. Dans un essai à concentration unique avec stabilisation du pH, il n'est donc pas nécessaire d'ajouter la même quantité de CO₂ à l'échantillon d'effluent d'eau usée à 100 % et au contrôle, puisque cette procédure de stabilisation du pH vise à combattre la dérive du pH de l'échantillon en remplaçant le CO₂ perdu, du fait de l'aération, par la solution d'essai originelle pendant l'essai de létalité aiguë employant des truites arc-en-ciel.

Il faut inspecter la conduite d'aération au moins une fois par jour afin d'assurer un apport continu du mélange de CO₂ et d'air du laboratoire à toutes les solutions d'essai.

2.3 Stabilisation du pH par recyclage

Cette technique permet de combattre l'augmentation du pH par recyclage (recirculation) du CO₂ en système fermé (Elliott *et al.*, 2003). On fixe solidement un couvercle sur l'enceinte expérimentale, et l'air, qui renferme du CO₂, est recirculé dans l'espace de tête de l'enceinte au moyen d'une pompe à air, ce qui empêche la perte de CO₂ dans l'atmosphère ambiante et permet de maintenir le pH.

En sus des installations et de l'équipement ordinaires dont on a besoin pour appliquer la méthode SPE 1/RM/13, cette technique de stabilisation du pH requiert le matériel et l'équipement suivants :

- tubes de Tygon® (siphons et conduites d'air) ;
- pompes d'aération pour aquarium débitant $6,5 \pm 1$ mL/min. · L et compatible avec le couvercle (par exemple pompe Elite 799 & 800, de 115 V) ;
- pipettes à usage unique, de 10 mL ;
- couvercle permettant la recirculation [joints de néoprène, joints toriques et élastiques en place ; les couvercles sont fabriqués de manière à s'ajuster solidement aux enceintes expérimentales utilisées ; on peut les faire fabriquer et les acheter d'un transformateur de plastiques, par ex. Allwest Plastic Fabricators (www.allwestplastic.com), d'Edmonton] ;
- fiole conique de 250 mL, servant de piège à condensats pour empêcher ces derniers d'entrer dans les débitmètres ;
- enceintes expérimentales (aquariums ou autres récipients tels que seaux).

Dans les figures 6 et 7, on trouvera le schéma et la photo du dispositif expérimental employant la technique de recyclage.

2.3.1 Montage de la technique de recyclage

Pour réduire l'espace de tête de l'enceinte, on remplit cette dernière jusqu'au bord avec l'échantillon, sans y plonger la pompe. On pose ensuite le couvercle, sans le fixer solidement, sur le dessus de l'enceinte. Le premier tube (n° 1) d'air relie la pompe au piège à condensats (v. fig. 6), tandis que le deuxième tube d'air (n° 2) relie le piège à condensats au débitmètre. Le troisième tube d'air (n° 3) relie le débitmètre à un raccord se trouvant dans le couvercle de l'enceinte. Un quatrième tube d'air (n° 4) est fixé au bas du même raccord et le relie à un diffuseur plongé dans l'échantillon. Un siphon est également fixé au couvercle pour prélever une aliquote de l'échantillon à toutes les 24 h d'observation, en vue de mesures physicochimiques. Il est réalisé par fixation d'un tube de Tygon® (n° 5) à la partie supérieure d'un raccord fixé au couvercle et d'un autre tube de Tygon® (n° 6) au bas du même raccord. Une pipette de 10 mL, fixée à l'extrémité de ce tube de Tygon® (n° 6) plonge dans l'échantillon. Après le prélèvement de l'aliquote, s'assurer de ranger l'extrémité du siphon au-dessus du niveau de l'échantillon pour éviter de perdre de ce dernier. Par précaution, on peut obturer l'extrémité du siphon au moyen d'une pince. Il faut également prendre des précautions supplémentaires lors du prélèvement de sous-échantillons pour le contrôle des paramètres de qualité de l'eau (par exemple pH, température), une dépression pouvant se former et conduire à une perte notable d'échantillon de l'enceinte expérimentale.

On fixe solidement le couvercle et on étanchéifie le joint entre ce dernier et l'enceinte expérimentale en attachant tous les joints toriques et tous les élastiques aux ergots d'accrochage en plastique de l'enceinte

expérimentale. La technique de recyclage ne donnera de bons résultats pour la stabilisation du pH que si le joint est étanche.

La présence, dans l'enceinte étanchéifiée, de solutions fortement colorées, opaques ou écumeuses pourrait rendre difficile la constatation des signes de stress et de mortalité chez le poisson. Il faut effectuer les vérifications et retirer les *poissons morts* le plus rapidement possible pour empêcher la dérive du pH.

Dans les échantillons d'effluent d'eau usée dont la *DBO* est élevée, on pourrait observer une baisse de la teneur en oxygène dissous pendant l'essai de létalité aiguë employant des truites arc-en-ciel lorsque le pH n'est pas stabilisé. Cette baisse pourrait être aggravée par l'emploi de la technique de stabilisation du pH par recyclage.

2.3.2 Maîtrise de la dérive du pH

La stabilisation du pH commence dès le début de l'aération et elle dure 30 min., au débit de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L, avant l'introduction des poissons (voir § 2.1). Pour faire débiter l'aération, on fait démarrer la pompe et on ajuste le réglage des débitmètres. L'aération doit se faire au débit de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L pendant la durée de l'essai, à toutes les concentrations d'exposition, y compris dans le contrôle (suivant la méthode SPE 1/RM/13).

À la fin de la durée requise d'aération (c'est-à-dire 30 min. au moins), on enlève les élastiques du point de prise d'échantillons du couvercle de toutes les concentrations. On ouvre le point de prise d'échantillons et on introduit les poissons, rapidement et au hasard. On referme le point de prise d'échantillons et on poursuit l'essai.

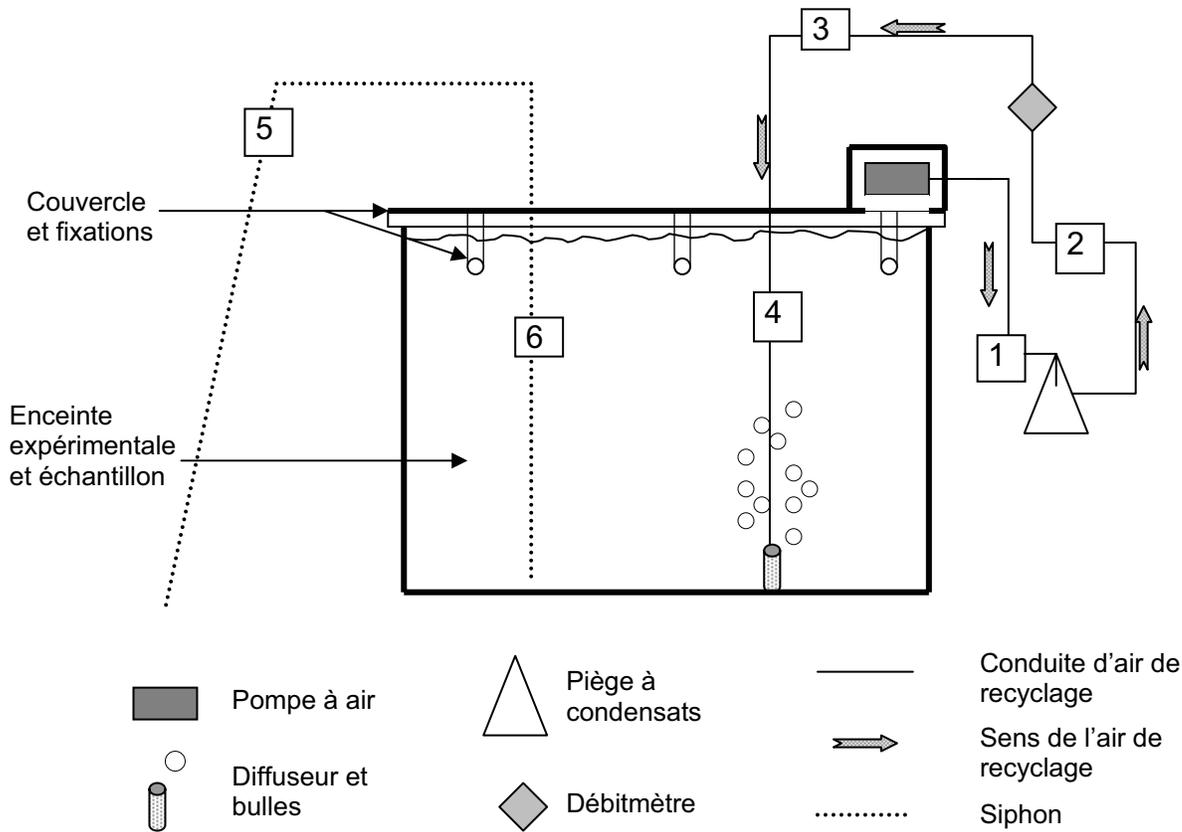


Figure 6. — Schéma du montage employé pour la technique de recyclage

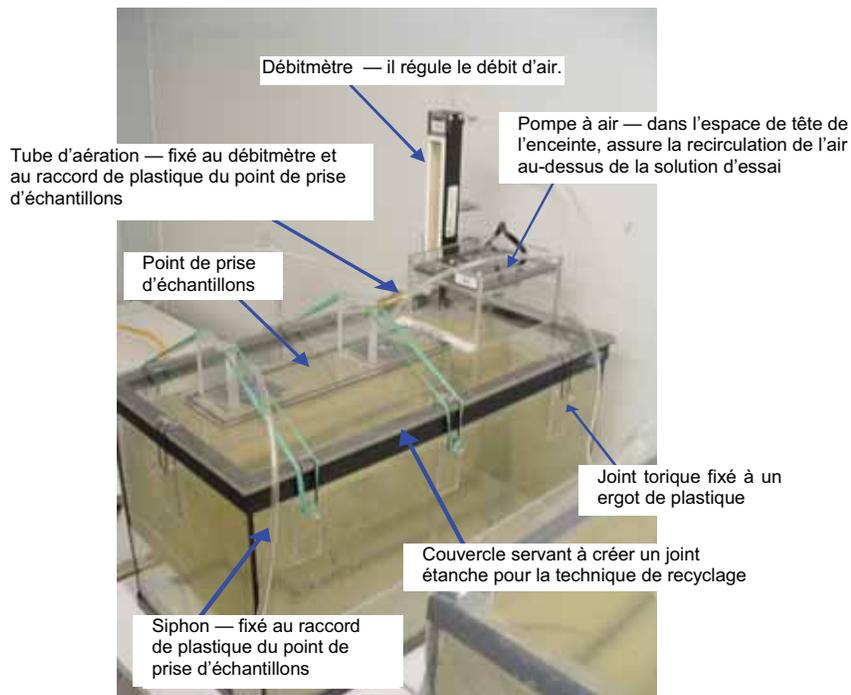


Figure 7. — Aquariums de verre avec point de prise d'échantillons, pompe à air et couvercle pour l'application de la technique de recyclage

Il faut mesurer le pH et le consigner immédiatement avant toute aération (pH_i), à t = 0 h (début de l'essai, lors de l'introduction des poissons), puis à 24, 48, 72 et 96 h dans le contrôle et à toutes les concentrations d'exposition. On obtient de la sorte les données montrant que le pH a été maintenu constant durant l'essai. Il est également recommandé de mesurer le pH à t = 0,5, 1 et 2 h, pour s'assurer de l'étanchéité du joint du couvercle. Il faut également mesurer et consigner le pH chaque fois que l'on ouvre l'enceinte expérimentale (c'est-à-dire pour en retirer les poissons morts). On consigne le pH final d'une concentration d'essai avant la fin des 96 h si la mortalité des truites y est de 100 %.

Il faut retirer aussi rapidement que possible tout poisson mort observé à chaque intervalle de 24 h. Pour cela, on défait les élastiques du point de prise d'échantillons sur le couvercle et on retire les poissons morts. On remet ensuite les élastiques pour étanchéifier l'enceinte expérimentale. Il importe d'agir rapidement à chaque ouverture de l'enceinte, puisqu'une perte de CO₂ pendant l'opération peut entraîner une augmentation du pH.

Une inspection visuelle au moins quotidienne doit être faite pour s'assurer du bon fonctionnement des conduites d'air, des pompes et des débitmètres.

2.4 Stabilisation du pH au moyen d'un pH-mètre régulateur

La technique de stabilisation du pH au moyen d'un pH-mètre régulateur utilise du CO₂ pur (ou un mélange de gaz constitué de 15 % de CO₂, de 21 % d'O₂ et de 64 % de N₂) avec des conduites séparées pour l'apport d'air du laboratoire. Si le pH s'élève au-dessus de la valeur de consigne, le régulateur entre en action, et du CO₂ est ajouté pour abaisser le pH. Une fois le pH revenu à la limite acceptable, l'injection de CO₂ s'arrête automatiquement.

Outre l'équipement et les installations ordinairement exigés pour la réalisation de la méthode SPE 1/RM/13, on a besoin, pour l'application de cette technique de stabilisation du pH, du matériel et de l'équipement suivants :

- solénoïdes (un pour chaque concentration d'exposition) pour réguler le débit de CO₂ ;
- bloc détenteur de CO₂ et vanne à pointeau ;
- bouteille certifiée de gaz comprimé (100 % de CO₂), d'un fournisseur homologué de gaz comprimé (par exemple Praxair) [nota : on peut également employer le mélange de gaz (15 % de CO₂, 21 % d'O₂ et 64 % de N₂) utilisé pour la technique d'injection de CO₂ afin de stabiliser le pH au moyen du pH-mètre régulateur] ;
- pH-mètre régulateur [par exemple American Marine Inc. (n° de catalogue CRT4) ou l'équivalent ; disponible auprès de Fish Farm Supply, Elmira (Ontario)] ;
- pipettes de verre (1 mL) ;
- antiretours (par exemple disponibles auprès de Hagen®) ;
- divers raccords [tuyau de fer noir de 0,5 po (1,25 cm) pour gaz naturel, pour le montage servant à la détermination de la CL50 ; raccords à 90° de 0,5 po ; raccords en T de 0,5 po ; mamelons de 0,5 po sur 2,5 po ; tubes de Tygon® d'1/8 po de diamètre intérieur (0,32 cm), destinés à servir de liaison avec les pipettes ; mamelons de 0,5 po sur 6 (15,2 cm)].

Nous recommandons fortement l'emploi d'une pipette de verre pour la fourniture du gaz CO₂, car elle assure une meilleure maîtrise de la quantité de CO₂ fourni à l'échantillon lors de la mise en marche du pH-mètre régulateur. Les figures 8 à 13 sont constituées de diagrammes et de photos montrant le montage utilisé pour l'application de la technique du pH-mètre régulateur.

2.4.1 Bloc détenteur et solénoïde

Chaque détenteur est relié au bloc de mesure (claviature) [fig. 8 et 9]. Le détenteur de CO₂

est relié à une bouteille de CO₂. Ne jamais huiler ni graisser le détendeur ou les raccords de la bouteille, ce qui pourrait contaminer le mélange de gaz purs ou causer un risque d'incendie.

La claviature est relié au détendeur de la bouteille de CO₂ par un tube haute pression (0,25 po [0,64 cm] de diamètre extérieur) de polypropylène. Toutes les vannes à pointeau des solénoïdes doivent être en position hors tension. Le chapeau hexagonal autobloquant du détendeur du bloc à solénoïde est retiré pour montrer la vis de réglage (on pourra avoir besoin d'une clé hexagonale ou d'une clé Allen), et on tourne la vis dans le sens

antihoraire jusqu'à ce qu'elle n'oppose plus de résistance.

On ouvre le robinet de la bouteille de CO₂ et on règle la pression à environ 40 lb/po². On ajuste la pression de travail sur le solénoïde (à l'aide de la clé hexagonale ou de la clé Allen) à environ 20 lb/po². On devrait vérifier l'étanchéité des joints au moyen de détersif à vaisselle diluée (la formation de bulles révèle la présence de fuites, et, le cas échéant, on devrait réverifier le montage et l'étanchéifier).

On fixe une longueur convenable de conduite à air en silicone (diamètre extérieur de 0,25 po) à la vanne à pointeau et on fixe l'autre bout à l'antiretour de la pipette (fig. 13).

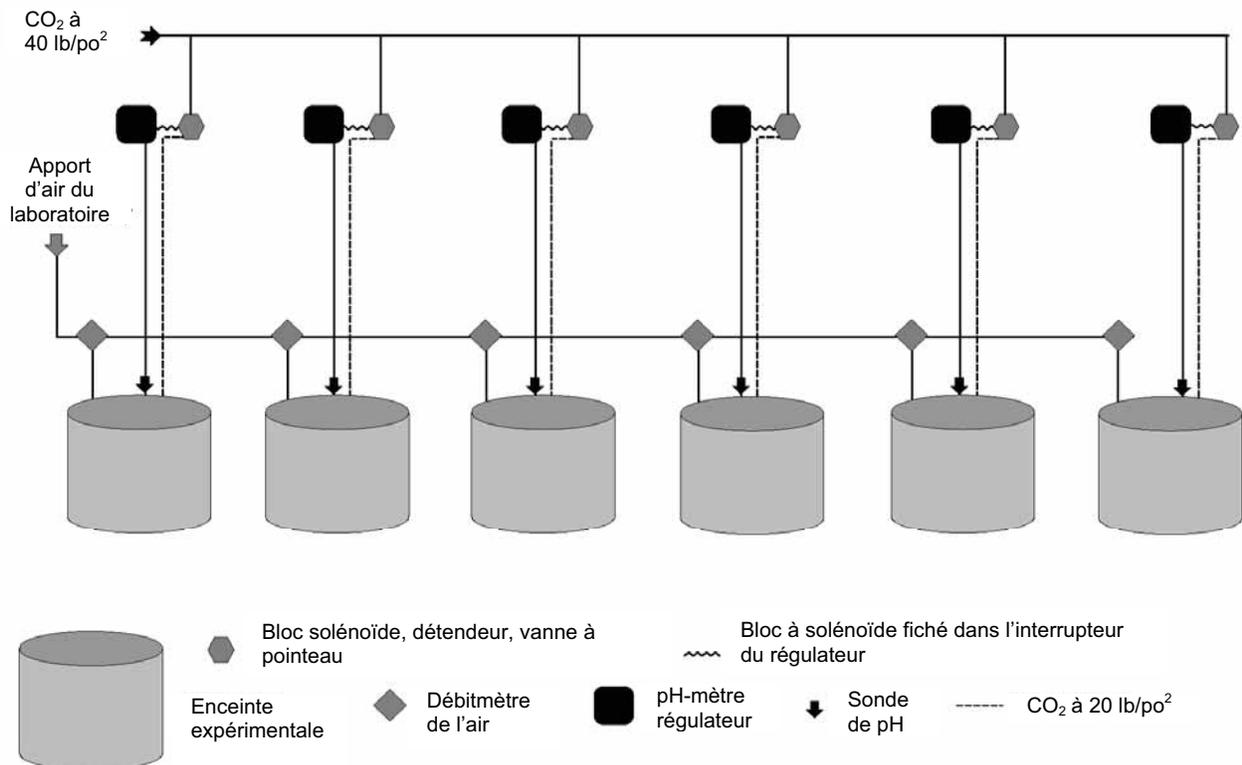


Figure 8. — Schéma du montage employé pour un essai à six concentrations utilisant la technique du pH-mètre régulateur

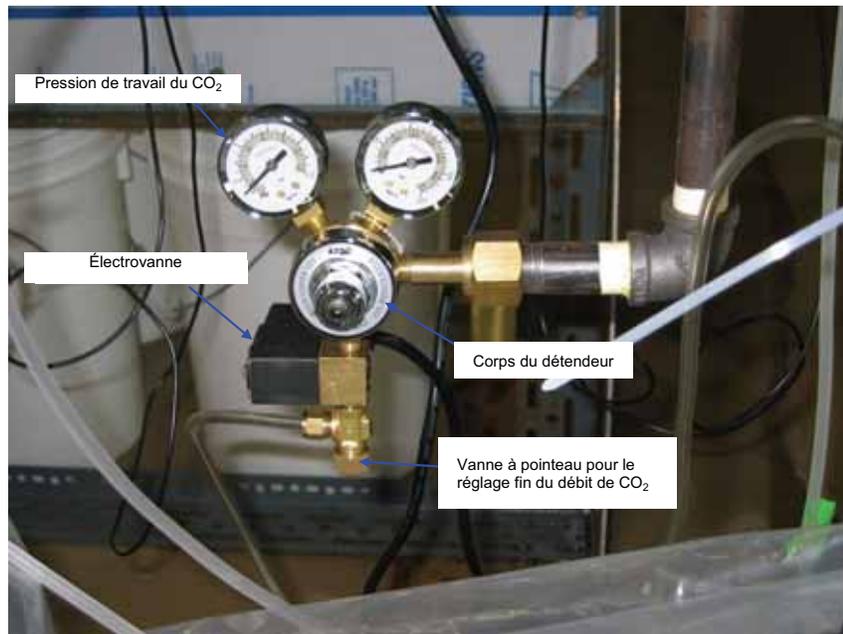


Figure 9. — Bloc solénoïde, détendeur et vanne à pointe pour la technique du pH-mètre régulateur



Figure 10. — Montage expérimental pour la technique du pH-mètre régulateur



Figure 11. — Vue générale du montage employé pour l'essai de détermination de la CL50 utilisant la technique du pH-mètre régulateur



Figure 12. — Exemple de pH-mètre régulateur

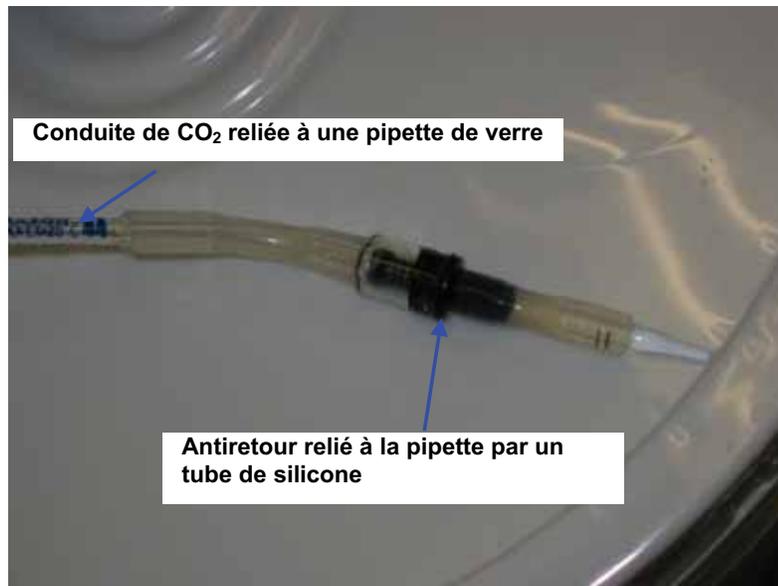


Figure 13. — Conduite de CO₂ et antiretour

2.4.2 *pH-mètre régulateur*

Il faut étalonner le pH-mètre régulateur (v. fig. 12) journallement à l'aide d'étalons certifiés de pH. Il faut fixer avant le début de l'essai la tolérance du pH-mètre régulateur (c'est-à-dire la sensibilité du réglage du pH) [$\pm 0,2$ unité de pH]. Pendant l'étalonnage, il faut retirer de la solution d'exposition les tubes à CO₂. Il faut étalonner rapidement l'appareil de mesure pour prévenir une variation du pH. Les consignes d'étalonnage et d'entretien devraient être fournies par le fabricant et elles devraient être étudiées avant le début de l'essai.

On place la sonde de pH du pH-mètre régulateur dans une seule solution d'essai pour la durée de l'essai (on peut temporairement retirer la sonde pour les besoins de l'étalonnage). On devrait fixer la sonde à 3-5 cm sous la surface de la solution d'essai. La pipette d'amenée du CO₂ devrait être située directement sous la sonde et attachée au conducteur de la sonde. Il importe de le faire pour maîtriser le pH avec précision. Une vanne antiretour à ressort (acier inoxydable) empêche un éventuel retour en arrière de liquide dans la conduite de CO₂ (fig. 13). On devrait utiliser des sondes de pH durable, afin de réduire le risque de fuite de

solution de chlorure de potassium (KCl) de la sonde vers la solution d'exposition.

2.4.3 *Maîtrise de la dérive du pH*

La stabilisation du pH commence dès le début de la période d'aération de 30 min. au débit de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L, avant l'introduction des poissons (voir § 2.1). Au début de l'aération, on ouvre le robinet principal de la bouteille de CO₂ à environ 40 lb/po². Le manomètre du détenteur du solénoïde devrait indiquer environ 20 lb/po².

Le débit de l'aération avec l'air du laboratoire doit se maintenir à $6,5 \pm 1$ mL/min. · L durant l'essai, à toutes les concentrations, y compris le contrôle (suivant la méthode SPE 1/RM/13). Chaque enceinte expérimentale est aérée par l'entremise d'un diffuseur, au débit de $6,5 \pm 1$ mL/min. · L. L'ajout de CO₂ augmentera légèrement le débit d'aération chaque fois que le régulateur de pH entre en action puis s'arrête afin de maintenir le pH moyen dans la solution d'essai à 100 % à $\pm 0,2$ unité de pH et le pH instantané à $\pm 0,3$ unité de pH du pH initial. L'augmentation du débit d'aération est considérée comme insignifiante, puisqu'elle ne survient que périodiquement, pour neutraliser

l'augmentation du pH, et qu'elle devrait se maintenir dans des limites acceptables.

La mesure fréquente du pH et les corrections appropriées du débit de CO₂ sont cruciales pour la stabilisation du pH, notamment au cours des quelques premières heures de l'essai. Il faut surveiller étroitement la valeur du pH affichée par les pH-mètres régulateurs afin d'assurer le bon fonctionnement du solénoïde. Il importe que le régulateur se mette en marche et s'arrête pour réguler le débit de CO₂. Si le cycle de marche/arrêt ne survient pas en deux à cinq minutes de fonctionnement et que le solénoïde reste ouvert (sur tension), on devrait graduellement augmenter le débit de CO₂ au moyen de la vanne à pointeau jusqu'à l'obtention de la valeur requise de pH et à la fermeture du solénoïde.

Il faut mesurer et consigner le pH immédiatement avant toute aération (pH i), à t = 0 h (au début de l'essai, à l'introduction des poissons) puis à 24, 48, 72 et 96 h, dans le contrôle et à toutes les concentrations d'exposition. On obtiendra ainsi les données montrant que le pH a été maîtrisé durant tout l'essai. Il faut également mesurer et consigner le pH chaque fois que l'on ajuste manuellement le débit de CO₂. Après un ajustement, la mesure du pH doit avoir lieu dans les 30 min. ou moins qui suivent, pour s'assurer du maintien du pH. On prend une lecture finale du pH avant la fin de la période d'essai de 96 h si on observe un taux de mortalité des truites de 100 % dans une concentration d'essai.

Il faut faire des vérifications visuelles une fois par jour pour s'assurer du bon fonctionnement des pH-mètres régulateurs et des conduites d'air.

Présentation des résultats

Outre les exigences en matière de rapport exposées dans la *Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel* (méthode SPE 1/RM/13), il faut communiquer les éléments supplémentaires suivants lorsque l'on effectue un essai avec stabilisation du pH d'un effluent d'eau usée, c'est-à-dire :

- le type de techniques de stabilisation du pH utilisé (pH-mètre régulateur, recyclage ou injection de CO₂) ;
- pour la technique d'injection de CO₂, le pourcentage de mélange de gaz CO₂ utilisé durant l'essai ;
- pour la technique de stabilisation avec pH-mètre régulateur, le pourcentage de mélange de gaz CO₂ ou de CO₂ utilisé durant l'essai ;
- les valeurs ou concentrations mesurées des paramètres suivants dans l'échantillon d'effluent d'eau usée à 100 %, après obtention d'un échantillon composite de tout l'effluent à utiliser dans l'essai, son mélange à fond et ajustement de la température de l'échantillon à 15 ± 1 °C : pH_i (pH_i = pH mesuré dans l'échantillon composite à 100 %, à 15 °C, avant toute aération des solutions d'essai), ammoniac total et dureté ;
- pour la technique d'injection de CO₂, l'alcalinité de l'échantillon d'effluent d'eau usée à 100 % ;
- la concentration calculée d'ammoniac non ionisé, fondée sur la mesure de l'ammoniac total, à la température de 15 °C et au pH initial (pH_i) de l'échantillon d'effluent d'eau usée à 100 % ;
- le chlore résiduel total dans l'échantillon d'effluent d'eau usée, si le poisson présente un comportement évocateur de stress ou un comportement atypique au début de l'essai ;
- pour les essais à concentrations multiples (CL50), le pH des dilutions de l'effluent au début de l'essai (avant le début de toute aération à 15 °C) à chaque concentration d'exposition ;
- pour la technique d'injection de CO₂, les mesures du pH à t = 0 h (début de l'essai, à l'introduction des poissons) et à t = 0,5, 1, 2, 3, 24, 48, 72 et 96 h, dans le contrôle et toutes les concentrations d'exposition ;
- pour la technique de recyclage et la technique du pH-mètre régulateur, les lectures du pH prises à t = 0 h (début de l'essai, à l'introduction des poissons) et à 24, 48, 72 et 96 h, dans le contrôle et toutes les concentrations d'exposition ;
- pour la technique de recyclage, les lectures supplémentaires de pH (le cas échéant) à t = 0,5, 1, 2 h ;
- toute lecture supplémentaire du pH prise pendant l'essai après ajustement du CO₂ ou du mélange de gaz CO₂ ou enlèvement du couvercle employé dans la technique de recyclage ;
- le pH moyen fondé sur toutes les lectures prises durant l'essai.

Références

- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21^e éd., APHA, AWWA, and WEF, Washington, DC (2005).
- EC (Environnement Canada). *Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel*, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada. Ottawa, rapport SPE 1/RM/13, 2^e édition, englobant les modifications de mai 2007, 18 p. (2000).
- EC (Environnement Canada). *Renseignements de base et conseils supplémentaires pour l'étude de la létalité aiguë d'un effluent d'eau usée pour la truite arc-en-ciel*, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (2008).
- Elliott, G.E., L. Mitchelmore, W. Antonioli, et N. Kruper. pH Maintenance of Chemi-thermo-mechanical Pulp Mill Effluent by CO₂ Recycling During Trout Lethality Testing. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71:1053–1060 (2003).
- ESG (ESG International Inc.). Guidance Document for Acute Lethality Testing of Metal Mining Wastewaters. Préparé pour les études toxicologiques dites Toxicological Investigations of Mining Wastewaters (TIME) Network (2002).
- Mount, D.R. et D.I. Mount. A Simple Method of pH Control for Static and Static-renewal Aquatic Toxicity Tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11:609–614 (1992).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *1999 Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia*, USEPA, Washington, DC, EPA-822-R-99/014 (1999).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, 5^e éd. USEPA, Washington, DC, EPA 821/R-02-012 (2002).