

SPE 1/RM/21 – Deuxième édition, février 2007

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



Méthode d'essai biologique : Essai de reproduction et de survie du cladocère *Ceriodaphnia dubia*



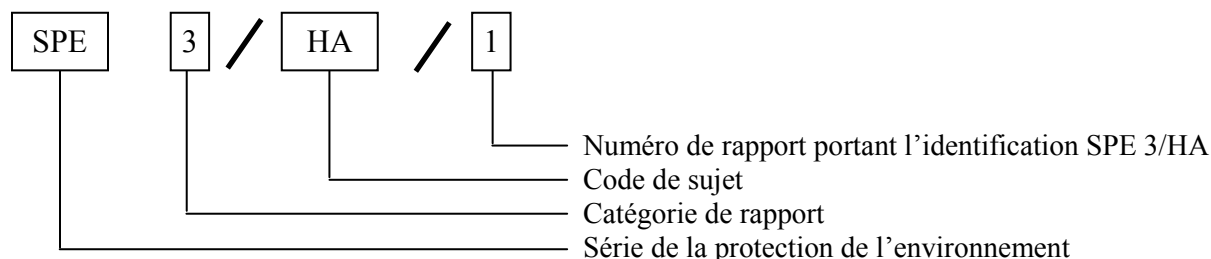
Environnement
Canada

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.

Méthode d'essai biologique : Essai de reproduction et de survie du cladocère *Ceriodaphnia dubia*

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
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/21
Deuxième édition
Février 2007

Catalogage avant publication de Bibliothèque et Archives Canada

Méthode d'essai biologique. Essai de reproduction et de survie du cladocère *Ceriodaphnia dubia* / Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre des sciences et technologies environnementales. -- 2^e éd.

(Rapport ; SPE 1/RM/21)

Publ. aussi en anglais sous le titre: Biological test method. Test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*.

Comprend un résumé en anglais.

Comprend des réf. bibliogr. : p. 46

ISBN 0-662-71407-5

N^o de cat. : En49-7/1-21F

1. Cladocères, Effets de la pollution de l'eau sur.
2. Eaux usées -- Qualité -- Essais -- Normes -- Canada.
3. Toxicité -- Méthodologie -- Normes -- Canada.
4. Eau -- Qualité -- Essais biologiques.
5. Écotoxicologie.
- 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) ; SPE 1/RM/21

QL444.B83B5614 2007

628.1'61

C2006-980125-8

Commentaires

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
Ottawa (Ontario)
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 (Ontario)
K1A 0H3

This report 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, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation quant à l'emploi de ces produits de la part d'Environnement Canada. Il existe d'autres produits de valeur similaire.

Résumé

Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de toxicité chronique sur trois couvées du cladocère d'eau douce Ceriodaphnia dubia. Cette deuxième édition du document SPE 1/RM/21, publiée en 2007, remplace la première édition, parue en 1992. Elle comporte de nombreuses modifications procédurales, de même que des indications et des instructions à jour qui faciliteront l'exécution de la méthode d'essai biologique.

Les conditions et procédures générales ou universelles décrites ici permettent de réaliser des essais de toxicité chronique avec un large éventail de matières ou de substances d'essai. Le document précise d'autres conditions et procédures propres à l'évaluation d'échantillons de substances chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou d'eaux réceptrices. Il renferme aussi des instructions sur les conditions et règles d'élevage des organismes d'essai, la préparation des aliments, la manipulation et l'entreposage des échantillons, les exigences en matière d'installations d'essai, les procédures entourant la préparation des solutions d'essai et la mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et les mesures pertinentes, les paramètres, les méthodes de calcul et l'utilisation de toxiques de référence.

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing chronic three-brood toxicity tests with the freshwater cladoceran, Ceriodaphnia dubia, are described in this report. This second edition of EPS 1/RM/21, published in 2007, supersedes the first edition that was published in 1992. It includes numerous procedural modifications as well as updated guidance and instructions to assist in performing the biological test method.

General or universal conditions and procedures are outlined for undertaking this chronic toxicity test using a variety of test materials or substances. Additional conditions and procedures are stipulated which are specific for assessing samples of chemicals, effluents, elutriates, leachates, or receiving waters. Included are instructions on culturing conditions and requirements, food preparation, sample handling and storage, test facility requirements, procedures for preparing test solutions and test initiation, specified test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, and the use of reference toxicants.

Avant-propos

*Le présent document fait partie d'une collection de **méthodes recommandées** pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets toxiques de l'exposition d'une seule espèce d'organisme aquatique ou terrestre à des échantillons de substances ou de matières toxiques ou susceptibles d'être toxiques dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies. Environnement Canada a évalué les méthodes recommandées et en préconise l'emploi :*

- *dans ses laboratoires d'écotoxicité;*
- *pour les essais qu'il donne en sous-traitance ou qui sont demandés par des organismes ou des entreprises de l'extérieur;*
- *en l'absence d'instructions plus précises, comme dans les règlements;*
- *en vue de l'élaboration d'instructions très explicites, comme celles qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais faisant partie de la collection ont été choisis parce qu'ils répondent aux besoins des programmes de protection et de gestion de l'environnement que mène le ministère. Les documents de la collection ont pour objet d'orienter les utilisateurs et de faciliter la mise en œuvre de procédures cohérentes, pertinentes et intégrées en vue d'obtenir des données sur la toxicité, pour les organismes aquatiques ou terrestres, d'échantillons de substances ou de matières d'essai destinées à être dispersées dans l'environnement ou présentes dans l'environnement. Selon la ou les méthodes choisies et le milieu naturel visé, les substances ou matières dont la toxicité doit être mesurée pourraient comprendre des échantillons de substances ou de produits chimiques, d'un effluent, d'un éluviat, d'un lixiviat, d'une eau réceptrice, d'un sédiment ou d'une matière particulière semblable, ou encore d'un sol ou d'une matière particulière semblable. On trouvera à l'annexe G du présent document la liste des méthodes d'essai biologique et des documents à l'appui publiés jusqu'à maintenant par Environnement Canada dans le cadre de cette collection.

Les termes définis dans la section « Terminologie » sont en italique lorsqu'ils sont mentionnés pour la première fois dans le texte, conformément à la définition qui en est donnée ici. L'italique sert également à mettre en évidence ces termes et certains autres.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Avant-propos	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xii
Abréviations et formules chimiques	xiii
Terminologie	xv
Remerciements	xxiii

Section 1

Introduction	1
1.1 Contexte	1
1.2 Description de l'espèce et emplois antérieurs dans les essais.....	1

Section 2

Organismes d'essai	5
2.1 Espèce	5
2.2 Stade du cycle biologique	5
2.3 Source	5
2.4 Élevage.....	5
2.4.1 Généralités	5
2.4.2 Installations et appareils.....	8
2.4.3 Éclairage	9
2.4.4 Milieu d'élevage	9
2.4.5 Température	10
2.4.6 Oxygène dissous	11
2.4.7 pH.....	11
2.4.8 Dureté.....	11
2.4.9 Alimentation	11
2.4.10 Manipulation des organismes	13
2.4.11 Critères de santé	13

Section 3

Système d'essai	14
3.1 Installations et appareils.....	14
3.2 Éclairage	14
3.3 Récipients d'essai.....	14
3.4 Eau témoin/de dilution.....	14

Section 4

Procédures d'essai universelles	16
4.1 Préparation des solutions d'essai	16
4.2 Démarrage de l'essai	20
4.3 Renouvellement des solutions.....	21
4.4 Conditions expérimentales.....	22
4.4.1 Oxygène dissous	23
4.4.2 pH.....	23

4.5	Observations et mesures	24
4.6	Paramètres et calculs	25
4.6.1	Essais à concentrations multiples.....	25
4.6.2	Essais à concentration unique	27
4.7	Toxique de référence.....	27
4.8	Considérations d'ordre juridique	29

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité de substances

chimiques	30
5.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons	30
5.2 Préparation des solutions d'essai	30
5.3 Eau témoin/de dilution.....	31
5.4 Observations et mesures au cours de l'essai	32
5.5 Paramètres et calculs.....	33

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'effluent,

d'élutriat et de lixiviat	34
6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	34
6.2 Préparation des solutions d'essai	35
6.3 Eau témoin/de dilution.....	35
6.4 Conditions expérimentales.....	37
6.5 Observations et mesures au cours de l'essai	37
6.6 Paramètres et calculs.....	37

Section 7

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons

d'eau réceptrice.....	39
7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	39
7.2 Préparation des solutions d'essai	39
7.3 Eau témoin/de dilution.....	39
7.4 Observations et mesures au cours de l'essai	40
7.5 Paramètres et calculs.....	40

Section 8

Rapports à produire	41
8.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai.....	41
8.1.1 Substance ou matière d'essai	41
8.1.2 Organismes d'essai	42
8.1.3 Installation d'essai et appareils	42
8.1.4 Eau témoin/de dilution.....	42
8.1.5 Méthode d'essai	42
8.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires.....	43
8.1.7 Résultats.....	43
8.2 Exigences supplémentaires	44
8.2.1 Substance ou matière d'essai	44
8.2.2 Organismes d'essai	44
8.2.3 Installations et appareillage.....	44

8.2.4	Eau témoin/de dilution.....	44
8.2.5	Méthode d'essai	44
8.2.6	Conditions expérimentales et modes opératoires.....	45
8.2.7	Résultats de l'essai.....	45

Références	46
-------------------------	-----------

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité	52
--	-----------

Annexe B

Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada	54
--	-----------

Annexe C

Variantes des essais de toxicité chronique avec <i>Ceriodaphnia</i> spp., décrits dans des méthodes canadiennes et étatsuniennes.....	55
--	-----------

Annexe D

Méthode de préparation du mélange de LCT et de la nourriture à base d'algues pour l'élevage de <i>Ceriodaphnia dubia</i>	63
---	-----------

Annexe E

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais toxicologiques	68
--	-----------

Annexe F

Analyse de la mortalité en vue de l'estimation de la concentration létale médiane	69
--	-----------

Annexe G

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada.....	73
--	-----------

Liste des tableaux

1. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés pour l'élevage de *Ceriodaphnia dubia*.....7
2. Préparation d'eau reconstituée d'une dureté donnée (USEPA, 1985a)12
3. Liste de contrôle des conditions et des procédures recommandées pour les essais de toxicité chronique sur trois couvées de *Ceriodaphnia dubia*17

Liste des figures

1. Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et modes opératoires convenant à différents types de substances ou de matières d'essai2
2. Anatomie de la *Ceriodaphnia dubia* femelle.....6

Abréviations et formules chimiques

ANOVA	analyse de la variance	min	minute
CaCl ₂	chlorure de calcium	mL	millilitre
CaCO ₃	carbonate de calcium	mm	millimètre
CaSO ₄	sulfate de calcium	MnCl ₂	chlorure de manganèse
CI _p	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)	mS/m	millisiemens par mètre
CL	concentration létale	N	normal
CL ₅₀	concentration létale médiane	Na ₂ EDTA	acide éthylènediamine-tétracétate disodique
cm	centimètre	Na ₂ MoO ₄	molybdate de sodium
CMEO	concentration minimale avec effet observé	NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
CoCl ₂	chlorure de cobalt	NaNO ₃	nitrate de sodium
CSEO	concentration sans effet observé	NaOH	hydroxyde de sodium
CuCl ₂	chlorure de cuivre	OD	oxygène dissous (teneur)
EDTA	acide éthylènediamine-tétracétique (C ₁₀ H ₁₆ O ₈ N ₂)	sp.	espèce
ET	écart-type	spp.	espèces
FeCl ₃	chlorure ferrique	TL ₅₀	temps léthal 50
g	gramme	ZnCl ₂	chlorure de zinc
g/kg	grammes par kilogramme	ZnSO ₄	sulfate de zinc
h	heure	°C	degré Celsius
H ₃ BO ₃	acide borique	μE/(m ² · s)	micro-Einstein par mètre carré et par seconde
HCl	acide chlorhydrique	μg	microgramme
H ₂ O	eau	μm	micromètre
K ₂ HO ₄	phosphate dipotassique	μmhos/cm	micromhos par centimètre
KCl	chlorure de potassium	μmol/(m ² · s)	micromole par mètre carré et par seconde
L	litre	>	plus de
LCT	mélange de levure, de Cerophyll ^{MC} et de nourriture pour truites	<	moins de
m	mètre	≥	plus de ou égal à
MC	marque de commerce	≤	moins de ou égal à
mg	milligramme	/	par; peut aussi signifier « ou » (p. ex. eau témoin/de dilution)
MgCl ₂	chlorure de magnésium	±	plus ou moins
MgSO ₄	sulfate de magnésium	%	pourcentage ou pour cent
		‰	parties par millier

Terminologie

Nota : Toutes les définitions ci-dessous s'inscrivent dans le contexte des procédures décrites dans le présent rapport; elles pourraient ne pas être adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* exprime l'obligation absolue.

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

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

L'auxiliaire *pourrait (pourraient)* indique la possibilité ou l'éventualité.

Termes techniques généraux

Acclimatation – Adaptation physiologique à un niveau précis d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux, comme la température. Ce terme s'applique généralement à l'ajustement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Conductivité – Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de conduire l'électricité. Cette capacité dépend des concentrations des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité ainsi que de la température de la solution. La conductivité est mesurée à 25 °C et exprimée en millisiemens par mètre (mS/m) ou en micromhos par centimètre (µmhos/cm); 1 mS/m = 10 µmhos/cm.

Conformité – Respect des règlements ou des exigences gouvernementales en matière de permis.

Couvée – Groupe ou cohorte de descendants (fratrie) issus d'une femelle dans l'intervalle compris entre deux mues, soit avant le rejet de la carapace au moment de la mue. Deux néonates ou plus présentes une journée quelconque de l'essai dans une enceinte expérimentale constituent une couvée.

Culture – Stock d'organismes cultivés en laboratoire dans des conditions définies et contrôlées pendant une génération ou plus afin d'obtenir des sujets d'expérience en bonne santé. Ce terme désigne également l'activité visant à produire de tels sujets à partir d'une génération ou plus dans des conditions définies et contrôlées.

Daphnie – Invertébré microcrustacé d'eau douce communément appelé puce d'eau. *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* et *D. pulex* sont des espèces de daphnies.

Daphnie de la première génération – Organisme introduit dans une solution au début d'un essai.

Dispersant – Substance chimique abaissant la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex. l'huile), ce qui facilite la dispersion de la substance ou de la matière hydrophobe dans l'eau sous forme d'émulsion.

Dureté – Concentration de cations dans l’eau, réagissant avec un savon de sodium pour entraîner la précipitation d’un résidu insoluble. En règle générale, la dureté correspond à la concentration d’ions calcium et magnésium dans l’eau et s’exprime en milligrammes par litre (mg/L) de carbonate de calcium ou l’équivalent.

Élevage – Stock d’organismes élevés en laboratoire dans des conditions définies et contrôlées pendant une génération ou plus afin d’obtenir des sujets d’expérience en bonne santé. Ce terme désigne également l’activité visant à produire de tels sujets à partir d’une génération ou plus dans des conditions définies et contrôlées.

Élevage en nombre – Élevage constitué de nombreuses génitrices (habituellement 40 ou 50) et de leur descendance. Des néonates issues d’élevages en nombre servent de sources de génitrices pour les élevages individuels.

Élevage individuel – Élevage de néonates établi à partir d’organismes isolés élevés dans des béciers ou des gobelets. Des néonates issues de génitrices individuelles servent aux essais toxicologiques.

Émulsifiant – Substance chimique facilitant le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l’eau, d’une substance ou d’une matière par ailleurs hydrophobe.

Éphippie – Oothèque (coque) qui se forme sous la portion postéro-dorsale de la carapace d’une daphnie femelle adulte lorsque les conditions d’élevage ou d’essai sont défavorables (p. ex. surpeuplement, renouvellement peu fréquent de l’eau d’élevage, alimentation inadéquate, basse température, photopériode réduite). En général, les œufs que renferme l’éphippie ont été fécondés.

Floculation – Formation d’un précipité non consolidé (c.-à-d. d’un floccule) dans une solution.

Génitrice – Daphnie adulte (femelle) en santé dont sont issues de multiples couvées de néonates vivantes.

Lux – Unité d’éclairement mesurant l’intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,092 9 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 lux.

Méthode de référence – Protocole conçu spécifiquement pour la mise en œuvre d’un essai de toxicité, c’est-à-dire une méthode d’essai biologique comportant un ensemble explicite de procédures et de conditions expérimentales exposé avec précision dans un document écrit et dont sont convenues formellement les parties en cause. Contrairement à d’autres méthodes d’essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement Canada, les *méthodes de référence* sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

Néonate – Sujet né ou éclos depuis peu (daphnie au premier stade larvaire, âgée de 24 h ou moins).

pH – Logarithme négatif de l’activité des ions hydrogène exprimée en équivalents grammes par litre. La valeur du pH indique le degré ou l’intensité des réactions tant acides qu’alcalines sur une échelle de 0 à 14, le nombre 7 représentant la neutralité, les nombres inférieurs à 7, des réactions de plus en plus acides, et les nombres supérieurs à 7, des réactions de plus en plus alcalines.

Photopériode – Durée de l’éclairement (et de l’obscurité) sur 24 h.

Pourcentage (%) – Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent (1 %) d'une substance représente une unité ou partie d'une matière ou d'une substance (p. ex. substance chimique, effluent, éluviat, lixiviât ou eau réceptrice) diluée dans l'eau pour constituer en tout 100 parties. Les concentrations peuvent être préparées selon un rapport de volume à volume, de masse à masse ou encore, ce qui est moins précis, de masse à volume, et sont exprimées sous forme de pourcentage de la substance ou de la matière d'essai dans la solution finale.

Précipitation – Formation d'un solide (le précipité) à partir d'une partie ou de la totalité des constituants dissous d'une solution.

Prétraitement – Dans le présent document, désigne le traitement d'un échantillon ou d'une dilution de cet échantillon avant d'y exposer des daphnies.

Protocole – Document exposant avec précision l'ensemble des marches à suivre pendant un essai et dont sont convenues formellement les parties en cause.

Salinité – Quantité totale (exprimée en grammes) de matière solide dissoute dans 1 kg d'eau de mer. Elle est déterminée une fois que tous les carbonates ont été convertis en oxydes, que le bromure et l'iodure ont été remplacés entièrement par du chlorure et que toute la matière organique a été oxydée. On peut également mesurer la salinité directement à l'aide d'un salinomètre, d'un conductivimètre ou d'autres moyens (v. APHA et coll., 1989, 2005). La salinité est habituellement exprimée en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

Surveillance – Vérification périodique (p. ex. quotidienne, hebdomadaire, mensuelle, trimestrielle) de la qualité, ou collecte et communication de l'information. Dans le présent rapport, le terme désigne soit la vérification périodique et la mesure de certaines variables biologiques ou de variables relatives à la qualité de l'eau, soit le prélèvement d'échantillons d'effluents, d'éluviats, de lixiviats ou d'eaux réceptrices aux fins de la mesure de leur toxicité.

Turbidité – Mesure dans laquelle la clarté de l'eau est réduite par la présence de particules en suspension ou d'autres matières qui diffusent et absorbent la lumière plutôt que de la transmettre en ligne droite à travers l'échantillon. Cette caractéristique est généralement exprimée en unités de turbidité néphélométrique.

Termes relatifs aux matières ou substances d'essai

Eau d'amont – Eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau ou d'un lac) ne subissant pas l'influence de l'effluent (ou d'une autre matière ou substance d'essai) parce qu'elle en est éloignée en direction opposée au courant ou qu'elle s'en trouve suffisamment loin perpendiculairement au courant.

Eau de dilution – Eau servant à diluer une substance ou une matière d'essai à différentes concentrations aux fins d'un essai toxicologique comportant divers traitements.

Eau déchlorée – Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) que l'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés.

Eau désionisée – Eau que l'on a purifiée pour en extraire les ions en solution en la faisant circuler dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée – Eau ayant été traitée dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre matériau pour la débarrasser de ses impuretés.

Eau réceptrice – Eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau ou d'un lac) dans laquelle ont été rejetées ou sont sur le point d'être rejetées des matières résiduelles (p. ex. cette eau pourrait être en amont du point de rejet). Il faut en donner une description étoffée pour préciser ce dont il s'agit.

Eau reconstituée – Eau désionisée ou distillée sous verre à laquelle des produits chimiques de qualité réactif ont été ajoutés. L'eau douce synthétique qui en résulte est exempte de contaminants et possède le pH et la dureté souhaités.

Eau témoin/de dilution – Eau utilisée pour l'essai témoin et/ou pour diluer la matière ou la substance d'essai.

Eau usée – Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les élutriats.

Effluent – Tout déchet liquide (p. ex. industriel, urbain) rejeté dans le milieu aquatique.

Élutriat – Solution aqueuse obtenue après addition d'eau à une matière solide (p. ex. sédiments, stériles, boues de forage, matières draguées), par brassage du mélange, par centrifugation ou filtration de celui-ci ou par décantation du surnageant.

Essai toxicologique de référence – Essai effectué à l'aide d'un toxique de référence parallèlement à un essai définitif de toxicité sur une matière ou une substance d'essai donnée, afin d'évaluer la sensibilité des organismes ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire pour cette substance chimique au moment où l'on évalue la matière ou la substance d'essai. Toute déviation par rapport à une plage normale préétablie indique que la sensibilité des organismes d'essai ainsi que le rendement et la précision de l'essai sont suspects.

Lixiviat – Eau, usée ou non, ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

Matière – *Substance* dont est faite une chose. Ses caractéristiques seraient plus ou moins uniformes. Un effluent, un lixiviat, un élutriat ou une eau de surface sont des matières. Habituellement, une matière renferme un nombre plus ou moins grand de substances.

Milieu d'élevage – Eau utilisée pour l'élevage de *C. dubia*. Syn. : eau d'élevage.

Produit chimique – V. substance chimique.

Solution mère – Solution aqueuse concentrée de la substance ou de la matière d'essai. On ajoute des quantités mesurées d'une solution mère à l'eau de dilution pour préparer les concentrations voulues des solutions d'essai.

Substance – Matière particulière ayant des propriétés plus ou moins uniformes. Le terme a un sens plus restreint que *matière* et pourrait désigner une substance chimique (p. ex. un élément) ou un produit chimique donnés.

Substance chimique – Dans le présent rapport, désigne tout élément, composé, préparation ou mélange de substances qui pourraient pénétrer dans le milieu aquatique par le biais d'un déversement, d'un épandage, d'une pulvérisation ou d'un rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés dans la lutte contre la lamproie marine, de même que les agents de traitement des déversements d'hydrocarbure, constituent des exemples de telles substances.

Témoin – Dans une enquête ou une étude, variante expérimentale reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Dans un essai de toxicité, le témoin doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de matière ou de substance d'essai contaminée. Le témoin sert à vérifier l'absence de toxicité attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex. la qualité de l'eau de dilution, la santé des organismes d'essai ou les effets dus à la manipulation de ces derniers).

Toxique de référence – Étalon chimique permettant d'établir la fiabilité des données sur la toxicité d'une matière ou d'une substance d'essai. Dans la plupart des cas, on procède à un essai toxicologique au moyen d'un toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment où l'on évalue la matière ou la substance d'essai ainsi que la précision des résultats obtenus à l'égard de cette substance.

Termes relatifs aux statistiques et à la toxicologie

À renouvellement intermittent – Se dit d'un essai toxicologique au cours duquel les solutions d'essai sont renouvelées (remplacées) périodiquement, habituellement au début de chaque période d'essai de 24 h. Syn. : à renouvellement périodique.

Aigu – Qui se manifeste à l'intérieur d'une période d'exposition relativement courte (secondes, minutes, heures, quelques jours) par rapport à la durée de vie de l'organisme d'essai.

Carte de contrôle – Graphique servant à suivre l'évolution des effets mesurés d'un toxique de référence. La date de l'essai se trouve sur l'axe horizontal; sur l'axe logarithmique vertical, on porte la concentration à laquelle l'effet est observé.

Chronique – Qui se produit à l'intérieur d'une période d'exposition relativement longue, habituellement une partie appréciable (p. ex. 10 % ou plus) de la durée de vie d'un organisme. Dans le cas des essais avec des cladocères, cette période englobe généralement la production de trois couvées.

CI_p ou concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet donné – Estimation ponctuelle de la concentration d'une substance ou d'une matière d'essai qui provoque un pourcentage donné d'atteinte à une fonction biologique quantitative, comme le succès de reproduction. Par exemple, la CI₂₅ pourrait être la concentration estimative qui causerait une réduction de 25 % du nombre moyen de jeunes produits par les organismes exposés comparativement au nombre produit par les organismes témoins. Ce terme devrait être employé pour tout essai toxicologique visant à mesurer la variation d'une mesure relative, comme le taux de reproduction, la vitesse de croissance ou la fréquence respiratoire. (Le terme CE₅₀, ou concentration efficace médiane, est réservé aux mesures quantiques, c.-à-d. le nombre de sujets exposés chez lesquels un effet particulier est observé.)

CL₅₀ ou *concentration létale médiane* – Concentration de la substance ou de la matière d’essai dans l’eau, qui est censée être létale pour 50 % des organismes d’essai. La CL₅₀ et ses limites de confiance à 95 % sont généralement dérivées de l’analyse statistique de la mortalité survenue à plusieurs concentrations expérimentales après une période d’exposition donnée. La durée de l’exposition doit être précisée (p. ex. CL₅₀ 7 jours).

CMEO ou *concentration minimale avec effet observé* – Concentration la plus faible d’une matière ou d’une substance d’essai à laquelle des organismes sont exposés, qui provoque chez ces organismes des effets nocifs observables et statistiquement significatifs. Par exemple, ce pourrait être la concentration minimale à laquelle le nombre de jeunes vivants produits par chacune des daphnies adultes présente un écart significatif par comparaison avec les organismes témoins.

CSEO ou *concentration sans effet observé* – Concentration la plus élevée d’une matière ou d’une substance d’essai à laquelle les organismes sont exposés et qui ne cause aucun effet nocif observable et statistiquement significatif. Par exemple, ce pourrait être la concentration la plus élevée à laquelle le nombre de jeunes vivants produits par chacune des daphnies adultes ne présente pas d’écart significatif par comparaison avec les organismes témoins. La CSEO est habituellement associée à des effets sublétaux et à l’effet le plus critique, sauf indication contraire.

Essai sans renouvellement des solutions – Essai toxicologique au cours duquel les solutions d’essai ne sont pas renouvelées.

Essai toxicologique ou *essai de toxicité* – Détermination de l’effet d’une substance ou d’une matière sur un groupe d’organismes choisis, dans des conditions définies. Un essai toxicologique en milieu aquatique permet habituellement de mesurer : a) la proportion des organismes atteints (essai *quantique*) et/ou b) l’intensité de l’effet observé (essai *quantitatif* ou gradué), après exposition à des concentrations données d’une substance chimique, d’un effluent, d’un éluat, d’un lixiviat ou d’une eau réceptrice.

Homoscédasticité – Dans le présent document, se dit de données dont le diagramme de dispersion se caractérise par une homogénéité des résidus. Ce terme s’applique lorsque la variance des résidus n’est pratiquement pas différente de celle de la variable indépendante (c.-à-d. les concentrations d’essai ou de traitement). Lorsqu’on effectue des analyses statistiques et que l’on évalue les résidus (p. ex. à l’aide du test de Levene), dans le cas de données d’essai affichant une homoscédasticité (c.-à-d. une homogénéité des résidus), on n’observe aucune différence importante dans la variance des résidus pour toutes les concentrations d’essai ou de traitement.

Hormèse – Phénomène par lequel de faibles concentrations de la matière ou de la substance d’essai stimulent le rendement des organismes d’essai, par comparaison avec les organismes témoins (autrement dit, il y a amélioration du rendement à une ou plusieurs faibles concentrations par comparaison avec le traitement témoin). Des effets néfastes se manifestent à des concentrations plus élevées.

Identification des agents toxiques – Prétraitement systématique d’un échantillon (p. ex. rajustement du pH, filtration, aération), suivi d’essais toxicologiques. Une telle procédure permet d’identifier, dans un mélange complexe, l’agent ou les agents responsables au premier chef de la toxicité. L’essai toxicologique peut être létal ou sublétal.

Létal – Qui cause directement la mort. Dans le cas des daphnies, on entend par « mort » la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité, notamment en ce qui concerne l'antenne, l'antennule, le postabdomen et le battement cardiaque, observée au microscope.

Létalité aiguë – Mort d'organismes d'essai dans un bref intervalle d'exposition à une substance ou matière expérimentale, habituellement 48 h dans le cas des daphnies.

Limite de contrôle de 95 % – Limite, calculée logarithmiquement, située à plus ou moins deux écarts-types (± 2 ET), de part et d'autre de la moyenne géométrique historique des paramètres de mesure d'essais toxicologiques effectués avec un toxique de référence.

Moyenne géométrique – Moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. Elle a pour avantage d'atténuer l'influence qu'exercent les valeurs extrêmes sur la moyenne, comme lorsqu'une moyenne arithmétique est établie. On peut calculer la moyenne géométrique comme étant la racine n ième du produit de « n » valeurs et, aussi, comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes des « n » valeurs.

Normalité (ou distribution normale) – Désigne une série de données d'observation décrivant une courbe symétrique en forme de cloche. Cette série met en lien la fréquence d'occurrence et la valeur du phénomène mesuré. Dans une *distribution normale*, la plupart des données d'observation se regroupent près de la valeur moyenne et deviennent progressivement moins nombreuses à mesure que l'on se rapproche des extrêmes de la gamme de valeurs. La distribution normale joue un rôle central dans la théorie statistique en raison de ses propriétés mathématiques. Elle revêt également une grande importance dans les sciences biologiques du fait que beaucoup de phénomènes biologiques suivent la même courbe. Dans un bon nombre de tests statistiques, on présume que les données suivent une courbe de distribution normale, de sorte qu'il peut être nécessaire de déterminer si c'est le cas d'un ensemble de données en particulier.

Paramètre – Mesure ou valeur (il peut y en avoir plus d'une) caractérisant les résultats de l'essai (p. ex. CL_{50} , CI_{25}). La réaction des organismes d'essai (p. ex. la mort ou le nombre de descendants produits) constitue également un paramètre.

Précision – Degré de rapprochement des données recueillies au cours de mesures répétées de la même quantité. La précision décrit le degré de certitude entourant un résultat ou le rapprochement des valeurs d'un paramètre dérivées d'une analyse statistique, comme la CI_p .

Quantique – Adjectif utilisé dans des expressions comme données quantiques et essai quantique. Un effet quantique est un effet auquel chaque organisme d'essai réagit ou ne réagit pas. Par exemple, un animal peut soit vivre, soit mourir, ou encore se développer normalement ou anormalement. En général, l'effet quantique est exprimé sous forme de nombre ou de pourcentage.

Quantitatif – Adjectif utilisé dans des expressions comme données quantitatives et essai quantitatif. Un effet quantitatif est un effet dont la valeur mesurée peut être un nombre entier ou une fraction de celui-ci sur une échelle numérique. Il peut s'agir, par exemple, du nombre de descendants produits à la fin de l'essai, ou encore de la masse de chaque organisme.

Répétition (traitement, récipients d'essai) – Enceinte expérimentale individuelle renfermant un nombre prescrit d'organismes ainsi qu'une concentration de la matière ou de la substance identique à celle du ou des traitements témoins ou des traitements de référence. Comme il s'agit d'une unité expérimentale indépendante, tout transfert d'organisme ou de matière d'essai d'une enceinte expérimentale à une autre invaliderait l'analyse statistique fondée sur la répétition.

Subléta – Qui a un effet néfaste sur l'organisme, mais en deçà de la concentration ou du niveau de contamination causant directement la mort au cours de l'essai.

TL₅₀ ou temps léta 50 – Durée d'exposition qui causerait 50 % de mortalité au sein d'un groupe de daphnies de la première génération dans une solution d'essai donnée. Cette valeur est estimée par une représentation graphique puisqu'il n'existe pas de technique informatique ou mathématique normalisée qui soit d'usage courant (v. l'annexe F).

Toxicité – Capacité propre d'une substance ou d'une matière de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants. Ces effets peuvent être létaux ou sublétaux.

Toxicité chronique – Effets à long terme liés à des changements de métabolisme, de croissance, de reproduction, de survie et d'aptitude à la survie, notamment.

Toxicologie – Science qui étudie la toxicité des substances, des matières ou des conditions d'un milieu. Cette science fait appel à une gamme illimitée de disciplines scientifiques, d'outils de laboratoire ou de terrain, d'études à divers niveaux d'organisation allant de la molécule à une espèce individuelle, à des populations ou à des communautés. La toxicologie appliquée se propose normalement de définir la marge de sécurité de l'emploi d'une substance chimique ou d'autres agents.

Toxique – Synonyme de substance toxique. Une substance ou matière toxique peut avoir des effets nocifs sur des organismes vivants si elle se trouve en quantité suffisante, au bon endroit.

Traitement – En règle générale, intervention ou procédure dont l'effet doit être mesuré. Plus précisément, dans un essai toxicologique, un traitement est une condition ou une procédure que le responsable de l'essai applique aux organismes d'essai afin de mesurer les effets d'une substance ou d'une matière sur ces organismes. Le traitement peut consister en une concentration donnée d'une matière ou d'une substance potentiellement toxique. Il peut aussi s'agir d'une matière d'essai en particulier (p. ex. un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat, d'eau réceptrice ou d'eau témoin).

Remerciements

La première édition de la présente méthode d'essai biologique, publiée en février 1992 et modifiée en novembre 1997, a été rédigée en collaboration par D. McLeay [McLeay Associates Ltd., West Vancouver (C.-B.)] et J. Sprague [Sprague Associates Ltd., Guelph (Ont.)]. Elle s'inspirait de rapports antérieurs décrivant un essai de toxicité chronique (trois couvées) en regard de la survie et de la reproduction de daphnies (*Ceriodaphnia dubia*), mis au point aux États-Unis (USEPA, 1985a, 1989, 1994; Norberg-King, 1989). G. Sergy et R. Scroggins (Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada), en leur qualité d'autorité scientifique, ont apporté une aide technique et orienté les travaux. Nous souhaitons remercier les membres du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (v. l'annexe A), qui ont participé activement à l'élaboration et à l'examen de la première édition du document. Nous tenons également à souligner l'appui des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (v. l'annexe B).

La présente édition (la deuxième) a été préparée par D. McLeay [McLeay Environmental Ltd., Victoria (C.-B.)], avec l'aide et les conseils de L. Taylor (gestionnaire, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes), de R. Scroggins (chef, Division des méthodes biologiques) et de L. Van der Vliet (Section de l'élaboration et de l'application des méthodes) du Centre des sciences et technologies environnementales, Environnement Canada, Ottawa (Ont.). Elle comprend les modifications apportées en novembre 1997 (lesquelles ont été modifiées de nouveau au besoin), de même que de nombreuses mises à jour, comme l'utilisation des analyses de régression des données relatives aux paramètres quantitatifs. Le personnel des laboratoires canadiens mettant en œuvre la méthode d'essai de toxicité chronique décrite ici a fait parvenir à la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes un grand nombre d'observations et de suggestions ayant trait aux modifications à apporter à la première édition. Ces observations et suggestions ont été prises en compte pendant la préparation de cette deuxième édition du rapport SPE 1/RM/21. Les modifications que l'USEPA a apportées au mode opératoire connexe à sa méthode d'essai sur la survie et la reproduction de *C. dubia*, entre la troisième édition (USEPA, 1994) et la quatrième édition (section 13 dans USEPA, 2002) de cette méthode, ont aussi été prises en compte.

Section 1

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs dans le monde, les *essais toxicologiques* en milieu aquatique servent à mesurer, à prévoir et à maîtriser le rejet de *substances* ou de *matières* susceptibles d'être nocives pour les formes de vie aquatique indigènes. Reconnaissant qu'une seule méthode d'essai ou un seul organisme d'essai ne peut répondre aux besoins d'une démarche globale visant la conservation et la protection de l'environnement, le Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (v. l'annexe A) a proposé récemment de mettre au point un ensemble d'essais toxicologiques en milieu aquatique qui serait d'un emploi généralement acceptable et qui permettrait de mesurer différents effets *toxiques* à l'aide d'organismes représentant différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques (Sergy, 1987). Un essai de toxicité *chronique* employant une espèce de *daphnie* (invertébré microcrustacé d'eau douce de la famille des daphniidés) comptait parmi un certain nombre d'essais toxicologiques en milieu aquatique que l'on a choisi de normaliser suffisamment pour satisfaire aux exigences d'Environnement Canada en matière d'essais. La première édition de cette méthode d'essai biologique a été publiée en février 1992 (rapport SPE 1/RM/21) et modifiée en novembre 1997. La présente édition (la deuxième) comporte de nombreuses améliorations procédurales, des mises à jour et des conseils plus explicites, de même que des instructions sur les méthodes statistiques (c.-à-d. les analyses de régression) à utiliser dorénavant pour le calcul des effets sur la reproduction, qui constituent un *paramètre* d'essai.

Le présent rapport décrit les procédures universelles qui s'appliquent à tout essai de toxicité chronique sur trois *couvées* du cladocère *Ceriodaphnia dubia*. Il expose aussi des ensembles particuliers de conditions et de modes

opératoires exigés ou recommandés pour les essais de toxicité chronique visant à évaluer différents types de substances ou de matières (à savoir des échantillons de *substances chimiques*, d'*effluents*, d'*élutriats*, de *lixiviats* ou d'*eaux réceptrices*) (v. la figure 1). Les modes opératoires et conditions applicables à la conduite de ces essais sont définis et, au besoin, expliqués dans des notes en bas de page.

En formulant le présent mode opératoire, on s'est efforcé de trouver le juste milieu entre les coûts et les considérations scientifiques et pratiques, tout en s'assurant que les résultats seront assez exacts et précis pour la plupart des situations auxquels ils s'appliqueront. Les auteurs supposent que l'utilisateur connaît dans une certaine mesure les essais toxicologiques en milieu aquatique. Le présent document ne renferme pas d'instructions explicites qui pourraient être exigées dans un *protocole* réglementaire, bien qu'il soit conçu comme un guide utile pour des applications de ce type, notamment.

1.2 Description de l'espèce et emplois antérieurs dans les essais

Les daphnies sont des microcrustacés d'eau douce, communément appelées « puces d'eau », qui appartiennent à l'ordre des cladocères. Les cladocères de la famille des daphniidés, notamment *Daphnia* spp. et *Ceriodaphnia* spp., sont omniprésents dans les eaux douces des climats tempérés (Berner, 1986). Les deux genres abondent dans les lacs, les étangs et les sections calmes des cours d'eau de l'Amérique du Nord (Pennak, 1978). Dans ce type d'habitat, les cladocères constituent des espèces importantes sur le plan écologique puisqu'ils comptent parmi les principaux groupes à convertir le phytoplancton et les bactéries en protéines animales (Carpenter et coll., 1985) et qu'ils

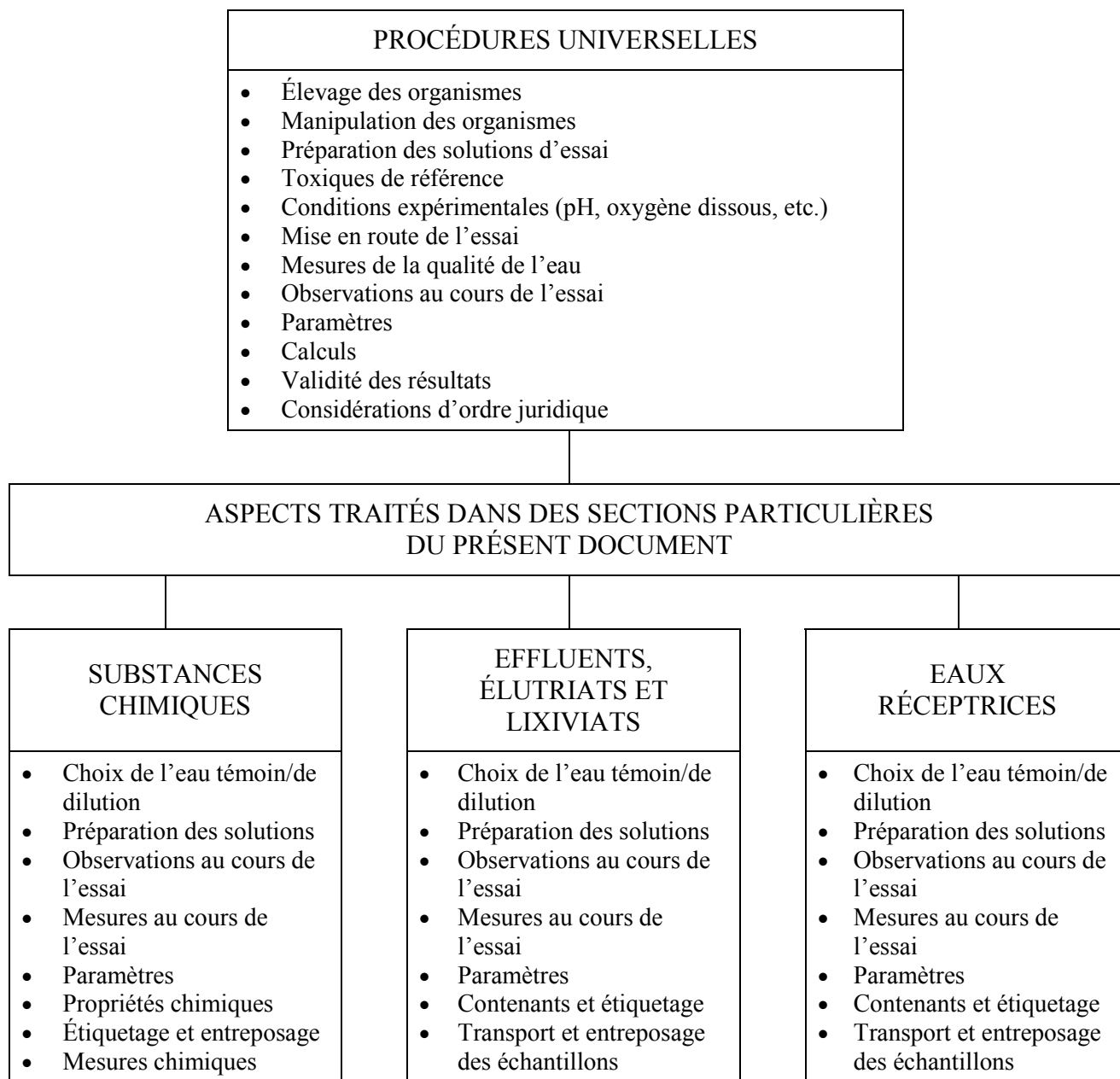


Figure 1. Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et modes opératoires convenant à différents types de substances ou de matières d'essai

constituent une partie importante du régime alimentaire de nombreuses espèces de poissons, notamment les jeunes salmonidés.

Les daphnies constituent un bon choix pour l'exécution courante d'essais de toxicité dans les laboratoires canadiens, et ce, pour un certain nombre de raisons :

- Au Canada, les daphnies sont présentes un peu partout dans les masses d'eau douce et dans un large éventail d'habitats.
- Elles représentent un maillon important de nombreuses chaînes alimentaires aquatiques et constituent une source alimentaire appréciable pour les petits poissons.
- Elles ont un cycle biologique relativement court et on peut les élever en laboratoire.
- Elles sont sensibles à un large éventail de contaminants aquatiques et sont très souvent utilisées dans des essais visant à évaluer la *toxicité aiguë* ou *chronique* de substances chimiques ou d'effluents.
- En raison de leur petite taille, on n'a besoin que de faibles volumes d'eau d'essai et d'*eau de dilution*, ce qui facilite le prélèvement et le transport des échantillons d'*eau usée* et d'eau réceptrice.

Les *Daphnia* spp. de plus grande taille (c.-à-d. *D. pulex* et *D. magna*) sont utilisées depuis des années dans les essais visant à évaluer la létalité aiguë (48 h) d'effluents ou de substances chimiques, et l'on dispose maintenant de procédures normalisées pour la réalisation d'essais de *létalité aiguë* avec ces espèces (EC, 1990a). Les daphnies du genre *Daphnia* (*D. magna* en particulier) servent aussi à des évaluations de la toxicité chronique (ensemble du cycle biologique) de substances chimiques et d'eaux usées (GITA, 1986), même si les essais de cette nature nécessitent beaucoup de personnel et peuvent durer de 14 à 21 jours. Un essai de toxicité chronique sur trois couvées de *C. dubia* peut normalement être mené à terme en 5 à 8 jours; par conséquent, le coût des essais et le

volume des échantillons se trouvent réduits sensiblement. Depuis qu'il est appliqué (Mount et Norberg, 1984), cet essai est devenu populaire au Canada et aux États-Unis, et il occupe maintenant une place de choix au Canada dans un grand nombre de laboratoires privés, provinciaux et fédéraux (v. l'annexe B) menant des essais toxicologiques en milieu aquatique. Dans un certain nombre d'études, on a comparé les résultats d'essais sur trois couvées de *C. dubia* aux résultats obtenus lors de relevés *in situ*; ces études ont mis en évidence d'excellentes corrélations entre les résultats de tels essais employant certains effluents et les incidences écologiques de ces derniers (Mount et coll., 1984, 1985, 1986; Mount et Norberg-King, 1986; Norberg-King et Mount, 1986; Eagleson et coll., 1990).

Au début des années 1980, la United States Environmental Protection Agency (USEPA) a mis au point un essai de toxicité chronique à *renouvellement intermittent* sur trois couvées du cladocère *Ceriodaphnia* sp. (*C. reticulata* à l'origine) (Mount et Norberg, 1984). En 1985, la méthode d'essai (avec *C. dubia*) faisait partie des trois méthodes publiées par l'USEPA pour estimer à court terme la toxicité chronique d'effluents et d'eaux réceptrices chez des organismes d'eau douce (USEPA, 1985a). L'Agence a ensuite révisé la méthode d'essai : en plus d'y intégrer un plus grand nombre de détails descriptifs et un régime alimentaire amélioré, elle y a modifié et élargi les paramètres d'essai ainsi que les méthodes de calcul de ceux-ci, puis l'a publiée sous forme de deuxième, de troisième et de quatrième éditions (USEPA, 1989, 1994 et 2002, respectivement). L'American Society for Testing and Materials (ASTM) a également établi un guide normalisé pour l'exécution d'essais de toxicité à renouvellement intermittent sur trois couvées de *C. dubia* (ASTM, 1989, 2006). On trouvera à l'annexe C un condensé d'autres documents où sont décrites des procédures et conditions applicables à ce type d'essai.

Des chercheurs qui connaissent bien les méthodes établies par l'USEPA (1985a, 1989, 1994, 2002) pour les essais de toxicité chronique avec

C. dubia ont examiné l'influence d'un certain nombre de conditions d'essai sur les résultats obtenus, dont les suivantes : la température (McNaught et Mount, 1985), la santé et les antécédents des *élevages* (Keating, 1985; Cooney et DeGraeve, 1986; Cowgill, 1987), le type d'aliments et la ration (Cooney et DeGraeve, 1986; Cowgill, 1987; DeGraeve et Cooney, 1987; Cooney et coll., 1988; Cowgill et coll., 1988; Melville et Richert, 1989), la qualité de l'eau (Cooney et DeGraeve, 1986; Cowgill, 1987; DeGraeve et Cooney, 1987; Cooney et coll., 1988; Keating et coll., 1989; Melville et Richert, 1989), la contenance des récipients d'essai et leur type (Cowgill et Milazzo, 1989; Melville et Richert, 1989;). La *précision* de la méthode d'essai de l'USEPA (1985a, 1989, 1994, 2002) avec *C. dubia* a également été évaluée lors d'études interlaboratoires et intralaboratoires (DeGraeve et coll., 1989). On a élaboré le présent rapport en tenant compte des résultats de tous ces travaux.

L'objet visé ici est de définir une méthode canadienne « normalisée » d'évaluation de la toxicité chronique de différentes matières ou substances avec *C. dubia*. Si l'application d'autres méthodes publiées (v. l'annexe C) pouvait être limitée à certains types de substances

ou de matières, le présent rapport est axé sur l'évaluation de la toxicité chronique de substances chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats ou d'eaux réceptrices. Les conditions et procédures universelles décrites ci-après sont en bonne partie celles mises au point par l'USEPA (1989, 1994, 2002), auxquelles on a apporté des modifications et des ajouts utiles tirés de ASTM (1989, 2006) et d'autres sources.

La méthode est destinée à être utilisée avec *C. dubia* acclimatée à l'eau douce, avec de l'eau douce comme eau *témoin*/de dilution, de même qu'avec des effluents, des lixiviats ou des élutriats qui sont essentiellement constitués d'eau douce (c.-à-d. d'une *salinité* d'au plus 10 g/kg) ou qui sont salés mais destinés à être rejetés dans l'eau douce. Son application peut prendre diverses formes, mais elle comprend des cas où l'incidence réelle ou potentielle de substances ou de matières sur le milieu dulcicole fait l'objet d'un examen. D'autres essais, au moyen d'autres espèces acclimatées à l'eau de mer, *peuvent* servir à évaluer l'incidence réelle ou potentielle de substances ou de matières dans les milieux estuariens ou marins ou à évaluer une eau usée d'une salinité supérieure à 10 g/kg destinée à être rejetée dans de tels milieux.

Section 2

Organismes d'essai

2.1 Espèce

Ceriodaphnia dubia (famille des daphniidés), un microcrustacé de l'ordre des cladocères, doit être utilisée pour les essais (v. la figure 2). On considère que *C. affinis* et *C. dubia* désignent la même espèce, mais *C. dubia* a la préséance taxinomique (Berner, 1986). Certaines caractéristiques de la femelle adulte (longueur maximale : 0,9 mm; hauteur : 0,6 fois la longueur) permettent de distinguer cette espèce des organismes apparentés. En particulier, le postabdomen est modérément allongé et large (environ deux fois plus long que large), et il comporte un léger point d'inflexion à mi-longueur et sept ou huit denticules anaux. La griffe postabdominale est modérément incurvée, et les trois segments des sétules latéraux (dents) sont de longueur semblable (figure 2).

2.2 Stade du cycle biologique

Des daphnies *néonates* de moins de 24 h, toutes nées dans un intervalle de 12 h, doivent être utilisées pour démarrer l'essai; il serait souhaitable d'utiliser des néonates qui ont moins de 12 h et qui sont toutes nées dans un intervalle de 6 h. Ces sujets *devraient* provenir d'élevages *individuels* (c.-à.-d. servant uniquement à l'obtention de néonates en vue des essais; v. 2.4.1); ils devraient en outre répondre aux exigences énoncées en 2.4.11.

2.3 Source

On peut se procurer des élevages de *C. dubia* auprès de laboratoires privés et gouvernementaux qui procèdent à des essais toxicologiques. Pour obtenir des conseils sur les sources de daphnies, on peut communiquer avec un bureau régional d'Environnement Canada (v. l'annexe B). On a besoin de très peu d'organismes (p. ex. de 10 à 20 néonates) pour démarrer un élevage. Ceux-ci peuvent être transportés dans une bouteille de

1 L remplie d'eau d'élevage et contenant des aliments (v. 2.4).

La taxinomie de l'espèce *doit* être confirmée au microscope (Berner, 1986; USEPA, 1989, 1994, 2002) au début de l'élevage d'organismes provenant de sources extérieures¹. Il est aussi conseillé d'effectuer des vérifications taxinomiques périodiques des élevages en laboratoire afin de confirmer l'identité de l'espèce d'essai. Lorsqu'on démarre un élevage avec des organismes provenant d'une source extérieure, il est souhaitable de prendre un seul sujet, de le sacrifier après la production de jeunes, de le monter en préparation microscopique permanente (USEPA, 1989, 1994, 2002) et de l'identifier jusqu'à l'espèce.

2.4 Élevage

2.4.1 Généralités

Le tableau 1 résume les conditions et les modes opératoires recommandés ou exigés ci-après pour l'élevage des daphnies. Ces renseignements visent à permettre une certaine souplesse, d'un laboratoire à l'autre, dans la normalisation des conditions qui, si elles n'étaient pas régies, pourraient influencer sur la santé et le rendement des organismes d'essai.

¹ Les premiers élevages de *Ceriodaphnia* spp. établis dans les laboratoires de l'USEPA à Duluth, MN, ont présenté, avec le temps, une transition progressive de *C. reticulata* à *C. dubia*. Un variant morphologique de *C. dubia* a également été identifié dans certains élevages de l'USEPA (Berner, 1986).

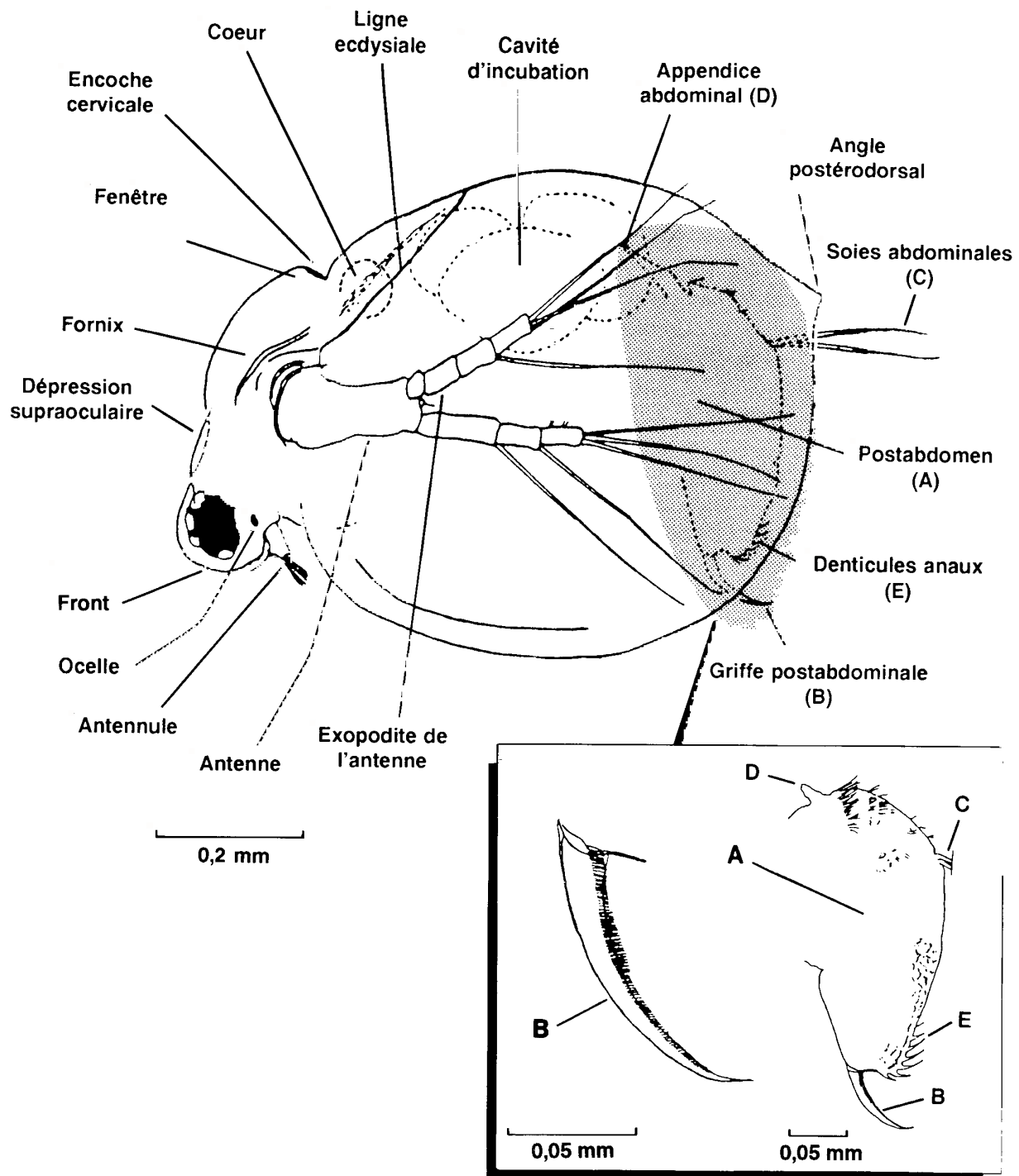


Figure 2. Anatomie de la *Ceriodaphnia dubia* femelle (illustration tirée de Berner, 1986)

Tableau 1. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés pour l'élevage de *Ceriodaphnia dubia*

Source de daphnies	– fournisseurs de matériel biologique ou laboratoires gouvernementaux; confirmation taxinomique par examen microscopique
Milieu d'élevage	– eau de surface ou souterraine non contaminée, eau municipale déchlorée ou eau reconstituée; l'eau doit être remplacée au moins deux fois par semaine (élevages en nombre) ou au moins trois fois par semaine (élevages individuels)
Température	– dans la gamme de 25 ± 1 °C
Oxygénation/aération	– avant emploi et au besoin, aération du milieu d'élevage de manière à obtenir une teneur en oxygène dissous de 90–100 % de la valeur de saturation; pas d'aération des élevages
pH	– entre 6,0 et 8,5
Dureté	– dans la gamme de ± 20 % de celle de l'eau témoin/de dilution, pendant l'élevage d'au moins deux générations de daphnies avant les essais
Éclairage	– éclairage fluorescent « blanc froid »; 100–600 lux à la surface de l'eau; 16 ± 1 h de clarté, 8 ± 1 h d'obscurité
Alimentation	– de préférence, mélange de levure, de Cerophyll ^{MC} et de nourriture pour truites (LCT), plus des algues
Manipulation	– minimale, à la pipette
Critères de santé	– pour être acceptables aux fins des essais, les génitrices des élevages individuels doivent avoir eu un taux de mortalité d'au plus 20 % et avoir produit au moins 15 jeunes en moyenne pendant la période correspondant aux 3 premières couvées, au cours de la semaine précédant l'essai; les troisième et quatrième couvées doivent compter au moins 8 individus par génitrice; en outre, aucune éphippie ne doit être apparue chez les sujets d'élevage

L'USEPA a préparé une vidéo de formation ainsi qu'un rapport complémentaire où sont illustrés et décrits les conditions et modes opératoires maintenant en usage à l'Environmental Research Laboratory de Duluth (MN) pour l'élevage de *C. dubia* (Norberg-King, 1989). Cet ouvrage de référence et la vidéo présentant la méthode d'essai sont maintenant disponibles au Canada; on peut se les procurer auprès d'un bureau régional d'Environnement Canada (v. l'annexe B).

Les ascendants de tous les organismes utilisés pour démarrer un essai doivent provenir du même élevage en nombre. Les élevages devraient

commencer au moins trois semaines avant la date à laquelle on a besoin de génitrices, et ce, pour permettre leur *acclimatation* aux conditions du laboratoire et s'assurer que l'on dispose d'une réserve suffisante de néonates pour les essais. Il est souhaitable de prolonger la période d'acclimatation au-delà de trois semaines (Cowgill et coll., 1985).

On devrait établir et maintenir des élevages en nombre afin d'avoir assez de sujets pour démarrer les élevages individuels. À cette fin, on transfère des néonates dans un milieu d'élevage, à raison de 10 à 20 par litre. Comme la surpopulation est une source de stress et conduit,

en bout de ligne, à l'apparition d'*éphippies*, on a déjà recommandé des densités aussi faibles que 10 adultes par volume de 3 L (Cowgill, 1989). Des densités supérieures pourraient être acceptables dans les élevages en nombre, pourvu que l'eau soit changée et que les jeunes soient retirés fréquemment et régulièrement (p. ex. tous les jours ou tous les deux jours). Au minimum, on devrait transférer les *génitrices* dans un nouveau milieu d'élevage au moins deux fois par semaine pendant deux semaines, après quoi on élimine les adultes, puis on reprend l'élevage avec des néonates dans un milieu d'élevage frais. À chaque renouvellement, il faudrait relever et consigner le nombre de génitrices ayant survécu, éliminer leurs jeunes et jeter l'ancien milieu². Pour se prémunir contre les imprévus, il est conseillé de maintenir plusieurs élevages en nombre (p. ex. ≥ 4) dans des récipients distincts et avec des sujets d'âges différents (de 0 à 2 semaines)³. Il ne faut pas utiliser de néonates provenant d'élevages en nombre dans les essais toxicologiques.

Il faut avoir recours à des élevages individuels (issus d'une seule génitrice) afin d'obtenir les organismes d'essai. Pour démarrer les élevages individuels, on transfère de l'élevage en nombre une néonate dans chaque gobelet, bécot ou tube à essai de 30 mL (v. 2.4.2) contenant 15 mL de milieu d'élevage. On devrait transférer les génitrices dans un nouveau milieu d'élevage au moins trois fois par semaine (ordinairement, le lundi, le mercredi et le vendredi), mais préféablement tous les jours. Les jeunes issus des deux premières couvées devraient être éliminés. Ceux produits à partir de la troisième couvée peuvent être utilisés pour les essais toxicologiques, à la condition que les adultes aient au plus 14 jours (Cowgill, 1989; USEPA,

² Si le milieu d'élevage n'est pas remplacé à intervalles fréquents et réguliers et que la densité de population n'est pas réduite, on observera probablement une chute brutale de la population, la production de mâles ou la formation d'*éphippies*.

³ Le maintien de plusieurs élevages en nombre constitue une protection contre la perte accidentelle d'une population entière ou l'effondrement de la population dans un ou plusieurs récipients.

1989, 1994, 2002). Afin d'assurer un chevauchement de l'âge des élevages, il faut entreprendre de nouveaux élevages chaque semaine avec des adultes ayant produit au moins 8 jeunes dans leur troisième couvée ou dans les couvées subséquentes.

2.4.2 Installations et appareils

On doit élever les daphnies dans des installations à température contrôlée (pièce, incubateur ou bain d'eau recirculée, à température constante). La zone d'élevage devrait être bien ventilée et l'air du système d'alimentation devrait être exempt d'odeurs et de poussières. Idéalement, l'installation d'élevage devrait être isolée de celle des essais afin de réduire le risque de contamination des élevages par les substances ou matières d'essai. On devrait aussi isoler les élevages des secteurs du laboratoire servant à la préparation des solutions mères ou des solutions expérimentales, à l'entreposage des effluents ou d'autres matières ou substances d'essai et au nettoyage de l'équipement.

Les récipients et les accessoires venant en contact avec les organismes et les milieux d'élevage doivent être faits d'un matériau non toxique. Des matériaux comme le verre, l'acier inoxydable de type 316, le nylon et les plastiques à base de perfluorocarbure (p. ex. Teflon^{MC}) devraient être utilisés le plus possible pour réduire au minimum la lixiviation et la sorption (ASTM, 1989, 2006). Des matériaux ou substances tels que le cuivre, le laiton, les métaux galvanisés, le plomb et le caoutchouc naturel ne doivent pas venir en contact avec les récipients ou les milieux d'élevage, les échantillons pour essai, les récipients d'essai, l'eau de dilution ou les solutions expérimentales.

Les articles faits d'un matériau ou d'une substance autres que ceux mentionnés ci-dessus ne devraient pas être utilisés, à moins que l'on ait démontré que leur emploi n'a pas d'effet nocif sur la survie ou la reproduction de *C. dubia*. On devrait nettoyer à fond tous les récipients et accessoires d'élevage (APHA et coll., 1989, 2005; ASTM, 1989, 2006) et les rincer avec l'eau d'élevage entre les utilisations. Il faut nettoyer et

laisser tremper dans de l'acide, avant de les employer, les nouveaux béciers en verre devant servir aux élevages ou aux essais. Tous les récipients d'élevage devraient être recouverts de verre ou de Plexiglas^{MC} transparent afin d'éviter l'empoussièrement et de réduire l'évaporation au minimum.

On peut se servir de béciers en verre (de 1 ou 2 L) ou d'autres récipients appropriés (p. ex. des aquariums ou des bocaux à large ouverture) pour les élevages en nombre. Si l'on utilise des récipients en plastique rigide, il faudrait auparavant les faire tremper pendant plusieurs jours dans de l'eau non chlorée et non contaminée, puis les rincer avec le milieu d'élevage. Les béciers en verre servant aux élevages en nombre ou aux élevages individuels devraient être rincés à fond avec le *milieu d'élevage* (v. 2.4.4) avant d'être utilisés.

Pour les élevages individuels et les essais, les récipients utilisés le plus couramment sont des gobelets en plastique transparent de 30 mL (p. ex. godets pour médicaments ou godets à portion individuelle de vinaigrette), ou encore des béciers en verre borosilicaté de 30 mL; cependant, on peut utiliser des récipients plus grands ou plus petits (≥ 20 mL). On peut aussi utiliser de petits tubes à essai en verre à capuchon sertissable (p. ex. Ka-put^{MC}). Pour tenir les gobelets ou les béciers servant aux élevages ou aux essais, on peut utiliser un panneau d'isolant de Styrofoam^{MC} dans lequel on perce jusqu'à 10 rangées de 10 trous; on peut aussi utiliser d'autres supports.

2.4.3 Éclairage

Pendant l'élevage, les organismes devraient être soumis à un éclairage selon une *photopériode* correspondant à 16 ± 1 h de clarté et 8 ± 1 h d'obscurité⁴. Un éclairage fluorescent blanc froid ou une autre source d'éclairage dont la lumière devrait tendre vers l'extrémité violette du spectre

(indice de rendu des couleurs d'au moins 90) est normalement indiqué (Buikema, 1973); d'autres sources de lumière et longueurs d'onde peuvent aussi être utilisées pour des essais particuliers (ASTM, 1996). L'éclairement à la surface de l'eau devrait être de 100 à 600 *lux*.

2.4.4 Milieu d'élevage

L'eau utilisée pour l'élevage de *C. dubia* ne doit pas être contaminée; il peut s'agir d'eau souterraine ou de surface, d'eau potable municipale *déchlorée*, d'un échantillon d'eau réceptrice d'« amont » prélevé dans la masse d'eau visée par l'essai, d'eau minérale diluée (p. ex. solution de 20 % d'eau Perrier^{MC} et de 80 % d'eau *désionisée*; USEPA, 1989, 1994, 2002) ou encore d'eau *reconstituée* dont la *dureté* et le *pH* ont été rajustés (v. 2.4.8)⁵. Le choix de l'eau qui doit servir de milieu d'élevage peut dépendre de la matière d'essai (p. ex. un échantillon d'eau réceptrice) ainsi que de l'eau *témoin/de dilution*; en effet, l'eau utilisée pour l'élevage et pour les essais devrait présenter des caractéristiques identiques ou semblables (à moins que les objectifs fixés pour les essais n'obligent à procéder autrement).

Les caractéristiques de l'eau utilisée pour l'élevage des organismes (v. 2.4.1) devraient être uniformes. Cette eau devrait toujours permettre d'obtenir de bons taux de survie, de croissance et de reproduction chez les daphnies (v. 2.4.11). Un lot donné d'eau servant de milieu d'élevage (ou d'eau témoin/de dilution) ne devrait pas être conservé plus de 14 jours⁶. Le contenant devrait être gardé couvert et à l'abri de la lumière.

On peut utiliser de l'eau reconstituée lorsqu'il faut appliquer un mode opératoire exigeant une eau d'élevage, une eau témoin ou une eau de dilution standards ou lorsqu'on n'a pas accès à un approvisionnement en eau naturelle non

⁴ Une longue période de clarté (16 h) stimule la reproduction asexuée (exigée pour l'essai), alors qu'une brève période peut stimuler la reproduction sexuée (Buikema et coll., 1980).

⁵ Si l'on utilise de l'eau de surface (dont une eau réceptrice d'« amont »), il convient de la filtrer au moyen d'un tamis à mailles fines (60 μ m) afin d'éliminer les compétiteurs et prédateurs éventuels de *C. dubia*.

⁶ L'entreposage prolongé du milieu d'élevage ou de l'eau témoin/de dilution peut donner lieu à une prolifération microbienne, avec les problèmes que cela suppose.

contaminée. On a relevé certains problèmes inhérents à l'utilisation d'eau reconstituée⁷ (DeGraeve et Cooney, 1987; Keating et coll., 1989; Melville et Richert, 1989); toutefois, ces problèmes peuvent être réglés en bonne partie par l'addition de quantités adéquates d'oligo-éléments (notamment le sélénium, le zinc et la vitamine B₁₂) et par un régime alimentaire équilibré (Cooney et coll., 1988; Cowgill, 1989; Keating et coll., 1989). Lorsque de l'eau reconstituée est utilisée, il est recommandé d'ajouter 2–5 µg de sélénium et 1–2 µg de cristaux de vitamine B₁₂ à chaque litre d'eau d'élevage (Keating, 1985; ASTM, 1989, 2006; Cowgill, 1989). On trouvera en 2.4.8 des indications sur la façon de préparer une eau reconstituée d'une dureté donnée.

S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour l'élevage de *C. dubia* (et comme eau témoin/de dilution), il faut la soumettre à une déchloration extrêmement efficace, car les daphnies sont très sensibles au chlore. La teneur en chlore résiduel total recommandée pour la protection des organismes d'eau douce est d'au plus 0,002 mg/L (CCMRE, 1987). Il convient d'utiliser à cette fin des filtres au charbon actif (noir d'os), puis un rayonnement ultraviolet (Armstrong et Scott, 1974). On pourrait aussi autoclaver l'eau ou la conserver dans des réservoirs et l'aérer vigoureusement pendant plusieurs jours après la filtration au charbon.

Pour documenter la qualité de l'eau, on devrait procéder aussi souvent que nécessaire à la

surveillance et à l'évaluation de variables de la qualité du milieu d'élevage (et de l'eau témoin/de dilution), dont la dureté, l'alcalinité, le chlore résiduel (si l'on utilise de l'eau municipale), le pH, le carbone organique total, la *conductivité* spécifique, les solides en suspension, l'oxygène dissous, les gaz totaux dissous, la température, l'azote ammoniacal, les nitrites, les métaux et les pesticides. Le seuil de détection de chacune des méthodes utilisées devrait être sensiblement inférieur (p. ex. de trois à dix fois) à la concentration mesurée dans l'eau ou à la plus faible concentration ayant un effet nocif démontré sur la survie et la reproduction de *C. dubia* (ASTM, 1989, 2006).

Le milieu d'élevage ne devrait pas être sursaturé en gaz. S'il y a lieu de croire qu'il y a sursaturation (p. ex. eau froide ou tempérée, saturée en air, qui est chauffée à 25 °C dans un contenant fermé ou semi-fermé), on devrait vérifier souvent la pression totale de gaz de l'alimentation en eau (Bouck, 1982). Si la saturation en gaz dissous dépasse 100 %, il faut recourir à des mesures correctives (p. ex. utilisation de colonnes d'aération ou aération vigoureuse dans un réservoir ouvert). Il n'est pas facile d'éliminer complètement la sursaturation; si l'on sait ou présume que ce problème existe, il faudrait procéder à des vérifications fréquentes. La température de l'eau, sa teneur en oxygène dissous et son pH devraient être vérifiés dans chaque élevage, de préférence chaque jour.

2.4.5 Température

Lorsque les *C. dubia* arrivent au laboratoire, l'eau ayant servi au transport devrait être remplacée graduellement (≥ 2 jours) par de l'eau d'élevage (v. 2.4.4). Cette dernière devrait être amenée à la température souhaitée de 25 ± 1 °C à raison d'au plus 3 °C par jour. De même, si la température des élevages est maintenue à l'extérieur de la plage souhaitée, il faudrait la rajuster progressivement (≤ 3 °C par jour) pour l'amener à 25 ± 1 °C et l'y maintenir pendant au moins 2 semaines avant le début des essais. On devrait vérifier périodiquement la température de l'eau dans les récipients d'élevage et la comparer à celle de la pièce à température constante, du bain

⁷ Des chercheurs (DeGraeve et Cooney, 1987; Cooney et coll., 1988; Keating et coll., 1989; Melville et Richert, 1989) ont observé, par périodes, des taux inacceptables de survie et de reproduction chez des *C. dubia* élevées dans de l'eau reconstituée préparée selon les indications de l'USEPA (1989, 1994, 2002), que ce soit avec la formule indiquée au tableau 2 ou avec une autre formule (USEPA, 1989) prévoyant l'utilisation d'eau minérale. Dans certains cas, ces problèmes n'étaient pas attribuables à une alimentation insuffisante ou à une carence en oligo-éléments essentiels. On a avancé l'hypothèse (Cooney et coll., 1988) que la présence de contaminants inconnus dans l'eau d'appoint (distillée ou désionisée) pourrait être à l'origine des problèmes (occasionnels) inexplicables associés à l'utilisation d'eau reconstituée.

d'eau ou de l'incubateur pour s'assurer que la température d'élevage se trouve à l'intérieur de la plage souhaitée.

2.4.6 Oxygène dissous

L'eau destinée aux élevages devrait être aérée vigoureusement immédiatement avant emploi afin qu'elle soit saturée en oxygène et exempte de toute sursaturation en gaz. On devrait alors mesurer sa teneur en oxygène dissous pour confirmer qu'elle se situe à 90–100 % de la valeur de saturation. Il n'est pas nécessaire d'aérer les récipients d'élevage si l'on se conforme aux indications données en 2.4.1.

2.4.7 pH

Le pH du milieu d'élevage devrait être compris entre 6,0 et 8,5, préférablement entre 7,0 et 8,5.

2.4.8 Dureté

À la différence de certaines autres espèces de daphnies, *C. dubia* peut être élevée avec succès (conformément aux critères de santé précisés en 2.4.11) dans de l'eau douce ou dans de l'eau dure (ASTM, 1989, 2006). Néanmoins, des écarts de dureté (et d'alcalinité) prononcés entre le milieu d'élevage et l'eau témoin/de dilution pourraient provoquer un stress osmotique. Par conséquent, la dureté et l'alcalinité de l'eau servant aux élevages de *C. dubia* devraient être semblables ou identiques à celles de l'eau témoin/de dilution utilisée dans les essais⁸. Les organismes d'essai devraient être issus d'au moins deux générations de sujets élevés depuis leur naissance dans une eau dont la dureté est de ± 20 % de celle de l'eau témoin/de dilution (v. 3.4).

⁸ Le milieu d'élevage pourrait être de l'eau reconstituée provenant de la même source et préparée de la même façon que celle devant servir d'eau témoin/de dilution, ou encore de l'eau naturelle dont la dureté a été corrigée pour qu'elle se situe à ± 20 % de celle de l'eau témoin/de dilution. Tout écart supérieur de dureté (ou d'alcalinité) entre le milieu d'élevage et l'eau témoin/de dilution pourrait conduire à des résultats d'essai erronés en raison du stress osmotique imposé aux organismes. Dans la plupart des cas, on devrait corriger en même temps la dureté et l'alcalinité, car des rajustements distincts de ces deux variables sont généralement peu pratiques à opérer.

Il se pourrait que certains essais (p. ex. ceux sur des échantillons d'eau réceptrice ou ceux destinés à des comparaisons de résultats interlaboratoires) nécessitent l'utilisation d'eau reconstituée d'une dureté donnée (v. 4.1 et 5.3). La préparation de l'eau reconstituée d'une dureté et d'un pH déterminés est indiquée au tableau 2; d'autres préparations conviennent également (p. ex. ISO, 1982). On peut aussi préparer une eau adéquate à partir d'eau minérale : on obtient une eau reconstituée modérément dure de qualité acceptable en préparant un mélange constitué à 20 % d'eau Perrier^{MC} et à 80 % d'eau désionisée (USEPA, 1989, 1994, 2002). Il est également possible de rajuster à la dureté voulue l'eau non contaminée du laboratoire (eau municipale déchlorée, eau de surface ou eau souterraine) par dilution avec de l'eau distillée ou désionisée (si elle est trop dure) ou par addition d'un volume adéquat d'eau dure reconstituée ou de sels en quantités proportionnelles (si elle est trop douce).

2.4.9 Alimentation

Il faut nourrir les daphnies tous les jours pendant l'élevage (et les essais)⁹. Les aliments utilisés devraient être offerts en quantité suffisante et permettre de maintenir les organismes d'essai dans un état nutritif qui soit propice à leur croissance, à leur survie et à leur reproduction et qui soit conforme aux critères de santé énoncés en 2.4.11. Différentes combinaisons de LCT (levure, Cerophyll^{MC} et nourriture pour truites)¹⁰ et d'algues unicellulaires (le plus souvent *Pseudokirchneriella subcapitata*, auparavant

⁹ Les organismes pourraient être stressés par une alimentation moins fréquente, ce qui risquerait de se traduire par un faible nombre de jeunes, un nombre élevé de mâles ou la formation d'éphippies chez des femelles (USEPA, 1989, 1994, 2002).

¹⁰ Comme substitut de la nourriture pour truites commerciale, les chercheurs de l'Environmental Monitoring Systems Laboratory de l'USEPA, à Cincinnati, OH, recommandent d'utiliser des aliments pour poissons tropicaux de marque Tetra-min^{MC} (J.M. Lazorchak et P.A. Lewis, comm. pers., 1991).

Tableau 2. Préparation d'eau reconstituée d'une dureté donnée (USEPA, 1985a)^a

Type d'eau	Réactif ajouté ^{b, c} (mg/L)				Qualité finale de l'eau	
	NaHCO ₃	CaSO ₄ ^d	MgSO ₄	KCl	Dureté ^e	pH ^f
Très douce	12	7,5	7,5	0,5	10–13	6,4–6,8
Douce	48	30	30	2	40–48	7,2–7,6
Modérément dure	96	60	60	4	80–100	7,4–7,8
Dure	192	120	120	8	160–180	7,6–8,0
Très dure	384	240	240	16	280–320	8,0–8,4

^a Il est également possible de préparer une eau reconstituée d'une dureté donnée au moyen d'eau minérale (p. ex. eau Perrier^{MC}) diluée dans de l'eau désionisée. Ainsi, un mélange constitué à 20 % d'eau Perrier et à 80% d'eau désionisée donne une eau reconstituée modérément dure de qualité acceptable (USEPA, 1989).

^b Ajouter des produits chimiques de qualité réactif à de l'eau distillée ou désionisée. Il est recommandé d'ajouter 2–5 µg de sélénium et 1–2 µg de cristaux de vitamine B₁₂ à chaque litre d'eau. L'eau reconstituée devrait être aérée vigoureusement dans un récipient propre pendant au moins 24 h avant emploi.

^c Pour gagner du temps, on peut préparer des solutions mères de NaHCO₃, de MgSO₄ et de KCl dans de l'eau désionisée. Pour obtenir des détails à ce sujet, communiquer avec J.M. Lazorchak ou P.A. Lewis, USEPA, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Quality Assurance Research Division, 3411 Church Street, Cincinnati, OH 45244.

^d CaSO₄ · 2H₂O.

^e Exprimée en milligrammes de CaCO₃ par litre.

^f pH approximatif après aération de 24 h.

appelée *Selenastrum capricornutum*)¹¹ suffisent aux besoins des daphnies, pourvu qu'elles soient administrées tous les jours (Cooney et coll., 1988; ASTM, 1989, 2006; Cowgill, 1989; USEPA, 1989, 1994, 2002). Un régime alimentaire mixte d'algues, composé habituellement d'une algue verte (*Ankistrodesmus convolutus* ou *P. subcapitata*) et d'une diatomée d'eau douce (*Nitzschia frustulum*), semble donner des sujets en meilleure santé que les régimes alimentaires composés d'une seule espèce d'algue (Cowgill, 1989). D'autres sources

d'aliments ont aussi été utilisées avec succès (Anonyme, 1989).

L'USEPA (1989, 1994, 2002) recommande d'utiliser régulièrement le mélange de LCT et des algues pour l'alimentation de *C. dubia* afin d'assurer une bonne nutrition et l'uniformité des conditions d'élevage (et d'essai). Le mode de préparation de ces aliments est décrit à l'annexe D. Le choix définitif de la ration et du régime d'alimentation est laissé à la discrétion de chacun des laboratoires; ce choix devrait se fonder sur l'expérience de ces derniers et sur leur capacité de satisfaire aux critères de santé établis pour les organismes d'élevage (v. 2.4.11).

Si l'on a recours au régime constitué de LCT et d'algues, il faudrait prévoir 7 mL de LCT et 7 mL de concentré d'algues par litre de milieu d'élevage dans le cas des élevages en nombre, et 0,1 mL de LCT et 0,1 mL de concentré d'algues par 15 mL de milieu d'élevage dans celui des élevages individuels (USEPA, 1989, 1994, 2002). Les aliments devraient être ajoutés au milieu d'élevage frais immédiatement avant ou après le transfert des organismes. On doit combiner

¹¹ Parmi les autres algues utilisées pour la nutrition de *Ceriodaphnia*, on compte *Ankistrodesmus convolutus*, *A. falcatus*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Scenedesmus* sp. (Cooney et coll., 1988; INRE, 1988; ASTM, 1989, 2006; Cowgill, 1989). On peut se procurer des cultures d'algues auprès de laboratoires qui exécutent des essais toxicologiques en milieu aquatique, auprès de maisons commerciales de fournitures biologiques ainsi qu'auprès de la Collection de cultures de l'Université de Toronto [Département de botanique, Université de Toronto, Toronto (Ont.) M5S 1A4; téléphone : (416) 978-3641; télécopieur : (416) 978-5878. Il faut prévoir un délai de livraison d'environ une semaine et il y a des frais minimes.]

parfaitement le concentré d'algues et le mélange de LCT en les agitant ensemble avant emploi. Lorsque le mélange de LCT est congelé, les aliquotes dégelées doivent être conservées au réfrigérateur (il ne faut pas congeler le mélange de nouveau). Les portions inutilisées du mélange de LCT non congelé ou dégelé doivent être jetées après deux semaines, tandis que les portions inutilisées de concentré d'algues doivent être conservées au réfrigérateur et jetées après un mois.

2.4.10 Manipulation des organismes

La manipulation et les transferts de *C. dubia* devraient être réduits au minimum, et il faut éviter tout choc physique des récipients d'élevage. Les organismes devraient être transférés d'un récipient à un autre à l'aide d'une pipette en verre lisse. Une pipette jetable dont la pointe est coupée et polie à la flamme pour assurer une ouverture d'environ 2 mm est idéale à cette fin (USEPA, 1985a). La pointe de la pipette devrait rester sous la surface de l'eau quand on libère les daphnies.

Les organismes qu'on a échappés ou blessés ou qui ont touché des surfaces sèches en cours de manipulation doivent être éliminés. Le volume de solution transféré avec les organismes devrait être limité à ce qui est nécessaire pour faciliter le transfert.

2.4.11 Critères de santé

Les élevages individuels de *C. dubia* à utiliser dans les essais toxicologiques doivent satisfaire aux critères de santé suivants (ASTM, 1989, 2006; USEPA, 1989, 1994, 2002) :

- Le taux de mortalité moyen chez les génitrices des élevages individuels ne doit pas dépasser 20 % au cours des 7 jours précédant le démarrage de l'essai.
- Les néonates utilisées pour le démarrage d'un essai doivent provenir exclusivement des élevages individuels comptant au moins 8 jeunes issus de la troisième couvée ou d'une couvée subséquente.
- Dans les 7 jours précédant l'essai, les génitrices des élevages individuels doivent avoir produit au moins 15 jeunes chacune, en moyenne, au cours des 3 premières couvées.
- Il ne doit pas y avoir d'éphippies dans les élevages.

L'essai de sensibilité des daphnies à un *toxique de référence* (v. 4.6) fournit un autre indice de l'état de santé des élevages et permet de déterminer si ces derniers conviennent aux essais de toxicité.

Section 3

Système d'essai

3.1 Installations et appareils

L'essai peut être effectué dans un bain d'eau, une enceinte environnementale ou une installation équivalente, dotés d'une commande efficace de la température (25 ± 1 °C). Cette installation devrait être bien ventilée et être à l'abri des perturbations physiques susceptibles d'avoir une incidence sur les organismes d'essai. Elle devrait aussi être isolée de l'installation d'élevage des daphnies. Il faudrait réduire au minimum l'empoussièrement et les émanations dans les installations d'essai et d'élevage.

Aucun matériau de construction ni aucune pièce d'équipement susceptibles de venir en contact avec les solutions d'essai ou avec l'eau témoin/de dilution ne devrait contenir de substances qui pourraient être lixiviées dans les solutions d'essai ou qui pourraient accroître la sorption de la substance ou de la matière d'essai (v. 2.4.2). Le laboratoire doit être doté d'instruments de mesure des variables fondamentales de la qualité de l'eau (température, conductivité, oxygène dissous et pH) et il doit être en mesure de procéder à l'analyse rapide et précise d'autres variables tels que la dureté, l'alcalinité, la teneur en ammoniacque et en chlore résiduel.

3.2 Éclairage

Les conditions d'éclairage auxquelles on soumet les organismes devraient être les mêmes que celles définies en 2.4.3. La photopériode (16 ± 1 h de clarté et 8 ± 1 h d'obscurité) doit coïncider avec celle à laquelle les organismes ont été acclimatés.

3.3 Récipients d'essai

Les récipients d'essai les plus couramment utilisés pour l'essai décrit ici sont des gobelets en plastique ou des béchers en verre de 30 mL. On peut aussi utiliser des gobelets en plastique

transparent, des béchers en verre ou des tubes à essai en verre d'une contenance supérieure ou inférieure (≥ 20 mL). Il convient d'utiliser des récipients en verre pour les essais sur des substances chimiques (v. la section 5). Il est recommandé d'avoir recours à des supports ou à des panneaux pouvant recevoir un nombre élevé de petits récipients d'essai (p. ex. 10 rangées de 10 récipients par panneau) (v. 2.4.2). Il faudrait couvrir les récipients d'essai au moyen de plaques de verre¹².

3.4 Eau témoin/de dilution

Le choix de l'eau témoin/de dilution dépend d'un certain nombre de variables, notamment la substance ou la matière d'essai et l'objet de l'essai (v. les sections 5 à 7), la dureté de la ou des solutions à évaluer ainsi que la dureté et le type d'eau dans laquelle les organismes ont été élevés (v. 2.4.4). Par conséquent, l'eau témoin/de dilution peut être : de l'eau souterraine ou de l'eau de surface non contaminées (provenant d'un cours d'eau ou d'un lac), de l'eau municipale déchlorée provenant d'une source non contaminée¹³, de l'eau reconstituée d'un pH et d'une dureté déterminés (v. 2.4.8), un échantillon d'eau réceptrice prélevé en amont ou à proximité de la source de contamination, mais à l'abri de son influence.

Si de l'eau de surface doit servir d'eau témoin/de dilution, il faudrait la filtrer sur un filet à plancton à mailles de 60 µm pour s'assurer qu'il n'y a pas d'organismes indésirables (USEPA, 1989, 1994,

¹² Les plaques de recouvrement transparentes laissent passer la lumière jusqu'aux organismes d'essai et réduisent au minimum l'évaporation des solutions d'essai, tout en atténuant leur contamination.

¹³ Il n'est pas recommandé d'ajouter du thiosulfate ou d'autres substances chimiques à l'eau de dilution pour éliminer le chlore résiduel, car ces substances pourraient altérer la toxicité des solutions d'essai.

2002). Si l'on utilise plutôt une eau réceptrice, on devrait appliquer les conditions énoncées en 6.1 pour ce qui est du prélèvement, du transport et de l'entreposage des échantillons.

Idéalement, l'eau d'élevage et l'eau témoin/de dilution devraient être de qualité identique ou essentiellement semblable. Néanmoins, en raison de l'objet de l'essai (p. ex. évaluation de la toxicité d'eaux réceptrices) ou encore de problèmes d'ordre pratique, logistique ou financier, on pourrait être amené à choisir une eau témoin/de dilution qui diffère de l'eau

d'élevage. La dureté (ou la dureté prévue, d'après les résultats d'une analyse antérieure de la source d'eau envisagée) de l'eau qui doit servir d'eau témoin/de dilution devrait être connue avant le début de l'essai. Lorsque la dureté de l'eau témoin/de dilution diffère de plus de $\pm 20\%$ de celle de l'eau d'élevage, il faudrait démarrer de nouveaux élevages individuels avec de l'eau témoin/de dilution ou avec de l'eau reconstituée dont la dureté est rajustée à cette valeur. Il faudrait acclimater à cette eau au moins deux générations de génitrices avant l'obtention des néonates destinées aux essais (v. 2.4.8).

Section 4

Procédures d'essai universelles

Les procédures énoncées dans la présente section s'appliquent à tous les essais sur des substances chimiques et des eaux usées décrits aux sections 5, 6 et 7. Tous les aspects du système d'essai présenté à la section 3 doivent être intégrés dans les procédures d'essai universelles.

Le tableau 3 décrit, sous forme de liste de contrôle, les procédures universelles recommandées pour les essais toxicologiques à renouvellement intermittent sur trois couvées de *C. dubia* et pour ceux portant sur des types particuliers de matières ou de substances.

4.1 Préparation des solutions d'essai

Il faut nettoyer et rincer à fond tous les récipients, les dispositifs de mesure, les agitateurs et les appareils de transfert des daphnies, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Des méthodes de nettoyage appropriées ont été établies par l'USEPA (1989, 1994, 2002). L'eau témoin/de dilution devrait servir au rinçage final.

On peut préparer de l'eau reconstituée d'une dureté déterminée (v. 2.4.8) et l'utiliser comme eau témoin/de dilution. Le tableau 2 indique les types et les quantités de substances chimiques de qualité réactif qu'il faut ajouter à de l'eau distillée ou désionisée pour préparer une eau témoin/de dilution (ou un milieu d'élevage) possédant une dureté, une alcalinité et un pH donnés. Il est recommandé d'utiliser de l'eau reconstituée « modérément dure » (80–100 mg de CaCO_3 par litre) pour les essais exigeant un degré élevé de normalisation et une comparaison des résultats obtenus¹⁴. L'eau reconstituée

fraîchement préparée devrait être aérée vigoureusement dans un récipient non toxique pendant au moins 24 h avant emploi (USEPA, 1989, 1994, 2002).

Il est possible de rajuster à la dureté voulue de l'eau souterraine, de l'eau de surface naturelle ou de l'eau municipale déchlorée non contaminées et de s'en servir comme eau témoin et eau de dilution. Si ces eaux sont trop dures, on peut les diluer avec de l'eau désionisée; si elles sont trop douces, on peut ajouter des substances chimiques de qualité réactif en quantités proportionnelles (v. le tableau 2).

Les caractéristiques de l'eau témoin/de dilution utilisée tous les jours pendant la durée des essais devraient être uniformes. Cette uniformité est améliorée lorsqu'on entrepose un volume d'eau témoin/de dilution suffisant pour mener les essais à bonne fin et que l'on y prélève des aliquotes pour le renouvellement quotidien des solutions d'essai (v. 4.3). Un volume de 10 L est suffisant pour le remplacement quotidien de toutes les solutions d'essai (en supposant que l'on utilise 10 répétitions de 15 mL chacune, pour chacune des 7 à 10 concentrations d'essai plus un témoin), de même que pour toutes les analyses chimiques exigées.

L'eau témoin/de dilution doit être amenée à la température d'essai (25 ± 1 °C) avant emploi. Il faudrait éviter la sursaturation de cette eau en gaz excédentaires (v. 2.4.4). Avant d'être utilisée, l'eau témoin/de dilution devrait avoir une teneur en oxygène dissous de 90–100 % de la valeur de saturation en air. Au besoin, on devrait aérer vigoureusement le volume nécessaire d'eau témoin/de dilution (au moyen d'un jet d'air

¹⁴ L'USEPA (1989, 1994, 2002) recommande d'utiliser une eau reconstituée modérément dure (80–100 mg de CaCO_3 par litre) comme milieu d'élevage et comme eau témoin/de dilution pour les essais servant à estimer la toxicité chronique d'échantillons d'effluents. Il est souhaitable de préparer une eau reconstituée modérément dure à partir

d'eau minérale diluée (p. ex. une solution à 20 % d'eau Perrier^{MC}; USEPA, 1989, 1994, 2002) du fait que celle-ci pourrait être moins carencée en oligo-éléments essentiels.

Tableau 3. Liste de contrôle des conditions et des procédures recommandées pour les essais de toxicité chronique sur trois couvées de *Ceriodaphnia dubia*

Méthodes universelles	
Type d'essai	– à renouvellement intermittent (au moins tous les jours)
Durée de l'essai	– l'essai doit prendre fin dès que 60 % (ou plus) des organismes témoins ont produit 3 couvées; durée maximale de l'essai : 8 jours
Eau témoin/ de dilution	– eau souterraine, eau de surface ou eau municipale déchlorée non contaminées; eau reconstituée modérément dure s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; eau réceptrice d'amont pour évaluer l'effet toxique à un endroit précis; oxygène dissous : 90–100 % de la valeur de saturation au moment de l'utilisation; dureté : dans la plage de ± 20 % de celle du milieu d'élevage
Récipients d'essai	– normalement, gobelets en plastique, béciers en verre ou tubes à essais en verre de 30 mL contenant ≥ 15 mL de solution d'essai ou de solution témoin
Nombre de concentrations	– ≥ 7 , plus un ou des témoins; il est recommandé d'en prévoir davantage (c.-à-d. ≥ 10), plus un ou des témoins
Nombre de répétitions	– 10 répétitions par traitement
Organismes	– <i>C. dubia</i> néonates (âgées de moins de 24 h et toutes nées dans un même intervalle de 12 h); une néonate par récipient d'essai; ≥ 10 néonates par traitement d'essai; nombre égal de néonates pour tous les traitements
Température	– 25 ± 1 °C (moyenne et limites quotidiennes)
Oxygène dissous/ aération	– aucune aération sauf exception; oxygène dissous : 40–100 % de la valeur de saturation pendant toute la durée de l'essai
pH	– aucun rajustement si le pH de la solution d'essai est compris entre 6,5 et 8,5; un deuxième essai (à pH rajusté) pourrait s'avérer nécessaire ou pertinent si le pH de l'échantillon ou de la solution se situe hors de cette plage
Éclairage	– fluorescent « blanc froid »; 100–600 lux à la surface; 16 ± 1 h de clarté et 8 ± 1 h d'obscurité
Alimentation	– tous les jours; ajout de 0,1 mL de LCT et de 0,1 mL de suspension d'algues (ou d'autres aliments appropriés) dans chaque récipient
Mesures	– température, pH et oxygène dissous au moins au début et à la fin (avant le renouvellement des solutions) de chaque période d'exposition de 24 h, dans des concentrations représentatives; conductivité : au moins au commencement des périodes de 24 h; dureté de l'eau témoin et (au minimum) de la concentration expérimentale la plus élevée, au moins avant la mise en route de l'essai
Observations	– quotidiennement pendant la durée de l'essai : mortalité de daphnies de la première génération dans chaque solution d'essai de répétition; quotidiennement pendant la production des trois premières couvées : nombre de néonates vivantes produites dans chaque solution d'essai de répétition; dès qu'ils sont observés, éliminer tous les descendants produits au cours de la quatrième couvée ou des couvées subséquentes, sans consigner leur nombre
Paramètres	– mortalité et reproduction; dans les essais à concentrations multiples, CL_{50} plus CI_p si le taux de reproduction a baissé (v. 4.6)

Tableau 3. (suite)

Toxique de référence	– un ou plusieurs des composés suivants : chlorure de sodium, phénol ou sulfate de zinc; essai normalisé de ≤ 8 jours pour la CL_{50} et la CI_p (si le taux de reproduction a baissé) dans les 14 jours précédant le démarrage de l'essai définitif et selon les mêmes méthodes et procédures que celles appliquées pour cet essai
Validité de l'essai	– essai invalide si : le taux moyen de mortalité des organismes témoins de la première génération dépasse 20 %; au moins 60 % des organismes témoins n'ont pas produit 3 couvées en 8 jours; moins de 15 jeunes vivants, en moyenne, ont été produits dans les solutions témoins au cours des 3 premières couvées de chaque femelle ayant survécu; des éphippies sont observées à un moment ou un autre chez les organismes témoins
Substances chimiques	
Solvants	– seulement dans des circonstances spéciales; concentration maximale de 0,1 mL/L
Concentration	– mesures souhaitables au moins au début et à la fin de la période de renouvellement lors de la première et de la dernière journée de l'essai, dans les concentrations élevée, médiane et faible et dans la ou les solutions témoins
Eau témoin/ de dilution	– tel qu'indiqué et/ou selon l'objet de l'essai; eau reconstituée s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; eau réceptrice lorsqu'on veut étudier les effets toxiques locaux; sinon, eau non contaminée du laboratoire
Effluents, éluviats et lixiviats	
Échantillons exigés	– pour les essais hors site, soit 3 sous-échantillons d'un seul prélèvement, soit ≥ 3 échantillons distincts prélevés (ou préparés s'il s'agit d'un éluviat), puis manipulés de la façon indiquée en 6.1; pour les essais sur place, on prélève les échantillons quotidiennement et on les utilise dans les 24 h; volumes requis : ≥ 1 L (essai à concentration unique) ou ≥ 2 L (essai à concentrations multiples)
Transport et entreposage	– si l'échantillon est tempéré ($> 7^\circ\text{C}$), il faut le refroidir à $1-7^\circ\text{C}$ avec de la glace ordinaire (et non de la glace sèche) ou avec des sachets congelés, dès le prélèvement; transport dans l'obscurité à $1-7^\circ\text{C}$ (de préférence $4 \pm 2^\circ\text{C}$), en employant de la glace ordinaire ou des sachets congelés, au besoin; l'échantillon ne doit pas geler durant le transport ou l'entreposage; garder dans l'obscurité à $4 \pm 2^\circ\text{C}$; de préférence, utiliser dans les essais dans les 24 h suivant le prélèvement et, obligatoirement, dans les 3 jours suivant le prélèvement de l'échantillon ou l'extraction de l'éluviat
Eau témoin/ de dilution	– tel qu'indiqué et/ou selon l'objet de l'essai; eau du laboratoire, eau reconstituée ou eau réceptrice d'« amont » pour les essais menés à des fins de surveillance et de vérification de la conformité
Teneur élevée en solides	– on pourrait réaliser un deuxième essai sur un échantillon filtré afin d'évaluer les effets des solides
Eau réceptrice	
Échantillons exigés	– comme sous la rubrique « Effluents, éluviats et lixiviats »
Transport et entreposage	– comme sous la rubrique « Effluents, éluviats et lixiviats »
Eau témoin/ de dilution	– tel qu'indiqué et/ou selon l'objet de l'essai; utilisation de l'eau réceptrice d'« amont » s'il s'agit d'évaluer les effets locaux

comprimé exempt d'huile passant par des pierres de barbotage) immédiatement avant emploi, et l'on devrait vérifier la teneur en oxygène dissous afin de confirmer que l'on a atteint 90–100 % de la valeur de saturation.

Les concentrations d'essai et le nombre de solutions à préparer dépendent de l'objet de l'essai. Les essais sur des eaux usées ou des eaux réceptrices menés à des fins de surveillance ou de vérification de la conformité aux règlements peuvent, dans certains cas, n'exiger qu'une seule concentration expérimentale (p. ex. un échantillon non dilué) plus un témoin (v. les sections 6 et 7). Pour tout essai visant à estimer la CL_{50} (mortalité) ainsi que la CI_p (reproduction), il faut préparer au moins 7 concentrations plus une solution témoin (eau témoin/de dilution à 100 %) ¹⁵, mais on recommande d'en préparer un plus grand nombre (≥ 10 , plus un témoin). Les dilutions convenables peuvent suivre une progression géométrique, chaque concentration successive étant la moitié moins élevée que celle qui précède (p. ex. 100, 50, 25, 12,5, 6,3, etc.). On peut choisir les concentrations d'essai dans une autre série de dilutions convenables (p. ex. 100, 75, 56, 42, 32, 24, 18, 13, 10 et 7,5; v. la colonne 7 à l'annexe E). Si l'on observe une mortalité élevée au cours des deux premières heures de l'essai, on devrait ajouter d'autres solutions d'essai plus diluées. Il n'est pas recommandé d'utiliser couramment un facteur de dilution de 30 % (p. ex. 100, 30, 9, etc.), ce qui réduirait la précision des estimations de la toxicité; on peut cependant y avoir recours en cas de grande incertitude relativement à la plage des concentrations susceptibles d'être toxiques.

Si l'on utilise comme eau témoin/de dilution une eau différente de celle dans laquelle les organismes ont été élevés (p. ex. eau réceptrice

prélevée en amont de la zone à l'étude), il faut préparer une deuxième solution témoin en utilisant le milieu d'élevage ¹⁶. On considère généralement que l'eau réceptrice d'amont ne convient pas comme eau témoin/de dilution si elle ne permet pas de satisfaire aux critères de validité de l'essai (v. 4.4). En pareil cas, l'eau d'élevage serait normalement utilisée comme eau témoin et pour l'ensemble des dilutions (voir la note 16). Si le responsable de l'essai décide de tenter d'acclimater l'élevage à l'eau d'amont au préalable, il faudrait qu'au moins deux générations de génitrices aient été élevées dans cette eau avant les néonates utilisées dans l'essai.

Pour chaque essai définitif, la ou les solutions témoins doivent être préparées en même temps que les *traitements* expérimentaux, et le nombre de *répétitions* doit être identique. Toute eau de dilution ayant servi à préparer les concentrations d'essai doit également servir à préparer une série de solutions témoins. Chaque solution d'essai doit être bien mélangée avec une tige en verre, un agitateur en Téflon ^{MC} ou un autre instrument fait d'un matériau non toxique. La température, la teneur en oxygène dissous et le pH de chaque solution d'essai doivent être vérifiés au moment du mélange. La température de l'échantillon/des solutions doit être rajustée au besoin à la valeur acceptable pour chaque solution (25 ± 1 °C). On ne doit pas utiliser de thermoplongeur pour réchauffer les échantillons ou les solutions d'essai, car cela pourrait en altérer la composition

¹⁵ Il est recommandé d'utiliser au moins 10 concentrations expérimentales plus des solutions témoins afin de pouvoir calculer tant la CL_{50} (pour les daphnies adultes) que la CI_p de la reproduction, à l'aide d'analyses de régression (EC, 2005). Avant de passer à l'essai définitif, on peut procéder à un essai préliminaire. Un tel essai porte habituellement sur une plus vaste gamme de concentrations et dure souvent 24 h ou moins.

¹⁶ Si l'essai vise à déterminer dans quelle mesure une eau réceptrice donnée peut modifier la toxicité de la matière ou de la substance d'essai en raison de ses caractéristiques physicochimiques (p. ex. dureté, *pH*, *turbidité*, teneur en acide humique ou fulvique) et/ou de la présence d'autres contaminants, le responsable de l'essai pourrait choisir d'utiliser l'eau d'amont pour préparer les concentrations expérimentales et en tant que solution témoin parmi d'autres. Une comparaison des résultats obtenus avec cette eau par rapport à ceux obtenus avec l'eau du laboratoire pour le maintien des organismes témoins permettra de déterminer si des effets toxiques peuvent être attribuables à l'eau d'amont. Pour mieux comprendre l'influence qu'exerce chaque type d'eau témoin/de dilution sur la toxicité de la matière ou de la substance d'essai, on peut effectuer une comparaison parallèle des effets toxiques en utilisant chaque eau témoin/de dilution pour préparer une série de concentrations expérimentales.

chimique et la toxicité. On devrait procéder à l'aération de chaque solution d'essai avant de la répartir entre les *réipients de répétition seulement* si la teneur en oxygène dissous mesurée dans une ou plusieurs des solutions d'essai fraîchement préparées est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de la valeur de saturation en air. On devrait fournir l'air comprimé (exempt d'huile) par un flexible à embout jetable en verre ou en plastique (p. ex. tube capillaire ou pipette à pointe Eppendorf) percé d'un petit orifice (p. ex. 0,5 mm de diamètre intérieur). Son débit ne devrait pas excéder 100 bulles/min. L'aération préalable doit être limitée soit à 20 min, soit au temps voulu, à l'intérieur de ces 20 min, pour atteindre 40 % de la valeur de saturation en air dans la concentration d'essai la plus élevée (ou 100 % de la valeur de saturation s'il y a sursaturation). Il faut interrompre l'aération préalable au bout de 20 min, que l'on ait obtenu ou non 40 à 100 % de la valeur de saturation en air dans toutes les solutions d'essai. Chaque solution est alors répartie dans les réipients d'essai et l'essai est mis en route ou les solutions sont utilisées pour les renouvellements. Toute aération préalable doit être consignée, y compris la durée et le débit (v. section 8).

On pourrait devoir rajuster le pH de l'échantillon ou des solutions (v. 4.2.2). Il faudrait normalement utiliser à cette fin de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH) ≤ 1 N. Dans certains cas (p. ex. échantillons d'effluents fortement tamponnés), on pourrait devoir utiliser des solutions plus concentrées d'acide ou de base.

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des indications utiles pour le rajustement du pH. Il faudrait laisser se stabiliser, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes des solutions d'essai ou des échantillons dont on rajuste le pH¹⁷. Le temps nécessaire à la

stabilisation dépend du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluent, il est recommandé d'attendre de 30 à 60 min (Abernethy et Westlake, 1989). Une fois l'exposition des daphnies commencée, le pH de chacune des solutions d'essai est mesuré régulièrement (v. 4.5), mais il n'est pas rajusté.

4.2 Démarrage de l'essai

On devrait entreprendre l'essai après avoir préparé les solutions et apporté les rajustements autorisés ou nécessaires à la température, au pH et aux teneurs en oxygène dissous et en matières solides (v. 4.1 et 6.4). Si l'influence de la dureté de l'échantillon ou de la solution sur sa toxicité soulève des préoccupations, il faudrait mesurer la dureté de l'eau au moins dans la solution témoin ainsi que dans les concentrations élevée et faible. Ces mesures initiales devraient être faites sur de gros volumes de solutions préparées dans des béchers, après tout rajustement du pH et immédiatement avant le transfert des solutions dans les réipients d'essai. Sauf lors de travaux de recherche spéciaux¹⁸, il ne faudrait pas tenter de rajuster la dureté des échantillons ou des solutions d'essai.

d'une base à un échantillon non dilué d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat peut modifier grandement l'équilibre entre les formes ionisée et non ionisée de certains toxiques (p. ex. ammoniacale, acides résiniques) et détruire l'intégrité de l'échantillon pour essai.

Les essais sur des substances chimiques ou des échantillons d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat dont le pH doit être rajusté exigent habituellement des rajustements distincts de chaque solution expérimentale (y compris le témoin). Dans le cas des essais sur des échantillons d'eau réceptrice, on procède normalement au rajustement du pH d'une aliquote de l'échantillon dilué avant de préparer les concentrations expérimentales.

¹⁸ Dans des conditions données (p. ex. un second essai), on pourrait modifier la dureté de l'échantillon ou de la solution d'essai par l'addition de quantités proportionnelles de sels (v. le tableau 2), par exemple lorsque la dureté de l'échantillon ou de la solution est sensiblement inférieure à celle de l'eau d'élevage ou de l'eau témoin/de dilution et que le responsable de l'essai souhaite évaluer l'influence de cet écart sur la toxicité. La réduction de la dureté d'une solution ou d'un échantillon ne serait pas possible sans une dilution (p. ex. avec de l'eau désionisée) ou un traitement chimique; or, ni l'une ni l'autre de ces méthodes n'est acceptable.

¹⁷ Si l'on dilue la matière ou la substance d'essai et que l'on étudie la toxicité d'une ou de plusieurs dilutions chez les daphnies, il est préférable de rajuster le pH de chacune des solutions d'essai plutôt que celui de la matière ou de la substance d'essai (non diluée). L'addition d'un acide ou

Les récipients de chaque traitement, c.-à-d. les 10 répétitions d'une concentration donnée et du ou des témoins, doivent être disposés au hasard sur le plateau d'essai. Si l'on utilise une matrice, il faudrait en avoir plusieurs à sa disposition afin que les récipients de chaque traitement ne soient pas toujours placés dans le même ordre. Une fois qu'un emplacement numéroté a été attribué aux récipients de chaque traitement, on devrait ajouter un volume mesuré identique (≥ 15 mL) de solution dans chacun des 10 récipients prévus et les placer ensuite à leur emplacement désigné (même numéro) sur le plateau d'essai. On répète cette opération pour chacune des solutions d'essai.

Les daphnies néonates utilisées dans les essais doivent avoir moins de 24 h et être toutes nées dans un même intervalle de 12 h; il serait préférable qu'elles aient moins de 12 h et qu'elles soient toutes nées dans un intervalle de 6 h. Elles devraient provenir d'élevages individuels satisfaisant aux exigences énoncées en 2.4.1, de même qu'aux critères de santé indiqués en 2.4.11. Dans le cas des essais à concentrations multiples, on commence par choisir, dans un ou plusieurs plateaux d'élevage¹⁹, jusqu'à 20 gobelets ou béciers²⁰ renfermant chacun 8 jeunes ou plus. Pour la mise en route de l'essai, une néonate du premier ou des deux premiers gobelets d'élevage est transférée dans chacun des 10 récipients d'essai de la première rangée du plateau d'essai (normalement, un plateau compte 10 rangées et jusqu'à 10 colonnes de récipients d'essai). Un deuxième gobelet d'élevage ou, au besoin, deux autres

gobelets d'élevage sont choisis au hasard, et une néonate de ce ou ces gobelets est transférée dans chacun des 8 à 10 récipients d'essai (ou plus) de la deuxième rangée. On répète cette opération jusqu'à ce que chacun des 80 à 100 récipients d'essai²¹ (ou plus) contienne une néonate.

Il faut ajouter le volume approprié d'aliments (p. ex. 0,1 mL de LCT et 0,1 mL d'algues lorsqu'on applique le régime alimentaire décrit à l'annexe D) à chaque solution d'essai immédiatement avant ou après le transfert de chacun des organismes d'essai (v. 2.4.9). Lorsque les néonates prélevées dans des élevages individuels en vue d'un essai sont conservées dans des gobelets ou des béciers distincts pendant plus de 1 h avant leur transfert dans les solutions d'essai, il faudrait aussi les nourrir durant cette période de transition.

4.3 *Renouvellement des solutions*

Chacune des solutions d'essai doit être renouvelée au moins une fois par jour²². Au moment de ces renouvellements, si l'on constate qu'un organisme d'essai est sur le point de donner naissance à des jeunes, il faut lui laisser le temps qu'il lui faut pour ce faire avant de changer la solution expérimentale. Il faut aussi veiller à ne pas transférer de néonates d'une solution d'essai âgée à une solution fraîche.

Les solutions servant aux renouvellements, y compris les inoculum frais d'aliments, devraient être préparées puis ajoutées aux récipients d'un autre plateau d'essai (suivant le même ordre), conformément aux indications fournies en 4.1 et 4.2. Chacune des *daphnies de la première génération* doit être transférée dans la nouvelle

¹⁹ Un seul plateau d'élevage pourrait suffire si chaque gobelet contenait 8 néonates (ou plus) et si l'essai portait sur 7 concentrations expérimentales plus un témoin. Par contre, il faudrait peut-être 2 plateaux dont chaque gobelet contient 8 néonates (ou plus) si l'essai portait sur plus de 8 traitements. La conception des plateaux d'élevage est quelque peu arbitraire. Le nombre de rangées correspond au nombre de répétitions par concentration expérimentale (à savoir 10), tandis que le nombre de colonnes correspond au nombre de traitements (c.-à-d. au moins 7 concentrations expérimentales plus le témoin).

²⁰ Au lieu de gobelets ou de béciers placés sur des plateaux d'élevage, on peut utiliser de petits tubes à essai en verre reposant sur des supports (v. 2.4.2).

²¹ Selon la nature ou les objectifs de l'essai, il pourrait y avoir aussi peu que 20 récipients (c.-à-d. 10 récipients témoins et 10 récipients d'essai dont la concentration est identique), ou il pourrait y en avoir entre 80 et 100 ou plus, en multiples de 10 (c.-à-d. 7 à au moins 10 concentrations d'essai, plus les solutions témoins).

²² Normalement, les solutions sont renouvelées à intervalles de 24 h. Les essais sur des substances volatiles ou instables pourraient exiger un remplacement plus fréquent (p. ex. toutes les 8 ou 12 h).

solution qui lui est réservée (v. 2.4.10), et tous les jeunes vivants doivent être dénombrés puis éliminés une fois ce nombre consigné. Les néonates mortes peuvent être éliminées sans être comptées (USEPA, 1989, 1994, 2002), mais un relevé du nombre de néonates mortes ou non viables pourrait se révéler utile lors de l'*identification des agents toxiques* (Mount et Anderson-Carnahan, 1988) ou d'autres recherches. Les solutions usées devraient faire l'objet d'une analyse chimique (sous-section 4.5) avant d'être éliminées; on peut aussi les entreposer si d'autres dosages chimiques sont exigés (v. 5.4).

4.4 Conditions expérimentales

L'essai comporte le renouvellement intermittent des solutions, c.-à-d. à intervalles de 24 h ou moins pendant toute la durée de l'essai.

Les essais sont mis en route avec une seule néonate par volume de 15 mL de solution d'essai dans chacun des 10 récipients de répétition.

Les daphnies sont nourries tous les jours pendant la durée de l'essai. Le type d'aliments et la ration administrée devraient être les mêmes que ceux qui sont fournis aux élevages individuels et qui sont décrits en 2.4.9.

L'essai doit se dérouler à une température moyenne quotidienne de 25 ± 1 °C.

Normalement, on n'aère pas les solutions d'essai.

Dans chaque *répétition* et chaque traitement (y compris le témoin), toute néonate de la quatrième couvée ou de couvées subséquentes doit être exclue du nombre total de néonates produit au cours de l'essai (USEPA, 2002).

L'essai doit prendre fin lorsque 60 % ou plus des daphnies de la première génération dans les solutions témoins ont produit 3 couvées, ou au terme d'une période de 8 jours, le premier de ces deux événements prévalant²³.

²³ Dans des conditions normales, les daphnies adultes de la première génération peuvent produire 3 couvées

Deux néonates ou plus présentes une journée quelconque de l'essai dans une enceinte expérimentale constituent une couvée. Pour déterminer à quel moment mettre fin à l'essai (c.-à-d. dès qu'au moins 60 % des daphnies de la première génération dans les solutions témoins ont produit trois couvées), il faut appliquer la notation suivante aux dénombrements quotidiens : lorsqu'une néonate seulement a été observée et comptée dans une enceinte expérimentale donnée contenant l'eau témoin et qu'une néonate au moins a été observée dans la même enceinte le jour précédant ou le jour suivant, cette néonate doit faire partie du dénombrement du jour précédent ou du jour suivant²⁴.

Si, à la fin du huitième jour de l'essai, au moins 60 % des adultes de la première génération dans les solutions témoins n'ont pas produit trois couvées, l'essai doit être déclaré invalide et doit être interrompu dès lors. L'essai n'est également pas valide si, à un moment quelconque de l'essai, le taux moyen de mortalité des organismes d'essai de la première génération dans l'eau témoin dépasse 20 %. De plus, l'essai n'est pas valide si, à la fin de l'essai, la reproduction chez les témoins est, en moyenne, inférieure à 15 jeunes vivants par adulte ayant survécu lorsque 60 % ou plus des adultes ont produit leur troisième couvée²⁵. L'essai doit être interrompu

en 5 jours dans les solutions témoins, mais il leur faut parfois 8 jours.

²⁴ Une seule néonate peut être présente dans une enceinte expérimentale si la naissance d'une couvée est interrompue par inadvertance au cours du transfert quotidien de la génitrice adulte dans une solution expérimentale fraîche, ce qui provoque une coupure dans le dénombrement de la couvée entre deux journées consécutives. Ce même phénomène peut se produire si la génitrice a commencé à donner naissance à ses jeunes au moment où elle est transférée dans une solution d'essai fraîche.

²⁵ Si le taux de survie ou de reproduction des daphnies témoins est tellement bas qu'il invalide les résultats de l'essai, il faudrait vérifier le rendement de l'élevage ainsi que l'efficacité de la reproduction (sous-section 2.4.11). On devrait procéder à un examen détaillé afin de déterminer si des contaminants sont présents dans l'eau témoin/de dilution, s'il y a carence en nutriments ou si d'autres problèmes sont associés à l'élevage ou à l'essai. Cet

(et déclaré invalide) si, à un moment ou un autre, le taux moyen de mortalité des daphnies témoins de la première génération atteint 20 % ou plus ou si des éphippies sont observées dans au moins une solution témoin.

4.4.1 *Oxygène dissous*

Dans la plupart des cas, si l'on utilise une eau témoin/de dilution saturée en oxygène (v. 4.1) et que l'on renouvelle quotidiennement les solutions d'essai, la teneur en oxygène dissous de ces dernières ne s'abaissera pas au point de stresser les organismes et d'influer sur les résultats. Dans chacun des récipients d'essai, la teneur en oxygène dissous devrait se situer entre 40 et 100 % de la valeur de saturation (c.-à-d. entre 3,3 et 8,2 mg/L à 25 °C) durant l'essai (ASTM, 1989, 2006). Lorsque les substances ou matières d'essai présentent une demande en oxygène dissous considérable et que leurs concentrations sont élevées (p. ex. effluent, lixiviat ou éluent non dilués), il pourrait être nécessaire de renouveler les solutions d'essai plus souvent afin de maintenir la teneur en oxygène dissous à un niveau acceptable (≥ 40 % de la valeur de saturation). Il est aussi possible que l'objectif de l'essai exige d'inclure cette demande en oxygène dans les paramètres de mesure de la toxicité d'un échantillon, auquel cas la fréquence habituelle de renouvellement des solutions (à intervalles de 24 h) serait appliquée²⁶.

Dans certaines situations (habituellement expérimentales), le responsable de l'essai pourrait souhaiter aérer les solutions d'essai pauvres en oxygène au cours de l'essai. Il pourrait aussi

examen devrait se poursuivre jusqu'à ce que le rendement des daphnies témoins soit acceptable.

Un essai comparatif auquel ont participé 10 laboratoires a montré que la mortalité moyenne des témoins de la première génération n'atteignait que 2 %. La production moyenne globale de jeunes était de 20 par femelle, la plage des moyennes obtenues par les différents laboratoires se situant entre 13 et 31 jeunes par femelle (Anderson et Norberg-King, 1991).

²⁶ Habituellement, les solutions sont renouvelées toutes les 24 h. Les essais sur des matières ou substances volatiles ou instables pourraient exiger un renouvellement des solutions à des intervalles plus fréquents (p. ex. toutes les 8 ou 12 h).

choisir de préparer des solutions témoins additionnelles pauvres en oxygène dissous, afin d'examiner l'influence de ce paramètre sur les taux de survie et de reproduction des daphnies (ASTM, 1989, 2006). Toute aération des solutions avant l'essai (aération préalable; v. 4.1) ou au cours de celui-ci doit se faire à un débit minimal et contrôlé. On devrait fournir l'air comprimé (exempt d'huile) par un flexible à embout jetable en plastique ou en verre à petite ouverture (p. ex. tube capillaire ou pipette à pointe Eppendorf percé d'un petit orifice d'environ 0,5 mm). Le débit d'aération devrait être aussi lent que possible et ne pas excéder 100 bulles/min. Toute aération des solutions doit figurer dans le rapport d'essai, de même que le débit.

4.4.2 *pH*

Normalement, les essais toxicologiques ne devraient pas exiger le rajustement du pH. Cependant, si l'échantillon ou le sous-échantillon de la matière ou de la substance d'essai déplace le pH à l'extérieur de la plage de 6,5 à 8,5 et si l'on évalue la toxicité de substances chimiques plutôt que les effets nocifs ou l'influence du pH, on devrait au préalable rajuster le pH des solutions d'essai ou de l'échantillon ou du sous-échantillon, ou encore effectuer en parallèle un deuxième essai à pH rajusté sur une partie du même échantillon ou sous-échantillon. Pour ce deuxième essai, on peut, selon les objectifs visés, neutraliser (réglage à 7,0) le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai (v. la note 17, sous-section 4.1) ou le rajuster à moins de $\pm 0,5$ unité de pH de celui de l'eau témoin/de dilution, avant l'exposition des daphnies. Une autre méthode acceptable pour ce deuxième essai consiste à rajuster le pH de chaque solution d'essai (y compris les solutions témoins) à l'intérieur de la plage de 6,5–7,0 (si le pH de l'échantillon ou du sous-échantillon est inférieur à 6,5 ou si ces derniers ont abaissé le pH à cette valeur) ou de 8,0–8,5 (si le pH de l'échantillon ou du sous-échantillon est supérieur à 8,5 ou si ces derniers ont haussé le pH à cette valeur). On devrait normalement utiliser, pour tous les rajustements du pH, des solutions de HCl ou de NaOH 1 N ou moins. Certains échantillons (p. ex. échantillons d'effluents fortement tamponnés)

pourraient exiger des solutions plus concentrées d'acide ou de base.

Si l'objet de l'essai de toxicité est d'élucider la nature des toxiques présents dans un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice, on utilise souvent le rajustement du pH en association avec un certain nombre d'autres techniques de traitement (p. ex. oxydation, filtration, entraînement à l'air, ajout d'un agent chélateur) pour caractériser la toxicité de l'échantillon. Selon Mount et Anderson-Carnahan (1988), le rajustement du pH fait partie des neuf techniques d'identification des agents toxiques qui, lorsqu'elles sont appliquées à des échantillons aqueux présentant une toxicité aiguë, constituent pour les responsables des essais une méthode utile pour évaluer la nature physicochimique du ou des toxiques et leur sensibilité à la détoxification.

4.5 *Observations et mesures*

Il faut observer les daphnies dans chaque récipient d'essai tous les jours (à intervalles de 24 h) durant l'essai. Pour faciliter l'observation, on peut éclairer temporairement chaque récipient d'essai en le déposant sur une table lumineuse et en dirigeant la lumière vers le côté, ou en faisant appel à un autre moyen. Un fond noir est également utile et peut être combiné à un éclairage favorable si une source lumineuse est placée sur le côté et une autre en dessous.

Les solutions d'essai qui sont opaques en raison de leur couleur ou de la présence de matières en suspension devraient être transférées temporairement dans un plat peu profond (p. ex. une boîte de Petri^{MC}) en vue de faciliter l'observation de la survie des daphnies et du nombre de jeunes vivants produits. La ou les solutions témoins doivent faire l'objet d'un traitement identique. Dès que les observations sont terminées, les daphnies de la première génération (c.-à-d. celles qui ont été placées dans les solutions au commencement de l'essai) qui ont survécu devraient être transférées dans des gobelets ou des béchers de 30 mL renfermant des solutions fraîches (v. 3.3 et 4.3).

Pour chaque solution expérimentale de répétition (y compris chaque répétition témoin), il faut consigner, au moment de chaque observation, le nombre de daphnies de la première génération qui sont mortes. La mort est caractérisée par l'immobilité du corps, des appendices et du cœur, observée grâce à un stéréomicroscope à dissection ou à un autre appareil grossissant²⁷. Immédiatement après l'observation, chaque daphnie de la première génération qui est encore vivante doit être transférée dans la nouvelle solution d'essai qui lui est réservée (v. 2.4.10 et 4.3).

Pour chaque solution expérimentale de répétition (y compris chaque répétition témoin), on doit dénombrer les néonates vivantes produites au cours des trois premières couvées de chacune des daphnies de la première génération et consigner les résultats au moment de chaque observation quotidienne. Une fois dénombrées, ces néonates sont éliminées. Il faudrait aussi éliminer toutes les néonates qui sont mortes; normalement, il n'est pas nécessaire de dénombrer celles-ci²⁸.

Pour chaque répétition et chaque traitement (y compris le témoin), aucune néonate de la quatrième couvée ou de couvées subséquentes ne doit être incluse dans le nombre total de néonates qui y ont été produites au cours de l'essai (USEPA, 2002). Ces néonates doivent plutôt être éliminées et leur nombre n'est pas noté.

Il faut surveiller la température durant l'essai. Au minimum, on doit la mesurer au début et à la fin de chaque période d'exposition de 24 h (c.-à-d.

²⁷ Lorsque les substances toxiques exercent un effet narcotique, les daphnies peuvent être complètement immobiles et leur rythme cardiaque être réduit à un ou deux battements par minute; les battements du cœur constituent alors le critère déterminant de la mort.

²⁸ Des néonates partiellement ou entièrement développées pourraient naître ou pourraient mourir dans la solution d'essai au cours de l'intervalle compris entre leur naissance et leur observation. Ces organismes ne doivent pas figurer dans les dénombrements des néonates (vivantes) produites par les daphnies de la première génération au cours de l'essai (ASTM, 1989, 2006; USEPA, 1989, 1994, 2002). Cependant, ces renseignements pourraient se révéler utiles lors de l'identification des agents toxiques (Mount et Anderson-Carnahan, 1988) ou d'autres recherches.

dans les solutions fraîches et dans les solutions à éliminer), au moins dans les concentrations d'essai élevée, médiane et faible, de même que dans la ou les solutions témoins. Si la mesure se fait dans d'autres récipients que les récipients d'essai (p. ex. dans un bain d'eau, un incubateur ou une pièce à température contrôlée à proximité des récipients d'essai), il faut établir le rapport qui existe entre les valeurs consignées et la température à l'intérieur des récipients. Sont acceptables l'enregistrement continu ou la mesure quotidienne des températures minimale et maximale.

La teneur en oxygène dissous et le pH doivent être mesurés au commencement et à la fin de chaque période d'exposition de 24 h (c.-à-d. dans les solutions fraîches et dans celles à éliminer) au moins dans les concentrations d'essai élevée, médiane et faible ainsi que dans la ou les témoins. Pour des raisons de commodité, les mesures peuvent porter sur un échantillon composé des 10 solutions d'essai de répétition ou sur une répétition de chaque traitement surveillé.

La dureté de l'eau témoin/de dilution et, au minimum, de la solution d'essai présentant la plus forte concentration²⁹ devrait être mesurée avant de démarrer l'essai (v. 3.4, 4.1 et 4.2). Il pourrait aussi être utile de déterminer l'alcalinité de ces solutions.

Il est recommandé, comme moyen de vérifier les concentrations d'essai, de mesurer la conductivité de chaque solution d'essai nouvellement préparée avant de la transférer dans les récipients d'essai. Avec certaines substances ou matières d'essai³⁰, il pourrait être souhaitable de surveiller la conductivité de solutions d'essai choisies (p. ex. les concentrations élevée, médiane et faible ainsi que le témoin) au début et à la fin de leur période d'utilisation.

²⁹ Lors d'essais sur des échantillons d'effluent, de lixiviat, d'élutriat ou d'eau réceptrice, il s'agit normalement de l'échantillon non dilué.

³⁰ Des variations de la conductivité des solutions en cours d'essai sont indicatives de modifications chimiques (p. ex. ionisation, dégradation).

4.6 Paramètres et calculs

Les paramètres des essais de toxicité chronique (production de trois couvées) avec *C. dubia* se fondent sur les effets néfastes des matières ou substances d'essai sur la survie et la reproduction des daphnies. Les essais comportent deux paramètres biologiques, le premier étant une mortalité accrue des daphnies de la première génération, et le deuxième, une réduction du nombre de néonates vivantes produites par chaque daphnie de la première génération au cours de la période d'essai.

4.6.1 Essais à concentrations multiples

Dans un essai à concentrations multiples, les paramètres statistiques exigés sont : (i) la CL_{50} et ses limites de confiance à 95 %, en regard de la mortalité des daphnies de la première génération; (ii) une CI_p ^{31, 32} et ses limites de confiance à 95 %, en regard de la reproduction (à savoir le nombre de néonates vivantes produites par les daphnies de la première génération). On trouvera dans EC (2005) des explications et des conseils pour le calcul de la CL_{50} et de la CI_p , y compris des diagrammes de décision pour orienter le choix des tests statistiques pertinents. Tous les tests statistiques utilisés pour calculer les paramètres exigent que les concentrations soient exprimées sous forme de logarithmes.

³¹ La CI_p est la *concentration inhibitrice* correspondant à un *pourcentage* d'effet précisé. Le « p » représente un *pourcentage* fixe de réduction choisi par le responsable de l'essai. En règle générale, sa valeur est établie à 25 % ou à 20 %.

³² Par le passé, les responsables des essais ont souvent analysé les paramètres *sublétaux quantitatifs* associés à des essais à concentrations multiples en calculant la *concentration sans effet observé* (CSEO) et la *concentration minimale avec effet observé* (CMEO). Ces paramètres statistiques comportent des inconvénients, notamment leur dépendance à l'égard des concentrations expérimentales choisies et l'incapacité de fournir une quelconque indication de la *précision* (en d'autres termes, il est impossible d'établir la limite de confiance à 95 % ou autre) (sous-section 7.1 dans EC, 2005). Compte tenu de ces inconvénients, la CI_p constitue le paramètre statistique requis pour les données sur la reproduction obtenues dans un essai à concentrations multiples avec *C. dubia*.

Il est vivement recommandé de tracer un diagramme initial des données brutes (nombre de néonates vivantes) en fonction du logarithme de la concentration afin d'obtenir une représentation visuelle des données, d'une part, et de vérifier si les résultats obtenus sont raisonnables en regard des calculs statistiques ultérieurs, d'autre part³³. Tout écart important entre le graphique de la CI_p approximative et la CI_p calculée à l'aide d'un programme informatique doit être expliqué. Le graphique permettrait aussi de déterminer si un lien logique a été obtenu entre la concentration logarithmique (ou, dans certains cas, la concentration) et l'effet, ce qui est souhaitable dans tout essai valide (EC, 2005).

L'analyse de régression constitue la principale méthode statistique qui doit être utilisée pour calculer la CI_p , à la condition que les hypothèses ci-dessous soient satisfaites. Un certain nombre de modèles permettent d'évaluer les données sur la reproduction (à l'aide d'un test statistique *quantitatif*) au moyen d'une analyse de régression. Pour que les méthodes de régression puissent être utilisées, les données doivent satisfaire aux hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité*. Des techniques de pondération peuvent être appliquées pour réaliser

l'hypothèse d'*homoscédasticité*. Il convient aussi d'examiner les données afin de détecter les valeurs aberrantes à l'aide d'une des méthodes recommandées (v. 10.2 dans EC, 2005). Il faut tenter d'ajuster plus d'un modèle aux données et, enfin, choisir le modèle présentant le meilleur ajustement³⁴ pour calculer la CI_p et ses limites de confiance à 95 %. Pour déterminer le meilleur ajustement, il est recommandé d'utiliser la plus faible erreur quadratique moyenne résiduelle, laquelle est fournie dans le tableau ANOVA pour tous les modèles. Les paramètres calculés au moyen d'une analyse de régression doivent être encadrés par les concentrations d'essai; l'extrapolation des paramètres au-delà de la concentration expérimentale maximale ne constitue pas une pratique acceptable.

Dans les analyses de la performance de reproduction, on attribue une valeur nulle (zéro) au nombre de néonates présentes dans une répétition si la femelle adulte est morte avant de produire des jeunes. Par contre, si une femelle meurt pendant l'essai, mais après avoir produit des jeunes, le nombre de néonates doit être pris en compte dans les analyses.

Avec certaines matières ou substances d'essai très toxiques, il est possible qu'aucune néonate ne soit produite dans les 10 répétitions d'une ou de plus d'une concentration expérimentale. Dans un tel cas, les résultats obtenus dans la ou les concentrations élevées ne fournissent aucune information sur la réponse de l'organisme, et les valeurs nulles répétitives viennent contrecarrer les hypothèses de régression de la *normalité* et de l'*homoscédasticité*. En conséquence, les données

³³ Plutôt que de porter les données brutes sur un diagramme, le responsable de l'essai peut choisir de calculer le pourcentage d'inhibition associé à chaque concentration expérimentale et de porter ce pourcentage sur un diagramme; la valeur obtenue correspond à l'écart entre la réponse moyenne dans le témoin et la réponse dans le traitement (réponse moyenne dans le témoin, moins réponse moyenne dans le traitement pour le numérateur), divisé par la réponse moyenne dans le témoin (dénominateur), exprimé sous forme de pourcentage (multiplié par 100 %). La valeur obtenue pour chaque traitement est portée sur le diagramme en fonction de la concentration; voir ASTM (1991) pour de plus amples détails. L'axe des x représente la concentration logarithmique ou, dans certains cas, la concentration, selon les préférences et les objectifs du responsable de l'essai. Par exemple, l'utilisation d'une échelle logarithmique permettra d'apparier les échelles de données de régression, mais le rapport final sera peut-être plus clair avec la valeur de la concentration. Afin d'améliorer l'utilité d'un diagramme pour représenter visuellement les données, le responsable de l'essai pourrait choisir d'inclure tant la courbe de régression que les données brutes.

³⁴ Comme il est indiqué à la sous-section 6.5.8 de EC (2005), les directives actuelles d'Environnement Canada concernant les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité précisent qu'il faut utiliser les cinq modèles suivants d'analyse de régression pour établir la CI_p estimative : modèle linéaire, modèle logistique, modèle de Gompertz, modèle exponentiel et modèle d'*hormèse* (modèle logistique adapté pour tenir compte de l'effet d'hormèse à de faibles doses). Le document d'orientation précité fournit également (en 6.5.8 et à l'annexe O) les expressions mathématiques propres à chaque modèle, dont des exemples détaillés associés à un progiciel de statistiques courant.

relatives à toute concentration d'essai élevée et à toutes les répétitions dans lesquelles aucune néonate n'a été produite doivent être exclues des données utilisées pour les analyses de régression.

La possibilité de décrire mathématiquement l'*hormèse* (c.-à-d. une stimulation ou une réponse « supérieure à celle du témoin » ne se produisant que lors d'une exposition à des concentrations faibles) dans la courbe dose-réponse a été intégrée dans les modèles de régression récents pour les données quantitatives (v. 10.3 dans EC, 2005). Les données relatives à une *hormèse* peuvent être saisies directement puisque tous les points de données peuvent être pris en compte et incorporés dans le modèle; il n'y a aucun échantillonnage des points de données indiquant une réponse hormétique.

Si les données ne se prêtent pas à une analyse de régression (c.-à-d. si les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité ne peuvent être satisfaites), on peut avoir recours à une interpolation linéaire (p. ex. le programme ICPIN; v. 6.4.3 dans EC, 2005) en vue de calculer une CI_p.

Les calculs suivants doivent être effectués et consignés pour chaque concentration d'essai, y compris le ou les traitements témoins : (i) le pourcentage moyen (cumulatif) de mortalité des 10 daphnies de la première génération, à la fin de l'essai; (ii) le nombre moyen (cumulatif) (y compris son écart-type) de néonates vivantes produites par chaque daphnie de la première génération au cours de ses trois premières couvées seulement.

4.6.2 Essais à concentration unique

Dans un essai à concentration unique, la réponse des organismes à la concentration expérimentale est comparée à celle des organismes témoins³⁵. Si l'on évalue la mortalité (un paramètre *quantique*) à un seul site expérimental et à un seul site témoin, le choix des tests statistiques dépend de l'existence ou non de répétitions. Lorsque

plusieurs sites sont en cause, on conseille au responsable de l'essai de communiquer avec un statisticien. Si l'on évalue la reproduction (un paramètre *quantitatif*) à un seul site expérimental et à un seul site témoin, le test de Student³⁶ constitue habituellement la méthode qui convient pour comparer les données relatives à la concentration d'essai et à la concentration témoin. Lorsque plus d'un site expérimental est à l'étude et que le responsable de l'essai souhaite comparer de nombreux sites avec le site témoin ou comparer les sites entre eux, il peut avoir recours à divers tests ANOVA (ou équivalent non paramétrique) (sous-section 3.3 dans EC, 2005). Le choix du test à utiliser est fonction des éléments suivants :

- (i) le type de comparaison à établir (p. ex. une série complète de comparaisons par paire entre tous les sites ou une comparaison des données propres à chaque emplacement avec celles du site témoin seulement);
- (ii) un gradient dans la réponse chimique et/ou biologique est prévu;
- (iii) les hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité* sont satisfaites.

Comme dans le cas d'un essai à concentrations multiples, les autres calculs à effectuer et à consigner lorsqu'on procède à un essai à concentration unique incluent : (i) le pourcentage moyen (cumulatif) de mortalité des 10 daphnies de la première génération, à la fin de l'essai; (ii) le nombre moyen (cumulatif) (y compris son écart-type) de néonates vivantes produites par chaque daphnie de la première génération au cours de ses trois premières couvées seulement.

4.7 Toxique de référence

Il est nécessaire d'utiliser systématiquement un ou plus d'un toxique de référence pour évaluer,

³⁵ Une description du ou des types d'eau témoin/de dilution pouvant être utilisés dans un essai à concentration unique est présentée en 4.1, 5.3, 6.3 et 7.3.

³⁶ En toute rigueur, le test de Student suppose une distribution *t* et des variances égales dans les deux groupes. On trouvera à la sous-section 3.2 de EC (2005) une description des tests de distribution et de variances égales, de même que les solutions de rechange recommandées dans le cas de variances inégales.

dans des conditions normalisées, la sensibilité relative des élevages de *C. dubia*, de même que la précision et la fiabilité des données obtenues par le laboratoire à l'égard du ou des toxiques de référence choisis. Cette évaluation doit être effectuée dans les 14 jours qui précèdent ou suivent la date du début de l'essai de toxicité, ou en cours d'essai. Les stocks de génitrices utilisées pour les essais employant un toxique de référence et un échantillon pour essai devraient provenir du même élevage. L'essai toxicologique de référence doit se dérouler dans les mêmes conditions expérimentales que l'essai portant sur l'échantillon ou les échantillons pour essai.

Les critères sur lesquels se fonde le choix des toxiques de référence qui conviennent pour cet essai incluent les suivants :

- produit facilement accessible à l'état pur;
- durée de conservation stable (longue);
- forte solubilité dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minime pour l'utilisateur;
- analyse facile et précise;
- bonne courbe dose-réponse pour *C. dubia*;
- influence connue du pH sur la toxicité du produit pour *C. dubia*;
- influence connue de la dureté de l'eau sur la toxicité du produit pour *C. dubia*.

Pour cet essai, il faudrait utiliser comme toxique de référence un ou plusieurs des composés suivants de qualité réactif : chlorure de sodium, sulfate de zinc, phénol. La sensibilité des daphnies doit être évaluée au moyen d'essais normalisés, conformément aux méthodes énoncées dans le présent document, afin de déterminer la CL_{50} (survie) ainsi que la CI_p (reproduction) d'au moins une de ces substances chimiques. Pour les essais, il faudrait employer l'eau témoin/de dilution habituellement utilisée au laboratoire, ou encore de l'eau reconstituée

modérément dure s'il faut un plus haut degré de normalisation³⁷.

Dès que l'on possède suffisamment de données (EC, 1990b), il faut préparer et tenir à jour une *carte de contrôle* des valeurs de la CL_{50} et/ou de la CI_p pour chaque toxique de référence utilisé. On porte séparément sur cette carte les CL_{50} (survie) et/ou les CI_p (reproduction) successives, puis on détermine si les résultats se trouvent à ± 2 ET des valeurs respectives obtenues dans des essais antérieurs. Pour chaque CL_{50} et/ou CI_p , on calcule de nouveau la *moyenne géométrique* ainsi que ses *limites de contrôle* supérieure et inférieure respectives (± 2 ET, calculé en fonction des données logarithmiques) jusqu'à ce que la statistique se stabilise (USEPA, 1989, 1994, 2002).

Le logarithme de la concentration (c.-à-d. le logarithme de la CL_{50} et/ou de la CI_p) doit être utilisé dans tous les calculs de la moyenne et de l'écart-type, de même que dans toutes les méthodes de présentation graphique. On continue ainsi d'adhérer à l'hypothèse selon laquelle on a estimé chaque paramètre d'après le logarithme de la concentration. On peut construire la carte de contrôle en reportant les valeurs logarithmiques de la moyenne et de ± 2 ET sur papier graphique ordinaire ou en reportant les valeurs arithmétiques sur l'échelle logarithmique de papier semi-logarithmique. Si l'on devait montrer catégoriquement que les CL_{50} ou les CI_p n'obéissent pas à la loi log-normale, la moyenne arithmétique et l'écart-type pourraient se révéler plus indiqués.

³⁷ On devrait utiliser de l'eau reconstituée modérément dure (v. le tableau 2) si l'on souhaite atteindre un haut degré de normalisation, particulièrement lorsqu'on veut faire des comparaisons avec les résultats obtenus dans d'autres laboratoires (USEPA, 1989, 1994, 2002). Le laboratoire qui procède à l'essai pourrait choisir d'utiliser une autre source d'approvisionnement en eau (p. ex. eau souterraine ou eau de surface non contaminées) comme eau témoin/de dilution lors des essais courants employant des toxiques de référence. Cette façon de procéder est satisfaisante pourvu que des essais périodiques (p. ex. trimestriels) soient réalisés avec de l'eau reconstituée modérément dure.

Si une CI_p ou une CL_{50} données se trouvaient à l'extérieur des limites de contrôle, la sensibilité des organismes d'essai ainsi que le rendement et la précision de l'essai seraient suspects. Comme le phénomène pourrait se produire 5 % du temps par le seul effet du hasard, une CI_p ou une CL_{50} aberrantes ne sont pas nécessairement le signe que la sensibilité des organismes d'essai est anormale ou que les données toxicologiques ne sont pas suffisamment précises. Ce serait plutôt un avertissement que tel pourrait être le cas.

On devrait procéder à une vérification méticuleuse de l'état de santé des élevages (v. 2.4.11) et de toutes les conditions d'élevage et d'essai. Selon les résultats de cette vérification, il pourrait être nécessaire de répéter l'*essai toxicologique de référence*, d'obtenir de nouveaux stocks de génitrices et/ou d'établir de nouveaux élevages avant d'entreprendre d'autres essais toxicologiques avec *C. dubia*.

Même si un laboratoire utilise des limites de contrôle, cela ne signifie pas nécessairement qu'il obtient des résultats constants. Dans le cas d'un laboratoire qui produirait des données extrêmement variables en regard d'un toxique de référence, les limites de contrôle seraient très étendues; un nouveau point de donnée pourrait s'y trouver, tout en représentant une variation indésirable des résultats des essais. Pour obtenir des indications sur la variation raisonnable associée aux limites de contrôle pour une carte de contrôle, prière de consulter la sous-section 2.8.1 et l'annexe F de EC (2005).

Les *solutions mères* de phénol et de chlorure de sodium devraient être préparées le jour même où elles sont utilisées. Les concentrations de chlorure de sodium devraient être exprimées sous forme de masse de sel total (NaCl) dans l'eau (g/L). On devrait utiliser du sulfate de zinc (généralement de formule $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ et d'une masse moléculaire égale à 4,398 fois celle du zinc) pour la préparation des solutions mères de zinc, qui devraient être acides (pH de 3 à 4). Ces solutions peuvent être utilisées dès leur

préparation ou être conservées dans l'obscurité à 4 ± 2 °C pendant plusieurs semaines avant emploi. La concentration de zinc devrait être exprimée en milligrammes de Zn^{++} par litre.

On devrait doser, à l'aide des méthodes pertinentes (p. ex. APHA et coll., 1989, 2005), le toxique de référence dans toutes les solutions mères. Au cours de la préparation des solutions d'essai, il faudrait prélever des aliquotes au moins dans la solution témoin et dans les concentrations élevée, médiane et faible et les analyser directement ou les entreposer pour analyse ultérieure, au cas où la CI_p serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si l'on entrepose les aliquotes pour usage ultérieur, il faut les conserver dans l'obscurité à 4 ± 2 °C. Dans le cas des solutions de zinc, un agent conservateur devrait être ajouté avant l'entreposage (APHA et coll., 1989, 2005). On devrait analyser les aliquotes entreposées le plus tôt possible après la fin de l'essai toxicologique. Il est souhaitable de doser les mêmes solutions à la fin de l'essai, après avoir terminé les observations de variables biologiques. Les calculs de la CI_p devraient se fonder sur la moyenne géométrique des concentrations mesurées, si elles sont notablement différentes (c.-à-d. ≥ 20 %) des concentrations nominales et si la précision des analyses chimiques est fiable.

4.8 Considérations d'ordre juridique

Il faut veiller à l'admissibilité, devant un tribunal, des échantillons prélevés et analysés dans le dessein d'engager des poursuites. À cette fin, les échantillons doivent être représentatifs de la matière ou de la substance échantillonnée, ne pas être contaminés par des substances ou matières étrangères et être identifiables quant à la date, à l'heure et au lieu du prélèvement; il faut aussi que leur chaîne de conservation soit clairement documentée et qu'ils aient été analysés le plus tôt possible après le prélèvement. Les responsables des essais et de la transmission des résultats doivent assurer la continuité de la preuve (McCaffrey, 1979) et l'intégrité des résultats.

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité de substances chimiques

La présente section renferme des instructions particulières relatives aux essais sur des substances ou produits chimiques, qui s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

5.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons

On devrait se renseigner sur les propriétés de la substance d'essai, notamment sa solubilité dans l'eau, sa pression de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation, son coefficient de partage n-octanol/eau et sa biodégradabilité. Il convient aussi de consulter, si elles existent, la ou les fiches signalétiques de chaque substance d'essai. Lorsque la solubilité dans l'eau est incertaine ou problématique, on devrait obtenir et consigner les modes opératoires acceptables ayant servi à la préparation de solutions aqueuses de la ou des substances. On devrait recueillir et consigner d'autres renseignements tels que les formules développées, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés et des additifs importants, les précautions associées à la manipulation et les estimations de la toxicité pour les humains³⁸. On devrait également disposer d'une méthode acceptable de dosage du produit dans l'eau, aux concentrations prévues pour l'essai, de même que de données sur sa précision et son exactitude.

Pour déterminer à l'avance quelles concentrations conviennent aux essais de toxicité chronique, il

est utile d'avoir une estimation de la plus faible concentration à laquelle la ou les substances d'essai exercent un effet *léthal* aigu sur *C. dubia*. Les résultats d'un essai *sans renouvellement des solutions* visant à mesurer la CL₅₀ 48 h (v. 4.6 et l'annexe F), mené à 25 ± 1 °C avec l'eau témoin/de dilution devant servir à l'essai de toxicité chronique, fourniront ce renseignement. On devrait utiliser des daphnies néonates, élevées dans des conditions semblables ou identiques à celles appliquées aux organismes qui seront utilisés pour l'essai de toxicité chronique, pour mesurer la létalité aiguë (après 48 h) de la substance d'essai. Les autres conditions et méthodes d'essai devraient se rapprocher le plus possible de celles retenues pour l'essai de toxicité chronique.

Les contenants de produits chimiques doivent être scellés et codés ou étiquetés dès leur réception (p. ex. le nom du produit et du fournisseur et la date de réception doivent figurer sur l'étiquette). Les conditions d'entreposage (p. ex. température, protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. Il faudrait suivre les modes opératoires normalisés pour manipuler et entreposer le produit.

5.2 Préparation des solutions d'essai

On peut préparer les solutions expérimentales de la substance chimique en ajoutant des quantités prépesées (à l'aide d'une balance de précision) de celle-ci dans l'eau témoin/de dilution de manière à obtenir les teneurs nominales qui serviront à l'essai³⁹, ou en ajoutant à la substance des volumes déterminés d'une solution mère. Dans le

³⁸ La connaissance des propriétés de la substance chimique facilite la détermination des précautions à prendre et des exigences en matière de manipulation et d'essais (p. ex. une bonne ventilation des lieux ou la nécessité d'utiliser un solvant). L'information concernant la solubilité et la stabilité de la substance chimique dans l'eau douce est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

³⁹ Normalement, cette méthode est réservée à la préparation de solutions d'essai à forte concentration ou en grand volume. Dans les autres cas, on peut obtenir une précision supérieure en préparant une solution mère.

second cas, la concentration et la stabilité de la ou des substances d'essai dans la solution mère devraient être déterminées avant le début de l'essai. On devrait protéger de la lumière les solutions mères susceptibles de photolyse. Les solutions mères instables doivent être préparées chaque jour ou aussi souvent qu'il est nécessaire afin de maintenir les concentrations pour chaque renouvellement des solutions expérimentales.

On devrait préparer les solutions mères en dissolvant la substance chimique dans l'eau témoin/de dilution. Dans le cas des substances peu solubles dans l'eau, on peut préparer les solutions mères à l'aide de la technique de la colonne génératrice (Billington et coll., 1988; Shiu et coll., 1988) ou, ce qui est moins souhaitable, par dispersion ultrasonique⁴⁰. On ne devrait pas utiliser de solvants organiques, d'*émulsifiants* ou de *dispersants* pour accroître la solubilité du produit, sauf lorsque ces substances risquent d'entrer dans la composition normale de la préparation commerciale du produit. Dans un tel cas, il faut préparer une solution témoin supplémentaire renfermant la même concentration d'agent solubilisant que la solution la plus concentrée de la substance chimique d'essai. On devrait utiliser parcimonieusement les agents solubilisants sans jamais excéder la concentration de 0,1 mL/L dans les solutions d'essai. Lorsqu'on utilise des solvants, ceux dont l'emploi est à privilégier (USEPA, 1985b; ASTM, 1989, 2006) sont le triéthylèneglycol, la diméthylformamide, le méthanol, l'éthanol et l'acétone.

⁴⁰ La dispersion ultrasonique n'est pas recommandée, les ultrasons pouvant disperser une fraction de la substance chimique toxique sous forme d'émulsion ou de fines gouttelettes qui pourraient être absorbées sélectivement par les daphnies, des organismes filtreurs. En outre, cette technique peut conduire à des variations de la biodisponibilité de la substance chimique d'essai et, par conséquent, de sa toxicité, en raison de la production de gouttelettes dont la taille et l'uniformité varient. Des gouttelettes pourraient aussi migrer vers la surface au cours de l'essai.

5.3 Eau témoin/de dilution

Pour l'évaluation normale, au laboratoire, de la toxicité d'une substance chimique, l'eau témoin/de dilution peut être de l'eau reconstituée ou l'eau du laboratoire (eau souterraine ou eau de surface non contaminées ou eau municipale déchlorée) qui est utilisée de façon courante pour l'élevage de *C. dubia*. Si l'on devait évaluer l'effet toxique d'une substance chimique sur une eau réceptrice donnée, on pourrait prélever un ou des échantillons de cette eau à un endroit où la substance n'exerce aucune influence et les utiliser comme eau témoin/de dilution^{41, 42}. À titre

⁴¹ Les contaminants déjà présents dans l'eau réceptrice pourraient modifier la toxicité de la substance à l'étude. Dans ce cas, de l'eau de dilution non contaminée (eau naturelle, eau reconstituée ou eau municipale déchlorée) donnerait une estimation plus précise de la toxicité de la ou des substances d'essai, mais pas nécessairement de son incidence totale sur le site visé.

Si l'essai vise à déterminer l'effet d'un produit chimique particulier sur une eau réceptrice donnée, il importe peu que cette dernière modifie la toxicité de l'échantillon, notamment par la présence de matières humiques ou de substances toxiques additionnelles. Si un surcroît de toxicité est imputable à l'eau réceptrice, il convient d'inclure dans l'essai, à tout le moins, un deuxième témoin de l'eau d'élevage et, au plus, une autre série de concentrations utilisant ce milieu d'élevage comme eau de dilution.

Si l'essai vise à déterminer dans quelle mesure une eau réceptrice donnée peut modifier la toxicité de la matière ou de la substance d'essai en raison de ses caractéristiques physicochimiques (p. ex. dureté, pH, turbidité, teneur en acide humique ou en acide fulvique) et/ou de la présence d'autres contaminants, le responsable de l'essai pourrait choisir d'utiliser l'eau d'amont pour préparer les concentrations expérimentales et en tant que solution témoin parmi d'autres. Une comparaison des résultats obtenus avec cette eau par rapport à ceux obtenus avec l'eau du laboratoire pour le maintien des organismes témoins permettra de déterminer si des effets toxiques peuvent être attribuables à l'eau d'amont. Pour mieux comprendre l'influence qu'exerce chaque type d'eau témoin/de dilution sur la toxicité de la matière ou de la substance d'essai, on peut effectuer une comparaison parallèle des effets toxiques en utilisant chaque eau témoin/de dilution pour préparer une série de concentrations expérimentales.

⁴² Une solution de rechange (ou un compromis) à l'utilisation d'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution consiste à rajuster le pH et la dureté de l'eau du laboratoire

d'exemple d'une telle situation, mentionnons l'évaluation de l'effet toxique d'un déversement de produits chimiques ou de la pulvérisation délibérée d'une substance chimique (p. ex. un pesticide) sur une masse d'eau donnée. On peut aussi utiliser à cette fin l'eau naturelle du laboratoire ou de l'eau reconstituée, notamment lorsque le prélèvement et l'utilisation d'eau réceptrice sont impraticables. L'eau naturelle du laboratoire pourrait aussi convenir en d'autres circonstances (p. ex. évaluation préliminaire ou intralaboratoire de la toxicité d'un produit chimique).

Lorsqu'un échantillon d'eau réceptrice d'amont doit servir d'eau de dilution et d'eau témoin, on doit préparer une solution témoin distincte avec l'eau d'élevage (v. 2.4.4 et 4.1). Les taux de survie et de reproduction de *C. dubia* dans 10 solutions de répétition du milieu d'élevage doivent être comparés à ceux des organismes d'essai dans 10 solutions d'eau réceptrice de répétition⁴³. L'eau réceptrice d'amont serait normalement considérée impropre comme eau témoin/de dilution si la mortalité des daphnies de la première génération était supérieure à 20 % ou que moins de 15 néonates par adulte ayant survécu étaient produites au cours des 3 premières couvées dans les conditions d'essai (v. 4.4) faisant appel à cette eau. Les conditions d'essai et les méthodes d'évaluation de chaque solution témoin devraient être identiques et conformes à ce que prévoit la section 4.

Lorsqu'un degré poussé de normalisation est exigé pour les essais (p. ex. lorsqu'il faut déterminer la toxicité d'une substance chimique dans plusieurs installations d'essai et comparer les valeurs obtenues), il faudrait utiliser de l'eau reconstituée d'une dureté déterminée pour toutes

(ou d'une eau reconstituée) pour qu'ils correspondent à ceux de l'eau réceptrice. Selon le cas, le rajustement peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées à un moment particulier.

⁴³ Une comparaison des taux de survie et de reproduction des daphnies dans l'eau d'élevage et dans un échantillon d'eau réceptrice prélevé en amont pourrait mettre en évidence des effets toxiques attribuables aux contaminants présents dans l'eau d'amont.

les dilutions et comme eau témoin⁴⁴. Il est recommandé d'utiliser à cette fin une eau modérément dure (80–100 mg/L) (v. 4.1, dont la note 14). S'il est prévu que la dureté ou d'autres caractéristiques de l'eau de dilution influenceront sur la toxicité de la substance d'essai et que l'objet de l'étude est d'évaluer cette influence, on peut mener une série d'essais avec différentes eaux reconstituées (v. tableau 2) et/ou naturelles.

5.4 Observations et mesures au cours de l'essai

Outre les observations relatives à la toxicité exposées en 4.5, certaines autres observations et mesures doivent être effectuées au cours des essais sur des substances chimiques.

Pendant la préparation des solutions et à chaque moment prescrit d'observation au cours de l'essai, on devrait examiner chaque solution afin de vérifier la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex. odeur, couleur, opacité, *précipitation* ou *floculation*). On devrait consigner les observations.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les solutions d'essai afin de doser les produits chimiques auxquels *C. dubia* est exposée⁴⁵. Pour ce faire, on devrait prélever des aliquotes-

⁴⁴ Comme la dureté, le pH et d'autres caractéristiques de l'eau témoin/de dilution peuvent influencer grandement sur la toxicité de la ou des substances d'essai, l'emploi d'une eau reconstituée standard [c.-à-d. une eau modérément dure (80–100 mg de CaCO₃ par litre)] pourrait permettre d'obtenir des résultats véritablement comparables à ceux d'autres laboratoires.

⁴⁵ Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites analytiques, des coûts à engager ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant la stabilité du produit chimique en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai. Les analyses chimiques sont particulièrement conseillées si (USEPA, 1985b) : la substance d'essai précipite ou est volatile ou insoluble; on sait que cette substance est absorbée par les matériaux de fabrication des récipients d'essai; les solutions d'essai sont aérées. Dans certains cas (p. ex. l'essai de pesticides en vue de leur homologation), la mesure des concentrations de produits chimiques dans les solutions d'essai pourrait être exigée.

échantillons dans les concentrations élevée, médiane et faible, de même que dans le ou les témoins. À tout le moins, il faudrait analyser séparément des échantillons prélevés au commencement et à la fin de la période de renouvellement, la première et la dernière journée de l'essai (ASTM, 1989, 2006). Pour obtenir des échantillons des solutions d'essai usées, il faudrait regrouper les répétitions de chaque traitement.

On devrait conserver, entreposer et analyser tous les échantillons selon des méthodes éprouvées, en utilisant des seuils acceptables de détection pour le dosage de la substance particulière en solution aqueuse. Les résultats toxicologiques de tout essai dans lequel on mesure les concentrations devraient être calculés et exprimés en fonction de ces concentrations mesurées, à moins que l'on ait de bonnes raisons de croire que les dosages

n'étaient pas précis. Au cours des calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la moyenne géométrique de la concentration mesurée à laquelle les organismes sont exposés.

5.5 Paramètres et calculs

La CL_{50} à la fin de l'essai et la CI_p de la performance de reproduction constituent habituellement les paramètres des essais sur des substances chimiques (v. 4.6).

Si un témoin contenant le solvant est utilisé, l'essai est rendu invalide si la mortalité dans ce témoin (ou dans l'eau témoin non traitée) est supérieure à 20 % ou si le taux de reproduction des néonates dans l'un ou l'autre témoin est inférieur, en moyenne, à 15 jeunes vivants par adulte ayant survécu, au cours des 3 premières couvées (v. 4.4).

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat

La présente section renferme des instructions particulières sur le prélèvement et la préparation d'échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat et sur leur emploi dans les essais. Ces instructions s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

6.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons

Les contenants utilisés pour le transport et l'entreposage des échantillons ou sous-échantillons d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat doivent être fabriqués d'un matériau non toxique. Sont recommandés les contenants souples en polyéthylène ou en polypropylène servant au transport de l'eau potable (p. ex. Reliance^{MC}). Leur volume peut se contracter pour s'adapter à l'intérieur d'une glacière pour le transport, et le volume d'air intérieur peut être maintenu au minimum lorsqu'on y prélève des fractions de l'échantillon au laboratoire en vue d'essais toxicologiques ou d'analyses chimiques. Les contenants doivent être soit neufs, soit nettoyés à fond et rincés à l'eau non contaminée. Il faudrait aussi les rincer avec l'échantillon à prélever et les remplir complètement de façon à supprimer le volume d'air libre.

La plupart des essais sur un effluent, un lixiviat ou un élutriat sont réalisés « hors site » dans des conditions contrôlées de laboratoire. Chaque essai hors site doit être exécuté suivant l'une des deux méthodes et approches suivantes :

- 1) On peut utiliser un seul échantillon tout au long de l'essai, à la condition, toutefois, de le répartir dans trois contenants (c.-à-d. trois sous-échantillons) dès son prélèvement ou (s'il s'agit d'un élutriat) sa préparation⁴⁶.

- 2) Si l'on sait ou prévoit que la toxicité de l'eau usée évoluera notablement au cours des 7 à 10 jours d'entreposage qui précèdent l'utilisation de cette eau dans l'essai, on doit prélever des échantillons frais (ou préparer des élutriats frais) en au moins trois occasions distinctes, à intervalles de 2 ou 3 jours ou moins⁴⁷.

Lorsque l'essai se déroule sur place dans des conditions contrôlées (p. ex. dans un laboratoire mobile ou industriel), il faudrait prélever les échantillons tous les jours et les utiliser dans les 24 h pour le renouvellement quotidien de chaque solution d'essai (USEPA, 1989, 1994, 2002).

Un échantillon de 2 L suffit pour exécuter hors site un essai à concentrations multiples et pour les analyses courantes des échantillons. Il en faut moins pour les essais à concentration unique (v. 4.6). Dès le prélèvement, il faut remplir, fermer hermétiquement et étiqueter ou coder chaque contenant. On devrait indiquer sur l'étiquette au moins le type d'échantillon, son origine, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom de la ou des personnes ayant procédé au prélèvement. On ne devrait pas soumettre à des essais les échantillons arrivant au laboratoire

le renouvellement des solutions les jours 1 et 2, le deuxième pour le renouvellement les jours 3 et 4, le troisième pour le renouvellement les jours 5, 6 et 7.

⁴⁷ Si 3 échantillons sont prélevés à 2 ou 3 jours d'intervalle (p. ex. le lundi, le mercredi et le vendredi), on doit utiliser le premier au début de l'essai (jour 0) et pour le renouvellement des solutions les jours 1 et 2, le deuxième pour le renouvellement les jours 3 et 4, le troisième pour le renouvellement les jours 5, 6 et 7. On pourrait prélever quotidiennement pendant 7 jours consécutifs des échantillons d'eaux usées dont on sait ou prévoit qu'elles seront particulièrement instables si elles doivent être analysées hors site, et utiliser chaque échantillon pendant un seul jour d'essai, dans l'ordre dans lequel il a été prélevé.

⁴⁶ Si l'on privilégie cette méthode, on doit utiliser le premier sous-échantillon au début de l'essai (jour 0) et pour

non étiquetés ou non codés, ni utiliser pour les essais les échantillons parvenant au laboratoire dans des contenants partiellement remplis ou non hermétiquement fermés, parce que les toxiques volatils peuvent passer dans le volume d'air. Cependant, s'il sait que la volatilité ne fait pas problème, le responsable de l'essai peut, à son gré, soumettre ces échantillons à des essais.

L'essai sur des échantillons d'effluent et de lixiviat devrait débuter le plus tôt possible après le prélèvement. Dans un essai donné, il faudrait utiliser un échantillon dans les 24 h suivant le prélèvement, si possible, et pas plus de 3 jours après. Les échantillons de sédiment, de sol ou d'une autre matière solide prélevés en vue de l'extraction de l'élutriat en milieu aqueux puis d'un essai sur l'élutriat devraient être soumis à l'essai le plus tôt possible et pas plus de 10 jours après leur réception. Les essais sur des élutriats doivent débuter dans les 3 jours suivant leur préparation ou dans les délais indiqués dans un règlement ou un protocole.

On doit s'efforcer de garder les échantillons d'effluent ou de lixiviat au frais ($1-7^{\circ}\text{C}$, de préférence $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durant le transport. Dès le prélèvement, il faut refroidir à $1-7^{\circ}\text{C}$ les échantillons tempérés ($>7^{\circ}\text{C}$), à l'aide de glace ordinaire (et non de glace sèche) ou de sachets réfrigérants. Au besoin, on doit ajouter dans le contenant de transport des quantités généreuses de glace, de sachets réfrigérants ou d'autres moyens de réfrigération, afin de maintenir la température de l'échantillon dans la plage de $1-7^{\circ}\text{C}$ durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport ou l'entreposage.

Il faut mesurer et noter la température de l'échantillon ou, le cas échéant, de l'un des sous-échantillons (on n'ouvre pas les autres et on les laisse fermés hermétiquement) dès leur arrivée au laboratoire. On peut amener à 25°C , immédiatement ou pendant la nuit, une aliquote d'effluent ou de lixiviat dont on a besoin et l'utiliser dans l'essai. On doit garder dans l'obscurité le reste de l'échantillon ou des sous-échantillons dont on pourra avoir besoin pour le

renouvellement des solutions, dans des contenants fermés hermétiquement, sans espace libre, à $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Sauf indication contraire, la température pendant le transport et l'entreposage des élutriats ainsi que des échantillons destinés à l'extraction en milieu aqueux et aux essais ultérieurs sur élutriat devrait être conforme aux indications ci-dessus.

6.2 Préparation des solutions d'essai

Il faut agiter vigoureusement, juste avant de le vider, le contenant dans lequel l'échantillon ou le sous-échantillon ont été prélevés pour assurer la remise en suspension des matières décantables. La teneur en oxygène dissous et le pH de chaque échantillon ou sous-échantillon doivent être mesurés juste avant emploi. Au besoin, il faudrait procéder à l'aération préalable de chaque solution d'essai (v. 4.1) avant de répartir les aliquotes dans les enceintes expérimentales de répétition.

Normalement, il n'est ni nécessaire ni recommandé de filtrer les échantillons ou les sous-échantillons. Cependant, s'ils renferment des organismes qui pourraient être confondus avec les organismes d'essai, attaquer ceux-ci ou leur faire concurrence pour la nourriture, les échantillons ou sous-échantillons doivent être passés sur un tamis à mailles de $60\text{ }\mu\text{m}$ avant emploi (USEPA, 1989, 1994, 2002). Si l'on s'inquiète de l'effet de la filtration sur la toxicité de l'échantillon⁴⁸, on devrait effectuer un deuxième essai (simultané) sur des portions de l'échantillon non filtré.

6.3 Eau témoin/de dilution

Pour les essais réalisés sur des échantillons d'effluent ou de lixiviat à des fins de surveillance et de *conformité* aux règlements, on devrait utiliser comme eau témoin/de dilution l'eau naturelle ou reconstituée dans laquelle les

⁴⁸ La filtration d'un échantillon pourrait éliminer les matières décantables ou en suspension qui sont représentatives de la matière d'essai et qui pourraient modifier sa toxicité en regard des organismes d'essai.

daphnies sont élevées, ou encore un échantillon d'eau réceptrice^{49, 50}. Étant donné que les résultats pourraient varier selon la source d'eau employée, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce choix. Il faudrait également tenir compte des difficultés et des coûts liés au prélèvement et au transport d'échantillons d'eau réceptrice devant servir d'eau témoin/de dilution.

Il pourrait être souhaitable d'utiliser de l'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution lorsqu'on doit obtenir, pour un site donné, des

⁴⁹ Les contaminants déjà présents dans l'eau réceptrice pourraient modifier la toxicité de l'eau usée à l'étude. Dans ce cas, de l'eau de dilution non contaminée (eau naturelle, eau reconstituée ou eau municipale déchlorée) donnerait une estimation plus précise de la toxicité de la matière d'essai, mais pas nécessairement de son incidence totale sur le site visé.

Si l'essai vise à déterminer l'effet d'une eau usée donnée sur une eau réceptrice particulière, il importe peu que cette dernière modifie la toxicité de l'échantillon, notamment par la présence de matières humiques ou de substances toxiques additionnelles. Si un surcroît de toxicité est imputable à l'eau réceptrice, il convient d'inclure dans l'essai, à tout le moins, un deuxième témoin de l'eau d'élevage et, au plus, une autre série de concentrations utilisant ce milieu d'élevage comme eau de dilution.

Si l'essai vise à déterminer dans quelle mesure une eau réceptrice donnée peut modifier la toxicité de la matière d'essai en raison de ses caractéristiques physicochimiques (p. ex. dureté, pH, turbidité, teneur en acide humique ou en acide fulvique) et/ou de la présence d'autres contaminants, le responsable de l'essai pourrait choisir d'utiliser l'eau d'amont pour préparer les concentrations expérimentales et en tant que solution témoin parmi d'autres. Une comparaison des résultats obtenus avec cette eau par rapport à ceux obtenus avec l'eau du laboratoire pour le maintien des organismes témoins permettra de déterminer si des effets toxiques peuvent être attribuables à l'eau d'amont. Pour mieux comprendre l'influence qu'exerce chaque type d'eau témoin/de dilution sur la toxicité de la matière ou de la substance d'essai, on peut effectuer une comparaison parallèle des effets toxiques en utilisant chaque eau témoin/de dilution pour préparer une série de concentrations expérimentales.

⁵⁰ Une solution de rechange (ou un compromis) à l'utilisation d'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution consiste à rajuster le pH et la dureté de l'eau du laboratoire (ou d'une eau reconstituée) pour qu'ils correspondent à ceux de l'eau réceptrice. Selon le cas, le rajustement peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées à un moment particulier.

renseignements sur l'effet toxique éventuel d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un éluviat sur une eau réceptrice donnée^{49, 50}. Un exemple important d'une telle situation serait la détermination de l'effet *subléthal* d'une substance ou d'une matière à la périphérie de la zone de mélange, conformément aux exigences réglementaires visant un site donné. Pour le prélèvement, le transport et l'entreposage de ces échantillons d'eau réceptrice, on devrait se plier aux conditions décrites en 6.1.

Lorsqu'un échantillon d'eau réceptrice d'amont doit servir d'eau témoin/de dilution, il faut préparer une solution témoin distincte avec l'eau d'élevage. Les conditions expérimentales et les modes opératoires de l'évaluation de chaque solution témoin devraient être identiques et conformes à ceux décrits à la section 4 et en 5.3.

Lorsqu'un degré poussé de normalisation est exigé pour les essais, on peut faire appel à de l'eau reconstituée d'une dureté déterminée (v. le tableau 2) comme eau témoin/de dilution⁵¹. Cela est particulièrement indiqué dans les études approfondies visant à corréliser les données toxicologiques relatives à divers types et sources d'effluents, de lixiviats ou d'éluviats provenant d'un certain nombre de laboratoires ou d'un laboratoire où la qualité de l'eau est variable. Il est alors souhaitable de réduire au minimum l'influence des propriétés chimiques (différentes) de l'eau de dilution.

Il est recommandé d'utiliser de l'eau reconstituée modérément dure (80–100 mg/L) si un seul type d'eau synthétique doit servir d'eau témoin/de dilution (USEPA, 1989, 1994, 2002). Les essais portant sur l'influence qu'exerce la chimie d'une eau réceptrice sur la toxicité chronique d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un éluviat pourraient être répétés avec des eaux reconstituées

⁵¹ Comme la dureté, le pH et d'autres caractéristiques de l'eau témoin/de dilution peuvent influencer grandement sur la toxicité de la matière d'essai, l'emploi d'une eau reconstituée normalisée [c.-à-d. une eau modérément dure (80–100 mg de CaCO₃ par litre)] pourrait permettre d'obtenir des résultats véritablement comparables à ceux d'autres laboratoires.

(tableau 2) et/ou naturelles dont la dureté et d'autres caractéristiques diffèrent.

6.4 Conditions expérimentales

Normalement, les échantillons d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat ne sont ni filtrés ni agités durant les essais. Cependant, la présence de concentrations élevées de solides inorganiques ou organiques en suspension dans un échantillon pourrait nuire aux daphnies, des organismes filtreurs (Robinson, 1957; Arruda et coll., 1983; McCabe et O'Brien, 1983; Hall et Hall, 1989). En outre, des concentrations élevées de solides biologiques dans certains types d'effluents traités pourraient accroître la toxicité des échantillons à cause de la production d'ammoniaque ou de nitrites (Servizi et Gordon, 1986). On devrait procéder à un essai supplémentaire si l'on craint un accroissement de la toxicité en raison de la présence de concentrations élevées de matières décantables ou en suspension dans les échantillons d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat et lorsque l'étude a pour objet de quantifier la toxicité attribuable aux solides que contiennent les échantillons. Pour ce deuxième essai, on devrait utiliser une portion de l'échantillon traitée par filtration ou par décantation afin d'éliminer les solides, mais le mode opératoire devrait par ailleurs être identique.

6.5 Observations et mesures au cours de l'essai

Les taux de survie et de reproduction des daphnies doivent être observés et consignés à intervalles de 24 h tout au long de l'essai, conformément aux indications fournies en 4.5.

La couleur, la *turbidité*, l'odeur et l'homogénéité (c.-à-d. la présence de matières flottantes ou de solides décantables) de l'échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat devraient être observées au moment de la préparation des solutions d'essai. La précipitation, la floculation, le changement de couleur, l'odeur ou d'autres réactions au moment de la dilution avec l'eau devraient être consignés, tout comme les changements d'aspect des solutions pendant

l'essai (p. ex. formation de mousse, décantation, floculation, augmentation ou diminution de la turbidité, variation de couleur).

Lorsque les échantillons d'effluent ont une teneur appréciable en solides, il est souhaitable de mesurer les solides totaux en suspension et décantables (APHA et coll., 1989, 2005) dès leur réception; ces renseignements font partie de la description générale de l'effluent, de même que des caractéristiques des échantillons qui pourraient influencer sur les résultats de l'essai toxicologique.

6.6 Paramètres et calculs

Normalement, les essais réalisés à des fins de surveillance et de vérification de la conformité aux règlements devraient comprendre, pour le moins, 10 solutions de répétition des échantillons ou sous-échantillons non dilués (ou dilués à une concentration précisée) et 10 répétitions des solutions témoins. Selon les exigences réglementaires précisées, on pourrait limiter les essais de détermination de la conformité à une concentration unique [eaux usées non diluées (100 %), sauf indication contraire]. Des essais à concentrations multiples pourraient également être exigés à des fins de surveillance et de vérification de la conformité. Dans ce cas, il faut déterminer la CL_{50} à la fin de l'essai ainsi que la CI_p (données sur la reproduction) (v. 4.6).

Les essais toxicologiques réalisés à d'autres fins (p. ex. détermination de sources de toxicité chronique dans une usine, efficacité d'un traitement, effets de la modification des procédés, incidences des caractéristiques de l'eau réceptrice sur la toxicité chronique, études interlaboratoires approfondies) pourraient, selon les objectifs visés, porter sur une seule concentration (aucune dilution ou dilution appropriée, plus un témoin) ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent d'un bon rapport coût-efficacité lorsqu'il s'agit de déterminer si l'on est en présence ou non d'une toxicité mesurable ou d'évaluer préalablement un nombre important d'échantillons ou de sous-échantillons afin d'établir leur toxicité

relative. Là encore, les paramètres à mesurer dépendraient des objectifs de l'étude, mais ils pourraient englober une notation arbitraire « satisfaisant/non satisfaisant » ou le pourcentage de mortalité et le nombre de néonates vivantes (trois premières couvées seulement) produites dans les eaux usées et dans les solutions témoins à la fin de l'essai (v. 4.6). On devrait réaliser des essais à concentrations multiples sur des échantillons ou des sous-échantillons d'effluent,

de lixiviat ou d'élutriat et calculer les paramètres souhaités (c.-à-d. la CL_{50} à la fin de l'essai et la CI_p de la reproduction). Il y aurait lieu, par exemple, de procéder à un essai à concentrations multiples si l'on prévoit que l'échantillon ou le sous-échantillon d'essai présentera une toxicité chronique et que l'objectif de l'essai est de déterminer la plus forte concentration d'eau usée qui n'est manifestement pas toxique pour les organismes à l'issue d'une exposition prolongée.

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'eau réceptrice

La présente section renferme des instructions relatives aux essais sur des échantillons d'eau réceptrice, qui s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

7.1 *Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons*

Les procédures de prélèvement, d'étiquetage, de transport et d'entreposage des échantillons ou des sous-échantillons d'eau réceptrice devraient être conformes à celles décrites en 6.1. Les essais devraient débuter le plus tôt possible après le prélèvement, de préférence dans les 24 h, mais pas plus de 3 jours après.

7.2 *Préparation des solutions d'essai*

On devrait agiter les échantillons qui se trouvent dans les contenants de leur prélèvement, avant de les verser, pour en assurer l'homogénéité. Le prélèvement des sous-échantillons devrait se faire conformément aux indications fournies en 6.2.

Chaque échantillon d'eau réceptrice devrait être filtré sur un filet à plancton à mailles de 60 µm avant d'être utilisé, afin d'en éliminer les compétiteurs et prédateurs potentiels de *C. dubia*. Si l'on s'inquiète de l'effet de la filtration sur la toxicité de l'échantillon, on pourrait effectuer un deuxième essai sur un échantillon non filtré⁵².

7.3 *Eau témoin/de dilution*

Pour les échantillons d'eau réceptrice prélevés au voisinage d'un point de rejet d'eaux usées, d'un déversement de produits chimiques ou d'une

autre source ponctuelle de contamination possible, on peut prélever simultanément de l'eau d'« amont » et l'utiliser comme eau témoin et eau de dilution pour les échantillons d'eau d'aval^{53, 54}. Cette eau témoin/de dilution devrait être prélevée

⁵³ Les contaminants déjà présents dans l'eau réceptrice d'« amont » pourraient modifier la toxicité de l'échantillon d'eau usée d'aval à l'étude. Dans ce cas, de l'eau de dilution non contaminée (eau naturelle, eau reconstituée ou eau municipale déchlorée) donnerait une estimation plus précise de la toxicité de la matière d'essai, mais pas nécessairement de son incidence totale sur le site visé.

Si l'essai vise à déterminer l'effet d'un échantillon d'eau d'aval sur une eau usée donnée, il importe peu que cette dernière modifie la toxicité de l'échantillon, notamment par la présence de matières humiques ou de substances toxiques additionnelles. Si un surcroît de toxicité est imputable à l'eau réceptrice, il convient d'inclure dans l'essai, à tout le moins, un deuxième témoin de l'eau d'élevage et, au plus, une autre série de concentrations utilisant ce milieu d'élevage comme eau de dilution.

Si l'essai vise à déterminer dans quelle mesure une eau réceptrice donnée peut modifier la toxicité de la matière d'essai en raison de ses caractéristiques physicochimiques (p. ex. dureté, pH, turbidité, teneur en acide humique ou en acide fulvique) et/ou de la présence d'autres contaminants, le responsable de l'essai pourrait choisir d'utiliser l'eau d'amont pour préparer les concentrations expérimentales et en tant que solution témoin parmi d'autres. Une comparaison des résultats obtenus avec cette eau par rapport à ceux obtenus avec l'eau du laboratoire pour le maintien des organismes témoins permettra de déterminer si des effets toxiques peuvent être attribuables à l'eau d'amont. Pour mieux comprendre l'influence qu'exerce chaque type d'eau témoin/de dilution sur la toxicité de la matière ou de la substance d'essai, on peut effectuer une comparaison parallèle des effets toxiques en utilisant chaque eau témoin/de dilution pour préparer une série de concentrations expérimentales.

⁵⁴ Une solution de rechange (ou un compromis) à l'utilisation d'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution consiste à rajuster le pH et la dureté de l'eau du laboratoire (ou d'une eau reconstituée) pour qu'ils correspondent à ceux de l'eau réceptrice. Selon le cas, le rajustement peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées à un moment particulier.

⁵² La filtration d'un échantillon pourrait éliminer les matières décantables ou en suspension qui sont représentatives de la matière d'essai et qui pourraient modifier sa toxicité en regard des organismes d'essai.

le plus près possible de la ou des sources de contamination en cause, mais en amont ou à l'extérieur de leur zone d'influence; on devrait la filtrer pour en éliminer les organismes, comme il est indiqué en 6.2.

Si l'on utilise de l'eau d'« amont » comme eau témoin/de dilution, il faut préparer une solution témoin distincte avec l'eau de laboratoire normalement utilisée pour l'élevage de *C. dubia*. Les conditions de l'essai ainsi que les procédures applicables à la préparation et à l'évaluation de chaque solution témoin devraient être identiques et conformes aux descriptions fournies en 4.1 et 5.3.

Des contraintes d'ordre logistique, les effets toxiques prévus ou d'autres aspects pratiques propres au site pourraient empêcher ou proscrire l'utilisation d'eau d'amont comme eau témoin/de dilution. Dans de tels cas, on devrait utiliser une autre source d'eau non contaminée pour l'élevage des daphnies (v. 2.4.4), comme eau témoin et pour toutes les dilutions (v. la note 54). La dureté de l'eau choisie à cette fin devrait être semblable à celle de l'eau ou des eaux utilisées dans l'essai. À cette fin, on peut choisir ou préparer une eau non contaminée (naturelle ou reconstituée) qui a la dureté voulue, et y élever les organismes d'essai (dont les couvées) avant la réalisation des essais (v. 3.4).

7.4 Observations et mesures au cours de l'essai

On devrait observer et mesurer la couleur, la turbidité, la formation de mousse, la précipitation et les autres caractéristiques des échantillons et des solutions d'essai, comme il est indiqué en 6.5, tant au cours de la préparation des

solutions expérimentales qu'au cours des essais eux-mêmes. Ces observations s'ajoutent aux observations de base relatives aux organismes d'essai énoncées en 4.5.

7.5 Paramètres et calculs

Les paramètres des essais sur des échantillons d'eau réceptrice devraient correspondre aux options et aux méthodes énoncées en 4.6 et 6.6.

Les essais devraient inclure, pour chaque échantillon d'eau réceptrice, au moins 10 solutions de répétition de l'eau non diluée et 10 solutions témoins de répétition. Les paramètres de ces essais se limiteraient normalement aux données sur la survie et sur la reproduction de *C. dubia* exposée à une eau réceptrice non diluée (v. 4.6).

Si les échantillons d'eau réceptrice sont vraisemblablement toxiques et si l'on veut connaître le degré de dilution nécessaire pour permettre la survie et la reproduction normales des daphnies, on devrait effectuer un essai à concentrations multiples pour déterminer la CL_{50} à la fin de l'essai ainsi que la CI_p de la reproduction, conformément à la description fournie à la section 4. Dans tout essai à concentrations multiples, l'eau réceptrice non diluée (100 %) devrait constituer la concentration la plus élevée.

Certains ensembles d'essais pourraient comprendre une série d'échantillons d'eau de surface non diluée, par exemple, provenant d'un certain nombre d'endroits. Les tests statistiques et la consignation des résultats de ces essais devraient être conformes aux procédures exposées en 4.6.

Section 8

Rapports à produire

Chaque rapport d'essai doit indiquer si l'on s'est écarté des « obligations » énoncées aux sections 2 à 7 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. À la lecture du rapport d'essai, on doit être en mesure de déterminer si les conditions et les modes opératoires observés avant et pendant l'essai ont su assurer la validité et l'acceptabilité des résultats pour l'usage que l'on entend en faire.

La sous-section 8.1 énumère les éléments qui doivent être intégrés dans le rapport d'essai, tandis que la sous-section 8.2 décrit les éléments qui doivent figurer dans le rapport d'essai, être fournis séparément dans un rapport général ou être conservés dans les dossiers pendant au moins cinq ans. Des programmes particuliers de surveillance ou des protocoles expérimentaux connexes pourraient exiger de faire figurer dans le rapport d'essai certains des éléments énumérés en 8.2 et propres à l'essai, ou demander que certains renseignements au sujet de l'essai soient « conservés dans les dossiers » (p. ex. des précisions sur la substance ou la matière d'essai et/ou les modes opératoires et conditions précis ayant coïncidé avec le prélèvement, la manipulation, le transport et l'entreposage des échantillons).

On peut citer les modes opératoires et les conditions communs à une série d'essais en cours (p. ex. des essais toxicologiques systématiques exécutés à des fins de surveillance ou de contrôle de la conformité aux règlements) et satisfaisant aux exigences de la présente méthode, ou joindre un rapport général exposant dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie au laboratoire.

Les détails relatifs à la conduite et aux résultats de l'essai qui ne sont consignés ni dans le rapport d'essai ni dans un rapport général doivent être conservés par le laboratoire pendant au moins cinq ans, de sorte que l'on puisse fournir

l'information pertinente si l'essai doit faire l'objet d'une vérification. L'information conservée dans les dossiers pourrait comprendre les éléments suivants :

- un enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons mis à l'essai à des fins de surveillance ou d'application d'un règlement;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons;
- certains résultats des analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons;
- les notes de laboratoire relatives aux observations et aux mesures effectuées au cours de l'essai;
- les notes de laboratoire et la ou les cartes de contrôle des essais toxicologiques de référence;
- les dossiers détaillés concernant l'origine et la santé des génitrices;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

Le personnel de laboratoire responsable des essais doit dater et signer les feuilles de données originelles.

8.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

Voici la liste des éléments qui doivent figurer dans le rapport d'essai.

8.1.1 Substance ou matière d'essai

- Une courte description du type d'échantillon (p. ex. produit chimique ou substance chimique, effluent, éluatriat, lixiviat ou eau

réceptrice), tel qu'il a été transmis, le cas échéant, au personnel de laboratoire;

- des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon ou sous-échantillon;
- la date du prélèvement de chaque échantillon ou sous-échantillon; la date et l'heure d'arrivée de chaque échantillon ou sous-échantillon au laboratoire;
- les dates ou les journées d'utilisation de chaque échantillon ou sous-échantillon au laboratoire;
- dans le cas d'un effluent ou d'un lixiviat, la température de l'échantillon ou, si l'on utilise de nombreux sous-échantillons, la température d'un seul des sous-échantillons à son arrivée au laboratoire;
- la teneur en oxygène dissous et le pH de l'échantillon ou du sous-échantillon d'eau usée ou d'eau réceptrice, immédiatement avant sa préparation et son utilisation dans l'essai toxicologique;
- la date de préparation de l'élutriat et la description de la procédure utilisée à cette fin; les dates ou les journées au cours desquelles, dans un essai sur élutriat, on a utilisé chaque échantillon ou sous-échantillon.

8.1.2 Organismes d'essai

- Le nom de l'espèce et l'origine des génitrices;
- la confirmation que les ascendants de tous les organismes prélevés dans les élevages individuels utilisés pour le démarrage de l'essai proviennent du même élevage en nombre (v. 2.4.1);
- la plage d'âge au début de l'essai;
- tout aspect, comportement ou traitement inhabituels des organismes d'essai avant leur emploi dans l'essai;
- les données relatives à l'état de santé des organismes des élevages individuels, y compris le pourcentage moyen de mortalité des génitrices au cours des 7 jours précédant l'essai; le nombre de jeunes produits par chaque génitrice au cours de la troisième couvée ou des couvées subséquentes; le nombre moyen de jeunes qui ont été produits pendant les 3 premières couvées de chaque adulte au cours des 7 jours précédant l'essai et qui ont survécu; les éphippies observées (v. 2.4.11).

8.1.3 Installation d'essai et appareils

- Le nom et l'adresse du laboratoire;
- le nom de la ou des personnes ayant réalisé l'essai;
- une courte description des récipients utilisés dans l'essai (taille, forme, matériau).

8.1.4 Eau témoin/de dilution

- Le ou les types d'eau utilisés comme eau témoin/de dilution, de même que la ou les sources de celle-ci;
- le type et la quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau témoin/de dilution.

8.1.5 Méthode d'essai

- Le nom de la méthode d'essai biologique utilisée (c.-à-d. celle décrite dans le présent document);
- une courte description de la ou des méthodes utilisées, le cas échéant, pour filtrer un échantillon, un sous-échantillon ou une solution expérimentale ou pour en rajuster la dureté ou le pH;
- le plan d'étude et la description de toute procédure spéciale (p. ex. renouvellement des solutions à intervalles autres que quotidiens; préparation et emploi d'un élutriat; préparation et emploi d'un solvant et, le cas échéant, d'un témoin);

- une courte description de la fréquence et de la nature de toutes les observations et mesures effectuées au cours de l'essai;
- le nom du ou des programmes et des méthodes employés pour calculer les paramètres statistiques, de même que des renvois à ces programmes et méthodes.
- une brève indication concernant l'application ou non des mêmes conditions expérimentales pour l'essai toxicologique de référence et pour l'essai sur un ou des échantillons; la description de tout écart ou de toute omission en regard des modes opératoires et conditions applicables à l'essai toxicologique de référence exposés dans le présent document.

8.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La raison et la description de tout écart ou de toute omission en regard des modes opératoires et conditions exposés dans le présent document;
- le nombre, la concentration, le volume et la profondeur des solutions d'essai dans les récipients d'essai, y compris les témoins;
- le nombre d'organismes par récipient d'essai et le nombre de répétitions par traitement;
- une brève mention (y compris de la procédure, du débit et de la durée) de toute aération préalable des solutions d'essai;
- une brève mention concernant l'aération (le cas échéant, indiquer le débit et la durée) des solutions pendant l'exposition des organismes d'essai;
- la confirmation que toutes les néonates produites dans chaque solution expérimentale (y compris les solutions témoins) par une génitrice au cours de la quatrième couvée ou de couvées subséquentes ont été éliminées et exclues des dénombrements de jeunes produits par répétition ou traitement;
- la date du début et de la fin de l'essai;
- toutes les mesures exigées (v. 4.5) de la température, du pH et de la teneur en oxygène dissous (exprimée en mg/L et en pourcentage de la valeur de saturation) des solutions d'essai (y compris les témoins) au cours de l'essai;

8.1.7 Résultats

- Pour chaque solution expérimentale de répétition, y compris chaque répétition témoin, la présence ou l'absence d'adultes de la première génération morts, à chacune des périodes d'observation et à la fin de l'essai;
- pour chaque traitement, y compris le ou les traitements témoins, le pourcentage moyen (cumulatif) de mortalité des daphnies de la première génération à la fin de l'essai;
- pour chaque solution d'essai de répétition, y compris chaque répétition témoin, le nombre de néonates vivantes produites par chaque daphnie de la première génération pendant les trois premières couvées, relevé au cours de chaque période d'observation et à la fin de l'essai;
- pour chaque traitement, y compris le ou les traitements témoins, le nombre moyen (cumulatif) (et son écart-type) de néonates vivantes produites par chaque daphnie de la première génération pendant les trois premières couvées seulement;
- la CL_{50} (et ses limites de confiance à 95 %) et une indication de la méthode quantique utilisée pour l'établir; la CI_p (et ses limites de confiance à 95 %) pour les données sur la reproduction; des détails concernant toute technique de pondération appliquée aux données; une indication de la méthode quantitative utilisée;
- les valeurs aberrantes ainsi que la justification de leur suppression;

- les résultats et la durée de tous les essais toxicologiques réalisés avec le ou les toxiques de référence dans les 14 jours précédant le début de l'essai, de même que la moyenne géométrique (± 2 ET) obtenue pour le ou les mêmes toxiques de référence lors d'essais antérieurs;
- toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

8.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des éléments qui doivent soit être inclus dans le rapport d'essai ou le rapport général, soit être conservés dans les dossiers pendant au moins cinq ans.

8.2.1 Substance ou matière d'essai

- Le nom de la ou des personnes ayant prélevé et/ou fourni l'échantillon ou les sous-échantillons;
- la chaîne de transmission et les fiches d'inscription de l'échantillon ou des sous-échantillons;
- l'état (p. ex. température, conservation dans l'obscurité, dans un récipient scellé) de chaque échantillon ou sous-échantillon à l'arrivée au laboratoire et pendant l'entreposage.

8.2.2 Organismes d'essai

- La description des conditions et des méthodes d'élevage, y compris la température et l'éclairage; la source et la qualité de l'eau; le *prétraitement* de l'eau; la méthode d'élevage, y compris la fréquence du renouvellement de l'eau et la procédure de renouvellement; l'âge de l'élevage;
- le type, la source et le mode de préparation de la nourriture pour les élevages et les essais; les relevés sur la valeur nutritive de la nourriture et les contaminants connus présents dans cette dernière; les méthodes

d'entreposage de la nourriture; le mode d'alimentation, la fréquence et la ration.

8.2.3 Installations et appareillage

- Une description des systèmes de régulation de l'éclairage et de la température dans l'installation d'essai;
- une description des procédures utilisées pour nettoyer ou rincer l'appareillage d'essai;
- pour les essais comportant l'aération des solutions expérimentales, une description de l'appareillage et du débit.

8.2.4 Eau témoin/de dilution

- Des précisions sur l'échantillonnage et l'entreposage, si l'eau témoin/de dilution était de l'eau réceptrice d'« amont »;
- des précisions concernant tout prétraitement de l'eau (p. ex. filtration; stérilisation; chloration/déchloration; rajustement du pH, de la température et/ou de la dureté; dégazage; aération);
- toute variable accessoire de la qualité de l'eau mesurée avant et/ou durant l'essai toxicologique (p. ex. métaux dissous, ammoniacale, pesticides, solides en suspension, chlore résiduel, acides humique et fulvique).

8.2.5 Méthode d'essai

- Une description de l'expérience accumulée par le laboratoire dans l'application de cette méthode d'essai biologique pour la mesure de la toxicité au moyen de *C. dubia*;
- le mode opératoire utilisé pour préparer et entreposer les solutions mères et/ou les solutions d'essai; la description et la ou les concentrations de tout solvant utilisé;
- les méthodes utilisées (avec références) pour les analyses chimiques de l'échantillon ou des solutions d'essai; des précisions sur le

prélèvement, la préparation et l'entreposage de l'échantillon ou des solutions d'essai, avant les analyses chimiques;

- la description de l'essai préliminaire réalisé pour déterminer la gamme de concentrations.

8.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La photopériode, la source lumineuse et l'intensité lumineuse à proximité de la surface des solutions d'essai;
- les conditions, les modes opératoires et la fréquence des essais toxicologiques employant un ou des toxiques de référence et des daphnies néonates;
- les mesures de la qualité de l'eau utilisée pour l'élevage et comme eau témoin/de dilution (v. 2.4.4);
- la dureté totale de l'eau témoin/de dilution et au moins la concentration expérimentale la plus élevée au début de l'essai; la conductivité de chaque solution expérimentale fraîchement préparée;
- toute autre mesure chimique effectuée sur l'échantillon, les solutions mères ou les solutions d'essai (p. ex. la concentration des produits chimiques, la teneur en solides en suspension, la conductivité, la dureté, l'alcalinité) effectuée avant et/ou au cours de l'essai;

- l'aspect de l'échantillon ou des solutions d'essai; tout changement d'aspect observé au cours de l'essai.

8.2.7 Résultats de l'essai

- Les résultats de tout essai préliminaire (le cas échéant);
- les résultats de toute analyse statistique effectuée avec et sans les valeurs aberrantes; dans le cas des analyses de régression, conserver dans les dossiers les renseignements concernant la taille de chaque échantillon (p. ex. nombre de répétitions par traitement), les estimations paramétriques ainsi que la variance ou l'erreur-type, tout tableau ANOVA produit, les graphiques des valeurs ajustées et observées de tout modèle utilisé, les résultats des tests des valeurs aberrantes et des tests de normalité et d'homoscédasticité;
- une carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les résultats plus anciens des essais toxicologiques au moyen du ou des toxiques de référence;
- la représentation graphique des données dose-réponse;
- les originaux des notes de laboratoire et d'autres feuilles de données, signés et datés par les membres du personnel de laboratoire qui ont effectué les essais et les analyses connexes.

Références

- Abernethy, S.G., et G.F. Westlake, *Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing*, Ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale (Ont.) [ISBN 0-7729-5947-1] (septembre 1989).
- Anderson, S.L., et T.J. Norberg-King, lettre à l'éditeur, « Precision of Short-term Chronic Toxicity Tests in the Real World », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:143–145 (1991).
- Anonyme, *North Carolina Ceriodaphnia Chronic Effluent Bioassay Procedure*, décembre 1985, révisé en décembre 1986, North Carolina Dept. Natural Resources and Community Development, Division of Environ. Management, Water Quality Section, Raleigh, NC (1986).
- , « *Ceriodaphnia dubia* Survival and Reproduction Test », dans : *Interim Chronic Testing Methodologies for Use in the NJPDES Permit Program*, Dept. of Environ. Protection, État du New Jersey, Trenton, NJ (février 1989).
- APHA, AWWA et WPCF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Pollution Control Federation), « Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms », partie 8000, p.8–1 à 8–143, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17^e éd., Washington, DC (1989).
- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation), « Toxicity », partie 8000, p.8–1 à 8–173, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21^e éd., Washington, DC (2005).
- Armstrong, F.A.J., et D.P. Scott, « Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers », *Journal de l'Office de recherches sur les pêcheries du Canada*, 31:1881–1885 (1974).
- Arruda, J.A., G.R. Marzolf et R.T. Faulk, « The Role of Suspended Sediment in the Nutrition of Zooplankton in Turbid Reservoirs », *Ecology*, 65:1225–1235 (1983).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), *Proposed New Standard Guide for Conducting Three Brood, Renewal Toxicity Tests with Ceriodaphnia dubia*, Committee E-47, version provisoire n^o 6, Philadelphie, PA (1988).
- , « Standard Guide for Conducting Three-brood, Renewal Toxicity Tests with *Ceriodaphnia dubia* », p. 879–897, dans : *1989 Annual Book of ASTM Standards*, rapport E1295-89, vol. 11.04, Philadelphie, PA (1989).
- , « Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with *Lemna gibba* G3 », p. 1–10, dans : *1991 Annual Book of ASTM Standards*, rapport E-1415-91, vol. 11.04, Philadelphie, PA (1991).
- , « Standard Guide for the Use of Lighting in Laboratory Testing », p. 1279–1289, dans : *1996 Annual Book of ASTM Standards*, rapport E1733-95, vol. 11.05, Philadelphie, PA (1996).
- , « Standard Guide for Conducting Three-brood, Renewal Toxicity Tests with *Ceriodaphnia dubia* », p. 341–360, dans : *2006 Annual Book of ASTM Standards*, rapport E-1295-01, vol. 11.06, West Conshohocken, PA (2006).

- Battelle [Battelle, Columbus Division, Columbus, OH], « Battelle's standard operating procedure (SOP) for preparing for the yeast/trout food/Cerophyll suspension (YTC) used as a *Ceriodaphnia* food », « Battelle's standard operating procedure for static renewal chronic toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia* » et « Battelle's standard operating procedure (SOP) for culturing *Ceriodaphnia dubia* », annexes D, E et F, dans : *Laboratory Evaluation of Seven-day Fathead Minnow and Ceriodaphnia Chronic Toxicity Tests*, American Petroleum Inst. (API), Health and Environ. Sciences Dept., publication n° 4442 de l'API, Washington, DC (1986).
- , *Standard Operating Procedure for Static-renewal Short-term Chronic Effluent Toxicity Tests with Ceriodaphnia dubia*, Battelle, Columbus Division, rapport EEf-E-20-01, Columbus, OH (1987).
- , « Battelle's standard operating procedure (SOP) for culturing *Ceriodaphnia dubia* », « Battelle's standard operating procedure (SOP) for yeast/trout food/Cerophyll (YTC) preparation » et « Battelle's standard operating procedure (SOP) for static renewal chronic toxicity tests with *Ceriodaphnia dubia* », annexes A, B et D, dans : *Electric Power Research Inst. (EPRI), Ecological Studies Program, Effects of Food and Water Quality on Culturing and Toxicity Testing of Ceriodaphnia dubia*, rapport EA-5820 de l'EPRI, projet 2368-2, Palo Alto, CA (1988).
- Berner, D.B., *Taxonomy of Ceriodaphnia (Crustacea: Cladocera) in U.S. Environmental Protection Agency Cultures*, rapport EPA/600/4-86/032, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH (1986).
- Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:117–124 (1988).
- Bouck, G.R., « Gasometer: An Inexpensive Device for Continuous Monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation », *Trans. Amer. Fish Soc.*, 111:505–516 (1982).
- Buikema, A.L. (Jr), « Some Effects of Light on the Growth, Molting, Reproduction and Survival of the Cladoceran, *Daphnia pulex* », *Hydrobiologia*, 41:391–418 (1973).
- Buikema, A.L. (Jr), J.G. Geiger et D.R. Lee, « *Daphnia* Toxicity Tests », p. 48–69, dans : *Aquatic Invertebrate Bioassays*, A.L. Buikema (Jr) et J. Cairns (éd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1980).
- Carpenter, S.R., J.F. Kitchell et J.R. Hodgson, « Cascading Trophic Interactions and Lake Productivity », *BioScience*, 35 (10):634–647 (1985).
- CCMRE (Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement), *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*, rapport préparé pour Environnement Canada par le CCMRE, Ottawa (Ont.) (mars 1987).
- Cooney, J.D., et G.M. DeGraeve, *Laboratory Evaluation of Seven-day Fathead Minnow and Ceriodaphnia Chronic Toxicity Tests*, publication n° 4442 de l'American Petroleum Institute, Washington, DC (1986).
- Cooney, J.D., G.M. DeGraeve, E.L. Moore, W.D. Palmer et T.L. Pollock, *Effects of Food and Water Quality on Culturing and Toxicity Testing of Ceriodaphnia dubia*, rapport EA-5820 de l'Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA (1988).

- Cowgill, U.M., « Critical Analysis of Factors Affecting the Sensitivity of Zooplankton and the Reproducibility of Toxicity Test Results », *Water Res.*, 21:1453–1462 (1987).
- , « Nutritional Considerations in Toxicity Testing: Invertebrate Nutrition (*Daphnia*, *Ceriodaphnia*) », p. 4–15, dans : *Nutritional Considerations in Toxicity Testing*, R.P. Lanno (réd.), compte rendu du cours abrégé offert à la 10^e Assemblée annuelle de la Soc. Environ. Toxicol. Chem., Toronto (Ont.) (29 octobre 1989).
- Cowgill, U.M., I.T. Takahashi et S.L. Applegath, « A Comparison of the Effect of Four Benchmark Chemicals on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia/affinis* Tested at Two Different Temperatures », *Environ. Toxicol. Chem.*, 4:415–422 (1985).
- Cowgill, U.M., D.P. Milazzo et C.K. Meagher, « New Diet for *Ceriodaphnia dubia* », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 41:304–309 (1988).
- Cowgill, U.M., et D.P. Milazzo, « New Approach to the Seven-day *Ceriodaphnia dubia* Test with Additional Comments Pertaining to the Same Test for *Daphnia magna* », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 42:749–753 (1989).
- DeGraeve, G.M., et J.D. Cooney, « *Ceriodaphnia*: An Update on Effluent Toxicity Testing and Research Needs », *Environ. Toxicol. Chem.*, 6:331–333 (1987).
- DeGraeve, G.M., J.D. Cooney, B.H. Marsh, T.L. Pollock et N.G. Reichenbach, *Precision of the EPA Seven-day Ceriodaphnia dubia Survival and Reproduction Test: Intra- and Interlaboratory Study*, rapport EN-6469 de l'Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA (1989).
- Eagleson, K.W., D.L. Lenat, L.W. Ausley et F.B. Winborne, « Comparison of Measured Instream Biological Responses with Responses Predicated using the *Ceriodaphnia dubia* Chronic Toxicity Test », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1019–1028 (1990).
- EC (Environnement Canada), *Méthode d'essai biologique : Essai de létalité aiguë sur Daphnia spp.*, rapport SPE 1/RM/11, Conservation et protection, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (1990a).
- , *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*, rapport SPE 1/RM/12, Conservation et protection, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (1990b).
- , *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité*, rapport SPE 1/RM/46, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa (Ont.) (2005).
- GITA (Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique), « Sublethal Testing Procedures for *Daphnia* sp./*Ceriodaphnia* sp. », annexe 7A, partie H, dans Sergy (1987), Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (1986).
- Hall, W.S., et L.W. Hall, « Toxicity of Alum Sludge to *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas* », *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42(5):791–798 (1989).
- Hamilton, M.A., R.C. Russo et R.V. Thurston, « Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays », *Environ. Sci. Technol.*, 11: 714–719 (1977).
- Hubert, J.J., *PROBIT2: A Microcomputer Program for Probit Analysis*, Département des mathématiques et des statistiques, Université de Guelph, Guelph (Ont.) (1987).

- INRE (Institut national de recherche sur les eaux), *Ceriodaphnia reticulata Seven-day Survival and Reproduction Test for Screening Chronic Toxicity in Environment Samples*, guide méthodologique inédit, B.J. Dutka et S.S. Rao, Institut national de recherche sur les eaux, Centre canadien des eaux intérieures, Burlington (Ont.) (1988).
- ISO (Organisation internationale de normalisation), *Water Quality - Determination of the Inhibition of Mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*, rapport n° ISO 6341-1982 (E), 1^{re} éd., Genève, Suisse (1982).
- Keating, K.I., « A System of Defined (*sensu stricto*) Media for Daphnid (Cladocera) Culture », *Water Res.*, 19:73–78 (1985).
- Keating, K.I., P.B. Caffrey et K.A. Schultz, « Inherent Problems in Reconstituted Water », p. 367–378, dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, vol. 12, ASTM STP 1027, U.M. Cowgill et L.R. Williams (réd.), American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1989).
- Litchfield, J.T., « A Method for Rapid Graphic Solution of Time-percent Effect Curves », *Pharmacol. Exp. Ther.*, 97:399–408 (1949).
- McCabe, G.D., et W. J. O'Brien, « The Effects of Suspended Silt on Feeding and Reproduction of *Daphnia pulex* », *American Midland Naturalist*, 110:324–337 (1983).
- McCaffrey, L., « The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14 (1)(a) of the Environmental Protection Act, 1971 and Section 32 (1) of the Ontario Water Resources Act », p. 15–22, dans : *Proc. Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop*, Hamilton (Ont.), 7–9 novembre 1978, rapport technique n° 862 du Service des pêches et des sciences de la mer (1979).
- McNaught, D.C., et D.I. Mount, « Appropriate Durations and Measures for *Ceriodaphnia Toxicity Tests* », p. 375–381, dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, R.C. Bahner et D.J. Hansen (réd.), ASTM STP 891, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1985).
- Melville, G.E., et D. Richert, « A Summary of the Effects of Two Reconstituted Waters on Aspects of the Demographics of *Ceriodaphnia dubia* », p. 73–83, dans : *Proc. 15th Annual Aquatic Toxicity Workshop*, Montréal (Qué.), 28–30 novembre 1988, Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques n° 1714 (1989).
- Mount, D.I., et L. Anderson-Carnahan, *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures*, rapport EPA-600/3-88/034, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN (1988).
- Mount, D.I., et T.J. Norberg, « A Seven-day Life-cycle Cladoceran Toxicity Test », *Environ. Toxicol. Chem.*, 3:425–434 (1984).
- Mount, D.I., et T.J. Norberg-King, *Validity of Effluent and Ambient Toxicity Tests for Predicting Biological Impact, Kanawha River, Charleston, West Virginia*, rapport EPA/600/3-86/006, Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN (1986).
- Mount, D.I., N.A. Thomas, T.J. Norberg, M.T. Barbour, T.H. Roush et W.F. Brandes, *Effluent and Ambient Toxicity Testing and Instream Community Response on the Ottawa River, Lima, Ohio*, rapport EPA/600/3-84/080, Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN (1984).

- Mount, D.I., A.E. Steen et T.J. Norberg-King (réd.), *Validity of Effluent and Ambient Toxicity Testing for Predicting Biological Impact on Five Mile Creek, Birmingham, Alabama*, rapport EPA/600/8-85/015, Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN (1985).
- Mount, D.I., A.E. Steen et T.J. Norberg-King, *Validity of Effluent and Ambient Toxicity Tests for Predicting Biological Impact, Back River, Baltimore Harbor, Maryland*, rapport EPA/600/8-86/001, Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN (1986).
- Norberg-King, T., *Culturing of Ceriodaphnia dubia: Supplemental Report for Video Training Tape*, rapport EPA/505/8-89/002a, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water Enforcement and Permits, Washington, DC (1989).
- Norberg-King, T.J., et D.I. Mount (réd.), *Validity of Effluent and Ambient Toxicity Tests for Predicting Biological Impact, Skeleton Creek, Enid, OK*, rapport EPA/600/8-86/002, Environmental Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN (1986).
- Pennak, R.W., *Fresh-water Invertebrates of the United States*, 2^e éd., John Wiley & Sons, New York, NY (1978).
- Robinson, M., « The Effects of Suspended Material on the Reproductive Rate of *Daphnia magna* », *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas*, 4:265–277 (1957).
- Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young, *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish*, Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria (C.-B) (1982).
- Sergy, G., *Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection*, Conservation et Protection, Protection de l'environnement, Environnement Canada, rapport inédit, Edmonton (Alb.) (juillet 1987).
- Servizi, J.A., et R.W. Gordon, « Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot Scale Aerated Lagoon », *Pulp Paper Can.*, 87 (11):T404–409 (1986).
- Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. Mackay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems - Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:125–137 (1988).
- Sprague, J.B., « Measurement of Pollutant Toxicity to Fish. I. Bioassay Methods for Acute Toxicity », *Water Res.*, 3:793–821 (1969).
- Stephan, C.E., « Methods for Calculating an LC₅₀ », p. 65–84, dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer et J.L. Hamelink (réd.), rapport ASTM STP 634, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1977).
- Suter, G.W. II, A.E. Rosen, E. Linder et D.F. Parkhurst, « Endpoints for Responses of Fish to Chronic Toxic Exposures », *Environ. Toxicol. Chem.*, 6:793–809 (1987).
- USEPA, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, W.B. Horning et C.I. Weber (réd.), rapport EPA/600/4-85/014, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH (1985a).
- , *Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates*, NTIS, n° cat. PB86-129269, Hazard Evaluation Division, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC (1985b).

———, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, rapport EPA/600/4-89/001, 2^e éd., U.S. Environmental Protection Agency (préparé par C.I. Weber, W.H. Peltier, R.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer, et R.W. Freyberg), Cincinnati, OH (1989).

———, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, rapport EPA/600/4-91-002, 3^e éd., U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH (1994).

———, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, rapport EPA-821-R-02-013, 4^e éd., U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC (2002).

Annexe A

Membres du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité^a (en décembre 2006)

Gouvernement fédéral, Environnement Canada

W. Antonioli
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alb.)

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal (Qué.)

U. Borgmann
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ont.)

J. Bruno
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

C. Buday
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

K. Doe
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

G. Elliott
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alb.)

F. Gagné
Centre St-Laurent
Montréal (Qué.)

M. Harwood
Service de la protection de l'environnement
Montréal (Qué.)

S. Hendry
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

D. Hughes
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

P. Jackman
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

N. Kruper
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alb.)

M. Linssen
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

L. Porebski
Direction du milieu marin
Gatineau (Qué.)

J. Princz
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

G. Schroeder
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

T. Steeves
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

^a Ancien nom : Groupe intergouvernemental sur la toxicité
aquatique.

D. Taillefer
Direction du milieu marin
Gatineau (Qué.)

L. Taylor
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

S. Trottier
Centre St-Laurent
Montréal (Qué.)

G. van Aggelen
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

L. Van der Vliet
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

B. Walker
Centre St-Laurent
Montréal (Qué.)

P. Wells
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (N.-É.)

Gouvernement fédéral, Pêches et Océans Canada

R. Roy
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (Qué.)

Gouvernement fédéral, Ressources naturelles Canada

M. Schwartz
Laboratoire des sciences minérales, CANMET
Ottawa (Ont.)

B. Vigneault
Laboratoire des sciences minérales, CANMET
Ottawa (Ont.)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Ste-Foy (Qué.)

B. Bayer
Ministère de l'Environnement du Manitoba
Winnipeg (Man.)

K. Hunter
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

D. Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

J. Schroeder (président)
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Toronto (Ont.)

T. Watson-Leung
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

Annexe B

Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada

Administration centrale

351, boul. Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Gatineau (Qué.)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique

Queen Square, 15^e étage
45, Alderney Drive
Dartmouth (N.-É.)
B2Y 2N6

Région du Québec

105, rue McGill, 8^e étage
Montréal (Qué.)
H2Y 2E7

Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin, 2^e étage
Downsview (Ont.)
M3H 5T4

Région de l'Ouest et du Nord

Twin Atria n^o 2, bureau 210
4999, 98^e Avenue
Edmonton (Alb.)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon

401, rue Burrard
Vancouver (C.-B.)
V6C 3S5

Annexe C

Variantes des essais de toxicité chronique avec *Ceriodaphnia* spp., décrits dans des méthodes canadiennes et étatsuniennes*

1. Matière et type d'essai

Document ^a	Matière d'essai ^b	Type d'essai	Durée de l'essai
USEPA, 1985a	effl., ER	RI ^c	7 jours
Anonyme, 1986	effl.	RI	7 jours
Battelle, 1986 ^d	effl., SC	RI	7 jours
Battelle, 1987	effl.	RI	7 jours
Battelle, 1988	n.i. ^e	RI	7 jours
ASTM, 1988	effl., SC (lix., séd., ER)	RI	7 jours ^f
INRE, 1988	effl., lix., séd.	RI	7 jours
Anonyme, 1989	effl.	RI	3 couvées ^{f, g}
USEPA, 1989	effl., ER	RI	3 couvées ^{g, h}

^a Les noms complets des organismes sont donnés dans les références.

^b effl. = Effluent lix. = Lixiviat
séd. = Sédiment ER = Eau réceptrice
SC = Substance chimique

^c RI = À renouvellement intermittent.

^d Les trois versions de la méthode de Battelle sont mentionnées parce qu'elles sont récentes, que les responsables des essais peuvent les rencontrer dans des textes et que l'on y observe une progression de la réflexion.

^e n.i. = Non indiqué.

^f 8 jours si la troisième couvée n'est pas produite en 7 jours.

^g Jusqu'à ce que 60 % des femelles témoins aient eu 3 couvées.

^h Pourrait prendre plus ou moins de 7 jours.

* Méthodes à la disposition des auteurs en août 1989.

2. Espèces d'essai

Document	Espèce	Stade évolutif
USEPA, 1985a	<i>C. dubia</i>	2–24 h, intervalle de 4 h ^a
Anonyme, 1986	<i>C. dubia/affinis</i>	2–24 h, intervalle de 4 h
Battelle, 1986	<i>C. dubia</i>	<24 h
Battelle, 1987	<i>C. dubia</i>	<24 h
Battelle, 1988	<i>C. dubia</i>	<24 h
ASTM, 1988	<i>C. dubia</i>	<12 h, intervalle de 4 h ^b
INRE, 1988	<i>C. reticulata</i>	≤2 h
Anonyme, 1989	<i>C. dubia</i>	<24 h, intervalle de 8 h ^c
USEPA, 1989	<i>C. dubia</i>	<24 h, intervalle de 8 h

^a Toutes nées dans le même intervalle de 4 h.

^b Issues de la troisième couvée ou de couvées subséquentes, avec au moins 6–8 jeunes dans la couvée précédente.

^c Toutes nées dans le même intervalle de 8 h.

3. Conditions d'élevage et d'acclimatation

Document	Eau ^a	Température (°C)	Dureté (mg/L)	Aération
USEPA, 1985a	ERC (EN, ED)	25 ± 2 ^b	80–100	au besoin, OD ≥5
Anonyme, 1986	« comme dans USEPA, 1985a »			
Battelle, 1986	EN	25 ± 2	100	aucune
Battelle, 1987	ERC	25 ± 2	n.i. ^c	n.i.
Battelle, 1988	ERC ^d	25 ± 2	160–180	aucune
ASTM, 1988	correspond à l'eau de dilution	25	n.i.	n.i.
INRE, 1988	ED (EN)	25 ± 1	n.i.	n.i.
Anonyme, 1989	« comme dans USEPA, 1989 »			
USEPA, 1989	ERC	25 ± 1	80–100	n.i.

^a ERC = Eau reconstituée EN = Eau naturelle, souterraine ou de surface, non contaminée

ED = Eau municipale déchlorée

^b Plage.

^c n.i. = Non indiqué.

^d Avec ajout d'un inoculum bactérien.

4. Conditions d'éclairage pendant l'élevage

Document	Photopériode (clarté/obscurité)	Intensité lumineuse	Type	Période de transition
USEPA, 1985a	16 h/8 h (ou régime normal du laboratoire)	n.i. ^a	n.i.	n.i.
Anonyme, 1986	« comme dans USEPA, 1985a »			
Battelle, 1986	16 h/8 h	540–1 607 lux	Fl ^b	n.i.
Battelle, 1987	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Battelle, 1988	16 h/8 h	540–1 607 lux	Fl ^b	n.i.
ASTM, 1988	16 h/8 h	≤600 lux	n.i.	15–30 min ^c
INRE, 1988	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Anonyme, 1989	« comme dans USEPA, 1989 »			
USEPA, 1989	16 h/8 h	n.i.	n.i.	n.i.

^a n.i. = Non indiqué.

^b Fluorescent avec indice de rendu des couleurs ≥90.

^c Souhaitable pour réduire au minimum le stress causé par un changement brusque.

5. Conditions d'alimentation pendant l'élevage et l'essai

Document	Aliment	Fréquence pendant l'élevage	Fréquence pendant l'essai (jours après le début)
USEPA, 1985a	LCT ^a	tous les jours	tous les jours
Anonyme, 1986	« comme dans USEPA, 1985a »		
Battelle, 1986	algue ^b + LCT	3 fois/semaine	jours 0, 2 et 4 ou 0, 3 et 5
Battelle, 1987	algue ^b + LCT	3 fois/semaine	tous les jours
Battelle, 1988	algue ^b + LCT	3 fois/semaine	jours 0, 2 et 4 ou 0, 3 et 5
ASTM, 1988	n.i. ^c	régulièrement	tous les jours (souhaitable)
INRE, 1988	algue ^d + levure	tous les jours	jours 0, 2 et 4
Anonyme, 1989	artémias ^e	n.i.	2 fois/jour
USEPA, 1989	algue ^b + LCT	tous les jours	tous les jours

^a LCT = Mélange de levure, de Cerophyll^{MC} (matériel végétal séché) et de nourriture pour truites.

^b *Pseudokirchneriella subcapitata*.

^c n.i. = Non indiqué. D'après la recension, il s'agit de mélanges de diverses algues, de levure, de nourriture pour truites et de Cerophyll^{MC}.

^d *Scenedesmus* sp.

^e Nauplius nouvellement éclos.

6. Conditions expérimentales

Document	Récipient	Volume d'essai (mL)	Nombre de daphnies par récipient	Nombre de répétitions
USEPA, 1985a	BVB ^a ou gobelet en plastique de 30 mL	15	1	10
Anonyme, 1986	« comme dans USEPA, 1985a »	15	1	12
Battelle, 1986	BVB de 30 mL	15	1	10
Battelle, 1987	BVB de 30 mL	15	1	10
Battelle, 1988	BVB de 30 mL	15	1	10
ASTM, 1988	≤30 mL ^b	≥15	1	≥10
INRE, 1988	gobelet en plastique ou bécher de 30 mL	10	1	4–6
Anonyme, 1989	30 mL (couvert)	15	1	≥10
USEPA, 1989	BVB ou gobelet en plastique de 30 mL	15	1	10

^a BVB = Bécher en verre borosilicaté.

^b En verre, en acier inoxydable de type 316 ou en plastique fluorocarboné.

7. Caractéristiques de l'eau témoin/de dilution

Document	Type d'eau ^a	Dureté (mg/L)	pH	Teneur en OD	Fréquence de renouvellement
USEPA, 1985a	ERC, EN, ER (ED ^b)	80–100 ^c	n.i. ^d	aérer au besoin	tous les jours
Anonyme, 1986	« comme dans USEPA, 1985a »				jours 2 et 5
Battelle, 1986	comme pour l'eau d'élevage			n.i.	jours 2 et 4 ou tous les jours
Battelle, 1987	ERC, ER	n.i.	n.i.	aérer au besoin	tous les jours
Battelle, 1988	ERC	160–180	7,6–8,5	n.i.	jours 2 et 4 ou 2 et 5
ASTM, 1988	ERC ^e , EN, ER (ED ^b)	n.i. ^e	n.i.	90–100 %	tous les jours
INRE, 1988	ED	n.i.	n.i.	n.i.	jours 2 et 4
Anonyme, 1989	EN, ERC, EMD ^f ≤20%	n.i.	n.i.	aérer ≥24 h	tous les jours
USEPA, 1989	ERC ^g , EN, ER, ED	n.i. ^g	n.i.	aérer au besoin	tous les jours

^a ED = Eau municipale déchlorée

EMD = Eau minérale diluée

EN = Eau naturelle, souterraine ou de surface, non contaminée

ER = Eau réceptrice

ERC = eau reconstituée

^b « À utiliser en dernier ressort ».

^c S'il s'agit d'eau reconstituée. Dureté semblable à celle de l'eau réceptrice si celle-ci est utilisée pour les dilutions.

^d n.i. = Non indiqué.

^e Préparée selon la norme E729 de l'ASTM. On peut utiliser de l'eau reconstituée douce ou dure. Il « pourrait être souhaitable » d'y ajouter du sélénium ou de la vitamine B₁₂.

^f Il est recommandé d'ajouter du sélénium et de la vitamine B₁₂ à l'eau de dilution.

^g Si l'on emploie de l'eau reconstituée, il est recommandé qu'elle soit modérément dure (80–100 mg/L).

8. Température, aération, teneur en oxygène dissous et rajustement du pH pendant l'essai

Document	Température de l'eau (°C)	Aération	OD minimum avant l'essai	Rajustement du pH
USEPA, 1985a	25 ± 1 ^a	aucune ^b	n.i. ^c (« bas »)	n.i.
Anonyme, 1986	25 ± 1	aucune?	5,0 mg/L	n.i.
Battelle, 1986	25 ± 2	aucune	n.i.	n.i.
Battelle, 1987	25 ± 2	aucune	n.i.	oui si ≤6.0 ou ≥9.0
Battelle, 1988	25 ± 2	aucune	n.i.	n.i.
ASTM, 1988	25 ± 1	légère au besoin	40 % ^d	n.i.
INRE, 1988	25 ± 1	aucune	n.i.	n.i.
Anonyme, 1989	25 ± 1	aucune	n.i.	n.i.
USEPA, 1989	25 ± 1	aucune	n.i.	n.i.

^a Plage.

^b Aérer l'échantillon avant l'essai, au besoin.

^c n.i. = Non indiqué.

^d Si la valeur de saturation est de 40 %, renouveler les solutions d'essai plus fréquemment. Dans chaque récipient, la moyenne pondérée en fonction du temps doit être d'au moins 50 % de la valeur de saturation.

9. Conditions d'éclairage pendant l'essai

Document	Photopériode (clarté/obscurité)	Intensité lumineuse	Type	Période de transition
USEPA, 1985a	16 h/8 h	ambiante (10–20 µE/m ² · s)	n.i. ^a	n.i.
Anonyme, 1986	16 h/8 h	« comme dans USEPA, 1985a »		
Battelle, 1986	16 h/8 h	540–1 607 lux	Fl ^b	n.i.
Battelle, 1987	16 h/8 h	ambiante (323–1 076 lux)	Fl	n.i.
Battelle, 1988	16 h/8 h	540–1 607 lux	Fl ^b	n.i.
ASTM, 1988	16 h/8 h	n.i.	n.i.	15–30 min ^c
INRE, 1988	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Anonyme, 1989	16 h/8 h	« comme dans USEPA, 1989 »		
USEPA, 1989	16 h/8 h	ambiante (10–20 µE/m ² · s)	n.i.	n.i.

^a n.i. = Non indiqué.

^b Fluorescent avec indice de rendu des couleurs ≥90.

^c Souhaitable pour réduire au minimum le stress causé par un changement brusque.

10. Surveillance de la qualité de l'eau pendant l'essai

Document	Variable ^a	Pendant l'exposition
USEPA, 1985a	OD, pH, T, CS, DT, AT	tous les jours ^b
Anonyme, 1986	OD, pH, T	jours 0, 2, 5 et 7
Battelle, 1986	OD, pH, T, CS	jours 0, 2, 4 et 7, jours 0, 3, 5 et 7 ou tous les jours
Battelle, 1987	OD, pH, T, CS, DT, AT	jour 0 + tous les jours
Battelle, 1988	OD, pH, T, CS	jours 0, 2, 4 et 7
	DT, AT	jours 0, 2 et 4
ASTM, 1988	OD, pH, T, CS, DT, AT	jours 0 et 7 ou plus souvent ^c
INRE, 1988	pH	jours 0 et 7
Anonyme, 1989	« comme dans USEPA, 1989 »	
USEPA, 1989	OD, pH, T	tous les jours ^d
	CS, DT, AT dans les nouveaux échantillons ^e	

^a AT= Alcalinité totale CS = Conductivité spécifique
DT= Dureté totale pH = Concentration d'ions hydrogène
T = Température

^b OD : au début et à la fin de la journée dans des récipients représentatifs. Dureté et alcalinité : dans la solution témoin et la concentration la plus élevée.

^c OD : dans les eaux usées d'essai du témoin et des concentrations élevée, médiane et faible, au moins au début, au milieu et à la fin de l'essai. Alcalinité et pH : au moins une fois dans l'eau fraîche et l'eau usée des concentrations élevées.

^d OD et pH : au début et à la fin de la journée dans des échantillons représentatifs.

^e Dans chaque nouvel échantillon (100 %) et dans le témoin.

11. Observations de variables biologiques pendant l'essai

Document	Variable	Pendant l'exposition
USEPA, 1985a	mortalité ^a , nombre de jeunes vivants	tous les jours
Anonyme, 1986	mortalité, nombre de jeunes vivants	jours 2, 5 et 7
Battelle, 1986	mortalité, nombre de jeunes	jours 2, 4 et 7 ou 3, 5 et 7
Battelle, 1987	mortalité, nombre de jeunes	jours 2, 4 et 7 ou 3, 5 et 7
Battelle, 1988	mortalité, nombre de jeunes	jours 2, 4 et 7 ou 3, 5 et 7
ASTM, 1988	mortalité, nombre de jeunes vivants, comportement (taille des femelles)	tous les jours ^b jour 7 (facultatif)
INRE, 1988	nombre de jeunes	jours 2, 4 et 7
Anonyme, 1989	mortalité, nombre de jeunes vivants	tous les jours
USEPA, 1989	mortalité, nombre de jeunes vivants	tous les jours

^a Mortalité des femelles adultes transférées au départ dans les récipients et mortalité des jeunes.

^b Ou au moins après la naissance de chacune des trois couvées produites pendant l'essai.

12. Paramètres de l'essai (après 7 jours, sauf indication contraire)

Document	Paramètres	Critères
USEPA, 1985a	CSEO, CMEO	mortalité présentant un écart significatif par rapport aux témoins, nombre de jeunes vivants ^a
Anonyme, 1986	satisfaisant/non satisfaisant, mortalité	≥20% dans n'importe quelle concentration
	satisfaisant/non satisfaisant, nombre de jeunes	différence significative par rapport aux témoins
	CSEO pour la réduction du nombre de jeunes	n.i. ^b
Battelle, 1986	n.i.	mortalité, nombre de jeunes
Battelle, 1987	CSEO, mortalité, nombre de jeunes	différence significative par rapport aux témoins
Battelle, 1988	n.i.	mortalité, nombre de jeunes
ASTM, 1988	CSEO, mortalité, nombre de jeunes	écart significatif par rapport aux témoins ^c
	CSEO, taille finale des adultes	écart significatif par rapport aux témoins
INRE, 1988	CI ₅₀ pour la réduction du nombre de jeunes	nombre dans la concentration/ chez les témoins
Anonyme, 1989	« comme dans USEPA, 1989 »	
USEPA, 1989	CSEO, CMEO	mortalité présentant un écart significatif par rapport aux témoins, nombre de jeunes vivants ^a
	CL ₅ , CL ₁₀ , CL ₅₀	mortalité, femelles adultes ^d
	CI ₂₅ , CI ₅₀	mortalité, nombre de jeunes vivants ^d

^a On compare les nombres de jeunes vivants pour les concentrations où la mortalité ne présente pas un écart significatif par rapport aux témoins. On calcule le nombre moyen pour chaque femelle (jusqu'à sa mort le cas échéant).

^b n.i. = Non indiqué.

^c Fondé sur un essai de 8 jours si la troisième couvée n'est pas produite en 7 jours. La concentration causant une réduction précise du rendement par rapport aux témoins constitue un critère facultatif.

^d Déterminée par une technique d'estimation ponctuelle (p. ex. probit, moyenne mobile, binomiale).

13. Validité de l'essai

Document	Mortalité maximale admissible chez les témoins	Reproduction acceptable chez les témoins (nombre de jeunes)
USEPA, 1985a	n.i. ^a	n.i.
Anonyme, 1986	20 %	>15 jeunes par femelle en 7 jours, abstraction faite des cas de mortalité
Battelle, 1986	20 %	≥3 couvées ou >15 jeunes par femelle en 7 jours
Battelle, 1987	n.i.	n.i.
Battelle, 1988	n.i.	n.i.
ASTM, 1988	20 %	≥15 jeunes par femelle en 3 couvées et en 8 jours au maximum; aucune éphippie
INRE, 1988	n.i.	n.i.
Anonyme, 1989	20 %	« comme dans ASTM, 1988 »
USEPA, 1989	20 %	≥15 jeunes par femelle ayant survécu

^a n.i. = Non indiqué.

Méthode de préparation du mélange de LCT et de la nourriture à base d'algues pour l'élevage de *Ceriodaphnia dubia*^a

Préparation de la nourriture pour truites digérée^b

- 1) La préparation de la nourriture pour truites prend une semaine. Utiliser des boulettes de début ou de catégorie n° 1.
- 2) Ajouter 5,0 g de boulettes de nourriture pour truites à 1 L d'eau désionisée (Milli-Q^{MC} ou l'équivalent). Bien combiner dans un mélangeur et verser dans un appareil à décantation de 2 L. Faire digérer avant emploi en assurant une aération continue à partir du fond du récipient pendant une semaine, à la température ambiante. L'eau perdue par évaporation devrait être remplacée pendant la digestion. En raison de l'odeur nauséabonde qui se dégage généralement pendant la digestion, le récipient devrait être placé sous une hotte ou dans un autre endroit isolé et ventilé.
- 3) À la fin de la période de digestion, réfrigérer le récipient et laisser décanter la préparation pendant au moins 1 h. Filtrer le surnageant au moyen d'un tamis à mailles fines (p. ex. Nitex^{MC}, 110 mesh) et le combiner à des volumes égaux de surnageant des préparations de Cerophyll^{MC} et de levure (v. ci-dessous). On peut utiliser le surnageant à l'état frais ou le congeler jusqu'au moment de son utilisation. Jeter le sédiment.

Préparation de la levure

- 1) Ajouter 5,0 g de levure sèche, par exemple de marque Fleischmann's^{MC}, à 1 L d'eau désionisée.
- 2) Remuer avec un agitateur magnétique, secouer vigoureusement à la main ou combiner dans un mélangeur à vitesse faible, jusqu'à ce que la levure soit bien dispersée.
- 3) Combiner immédiatement la suspension de levure (ne pas la laisser décanter) avec des volumes égaux de surnageant des préparations de nourriture pour truites et de Cerophyll (v. ci-dessous). Jeter les quantités inutilisées.

Préparation de la Cerophyll (feuilles de céréales séchées en poudre)

- 1) Déposer dans un mélangeur 5,0 g de Cerophyll ou de feuilles de céréales séchées en poudre^c. Les feuilles de luzerne séchées en poudre que l'on peut se procurer dans les magasins d'aliments naturels se sont avérées un substitut acceptable des feuilles de céréales.
- 2) Ajouter 1 L d'eau désionisée.

^a Tiré de USEPA, 1989.

^b Des chercheurs de l'Environmental Monitoring Systems Laboratory, de l'USEPA, à Cincinnati, OH, recommandent d'utiliser des aliments pour poissons tropicaux de marque Tetra-min^{MC}, que l'on trouve dans le commerce, comme substitut acceptable de la nourriture pour truites (J.M. Lazorchak et P.A. Lewis, comm. pers., 1991).

^c Offertes sous l'appellation « Cereal grass media » Cerophyll^{MC} par Ward's Natural Science (1-800-387-7822).

- 3) Mélanger à grande vitesse pendant 5 min ou agiter pendant la nuit à vitesse moyenne sur une plaque à agitateur magnétique.
- 4) Si l'on utilise un mélangeur pour préparer la suspension, réfrigérer cette dernière pendant la nuit et laisser décanter. Si l'on utilise un agitateur magnétique, laisser le mélange décanter pendant 1 h. Décanter le surnageant et le combiner avec des volumes égaux de surnageant des préparations de nourriture pour truites et de levure. Jeter les quantités inutilisées.

Préparation du mélange de LCT

- 1) Mélanger des volumes égaux (environ 300 mL) des trois aliments décrits ci-dessus.
- 2) Placer des aliquotes du mélange dans des petites bouteilles en plastique à bouchon à vis (50–100 mL).
- 3) On peut utiliser immédiatement les aliments fraîchement préparés ou les congeler jusqu'à ce que l'on en ait besoin. Les aliments dégelés doivent être conservés au réfrigérateur entre les utilisations, pendant une durée maximale de deux semaines.
- 4) Il est conseillé de mesurer la masse sèche des solides dans chaque lot de mélange de LCT avant emploi. La nourriture devrait renfermer entre 1,7 et 1,9 g de solides par litre. Les solutions utilisées pour les élevages et les essais devraient renfermer entre 12 et 13 mg de solides par litre.

Préparation de la nourriture à base d'algues (*P. subcapitata*)

A. Milieu de culture des algues

- 1) Préparer cinq solutions mères nutritives à partir des substances chimiques de qualité réactif énumérées au tableau D.1.
- 2) Ajouter 1 mL de chaque solution mère, selon l'ordre indiqué au tableau D.1, à environ 900 mL d'eau désionisée. Bien mélanger après chaque addition. Porter le volume à 1 L, bien mélanger de nouveau et rajuster le pH pour qu'il s'établisse à $7,5 \pm 0,1$ à l'aide d'une solution de NaOH ou de HCl 1 N, selon le cas. La concentration finale de macronutriments et de micronutriments dans le milieu de culture est indiquée au tableau D.2.
- 3) Filtrer immédiatement le milieu à pH rajusté à l'aide d'une membrane à pores de $0,45 \mu\text{m}$, sous un vide d'au plus 380 mm de mercure ou à une pression d'au plus une demi-atmosphère. Laver le filtre avec 500 mL d'eau désionisée avant de l'utiliser.
- 4) Si la filtration est effectuée au moyen d'un appareil stérile, le milieu filtré peut être utilisé immédiatement et aucune autre mesure de stérilisation n'est nécessaire avant son inoculation. Le milieu peut également être stérilisé à l'autoclave après avoir été transféré dans les récipients de culture.
- 5) Le milieu stérile inutilisé ne devrait pas être entreposé pendant plus d'une semaine avant emploi, en raison de la possibilité de pertes d'eau importantes par évaporation.

Tableau D.1. Solutions mères nutritives pour le maintien des cultures mères d'algues

Solution mère nutritive	Composé	Quantité dissoute dans 500 mL d'eau désionisée
1	MgCl ₂ · 6H ₂ O	6,08 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,20 g
	H ₃ BO ₃	92,8 mg
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	208,0 mg
	ZnCl ₂	1,64 mg ^a
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	79,9 mg
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,714 mg ^b
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3,63 mg ^c
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,006 mg ^d
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	150,0 mg
2	NaNO ₃	12,75 g
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,35 g
4	K ₂ HPO ₄	0,522 g
5	NaHCO ₃	7,50 g

^a ZnCl₂ – Peser 164 mg et porter le volume à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

^b CoCl₂ · 6H₂O – Peser 71,4 mg et porter le volume à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

^c Na₂MoO₄ · 2H₂O – Peser 36,3 mg et porter le volume à 10 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

^d CuCl₂ · 2H₂O – Peser 60,0 mg et porter le volume à 1 000 mL. Prendre 1 mL de cette solution et porter le volume à 10 mL. Prendre 1 mL de la deuxième solution et l'ajouter à la solution mère n° 1.

B. Démarrage et maintien de cultures mères d'algues

- 1) Sur réception du milieu de culture de départ (généralement, environ 10 mL), on démarre une culture mère en transférant aseptiquement 1 mL dans chacun des flacons de culture de 250 mL renfermant 100 mL de milieu de culture d'algues (préparé selon la description ci-dessus). Le reste de la culture de départ peut être mis en réserve jusqu'à 6 mois au réfrigérateur (dans l'obscurité), à 4 °C.
- 2) Les cultures mères sont utilisées comme sources d'algues pour le démarrage des cultures « alimentaires » utilisées dans les essais toxicologiques avec des daphnies du genre *Ceriodaphnia*. Le volume des cultures mères à maintenir dépend de la quantité d'algues nécessaire pour l'élevage des daphnies et pour les essais. Il peut rapidement être porté à plusieurs litres, au besoin, à l'aide de bouteilles à sérum de 4 L ou de récipients semblables renfermant chacun 3 L de milieu de croissance.
- 3) La température de culture n'est pas un facteur crucial. Les cultures mères peuvent être maintenues à une température se situant entre 20 et 25 °C dans des enceintes environnementales avec des cultures d'autres organismes si l'éclairage est adéquat [éclairage fluorescent « blanc froid » continu d'environ 4 300 lux (ou 400 pieds-bougies)].

Tableau D.2. Concentration finale de macronutriments et de micronutriments dans le milieu de culture

Macronutriment	Concentration (mg/L)	Élément	Concentration (mg/L)
NaNO ₃	25,5	N	4,20
MgCl ₂ · 6H ₂ O	12,2	Mg	2,90
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,41	Ca	1,20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14,7	S	1,91
K ₂ HPO ₄	1,04	P	0,186
NaHCO ₃	15,0	Na	11,0
		K	0,469
		C	2,14

Micronutriment	Concentration (µg/L)	Élément	Concentration (µg/L)
H ₃ BO ₃	185	B	32,5
MnCl ₂ · 4H ₂ O	416	Mn	115
ZnCl ₂	3,27	Zn	1,57
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,43	Co	0,354
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012	Cu	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,26	Mo	2,88
FeCl ₃ · 6H ₂ O	160	Fe	33,1
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	300	—	—

- 4) Les cultures sont mélangées deux fois par jour, à la main.
- 5) Les cultures mères peuvent être conservées au réfrigérateur jusqu'à ce qu'elles soient utilisées pour le démarrage des cultures « alimentaires » ou peuvent être transférées dans un nouveau milieu une fois par semaine. On transfère la culture mère d'algues âgée de 7 jours, renfermant environ $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre, à raison de 1–3 mL par volume de 100 mL de milieu de culture frais. L'inoculum devrait fournir une densité cellulaire initiale de l'ordre de 10 000–30 000 cellules par millilitre dans les nouvelles cultures mères. Il faut prendre soin d'éviter la contamination par d'autres micro-organismes.
- 6) On devrait examiner les cultures mères chaque semaine au microscope, au moment du transfert, afin de repérer les cas de contamination microbienne. Les quantités en réserve d'organismes de culture peuvent être conservées entre 6 et 12 mois si elles sont gardées dans l'obscurité à 4 °C. Il est conseillé de préparer, tous les 4–6 mois, de nouvelles cultures mères à partir des cultures de départ obtenues auprès de sources extérieures reconnues.

C. Démarrage et maintien de cultures « alimentaires » d'algues

- 1) Les cultures « alimentaires » sont mises en route 7 jours avant d'être utilisées dans les élevages de *Ceriodaphnia* ou dans les essais. On ajoute environ 20 mL d'une culture mère d'algues âgée de 7 jours (v. la section B ci-dessus), renfermant $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre, à chaque litre de milieu de culture d'algues frais (à savoir 3 L de milieu dans une bouteille de 4 L, ou 18 L dans une bouteille de 20 L). L'inoculum devrait fournir une densité cellulaire initiale de l'ordre de 30 000 cellules par millilitre. Des techniques aseptiques devraient être utilisées pour la préparation et le maintien des cultures. Il faut prendre soin d'éviter la contamination par d'autres micro-organismes.
- 2) Les cultures alimentaires peuvent être conservées dans des enceintes environnementales à une température se situant entre 20 et 25 °C, avec les cultures mères d'algues ou des cultures d'autres organismes si l'éclairage est adéquat (éclairage fluorescent « blanc froid » continu d'environ 4 300 lux).
- 3) Les cultures sont mélangées en continu sur une plaque d'agitation magnétique (barreau d'agitation de taille moyenne) ou dans un appareil à décantation modérément aéré; on peut également les mélanger deux fois par jour à la main. Il faut prendre soin d'éviter que la température des cultures n'augmente de plus de 2–3 °C^d.

D. Préparation d'un concentré d'algues pour l'alimentation de *Ceriodaphnia*

- 1) À partir des cultures alimentaires, on prépare un concentré d'algues renfermant $3,0\text{--}3,5 \times 10^7$ cellules par millilitre en centrifugeant les algues avec une centrifugeuse à plancton ou à godets ou en laissant les cultures décanter dans un réfrigérateur pendant au moins 10 jours et au plus 3 semaines et en siphonnant le surnageant.
- 2) On mesure la densité cellulaire (cellules par millilitre) du concentré à l'aide d'un compte-particules électronique, d'un microscope et d'un hémocytomètre, d'un fluoromètre ou d'un spectrophotomètre. La valeur ainsi établie sert à déterminer la dilution (ou la concentration supplémentaire) nécessaire pour atteindre une densité cellulaire finale de $3,0\text{--}3,5 \times 10^7$ cellules par millilitre.
- 3) En supposant une densité cellulaire d'environ $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre dans les cultures alimentaires d'algues de 7 jours et une récupération à 100 % au cours du processus de concentration, une culture de 3 L âgée de 7–10 jours assurera une densité cellulaire de $4,5 \times 10^9$. Ce nombre de cellules fournira environ 150 mL de concentré cellulaire d'algues pour l'alimentation des élevages de *Ceriodaphnia* (1 500 portions de 0,1 mL). Cette quantité est suffisante pour quatre essais avec *Ceriodaphnia*.
- 4) Le concentré d'algues peut être conservé au réfrigérateur jusqu'à un mois.

^d Si les cultures sont déposées sur une plaque d'agitation magnétique, la chaleur dégagée par l'agitateur pourrait hausser leur température de plusieurs degrés.

Annexe E

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais toxicologiques^a

Colonne (nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1) ^b						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

^a Modifié d'après Rocchini et coll. (1982).

^b Dans une colonne, on devrait choisir une série d'au moins sept concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage (volume ou masse) ou en masse par unité de volume (mg/L ou µg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par n'importe quelle puissance de 10. On pourrait utiliser la première colonne si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. Il n'est pas recommandé d'utiliser des concentrations plus largement espacées. Pour les essais sur des effluents, on augmente rarement le gain de précision en choisissant les concentrations d'une colonne à droite de la colonne 3. Les valeurs plus rapprochées des colonnes 4 à 7 pourraient parfois être utiles pour les essais sur des produits chimiques dont le seuil d'effet est abrupt.

Analyse de la mortalité en vue de l'estimation de la concentration létale médiane

Si les données le permettent, la CL_{50} (et ses limites de confiance à 95 %) pour les daphnies de la première génération doit être calculée en fonction du pourcentage moyen de mortalité dans chaque concentration expérimentale à la fin de l'essai (v. 4.6). Le responsable de l'essai pourrait aussi vouloir estimer la CL_{50} pour des périodes d'exposition plus courtes (p. ex. CL_{50} 24 h, CL_{50} 48 h, CL_{50} 96 h). Les procédures universelles d'estimation d'une CL_{50} sont résumées ci-dessous; on trouvera des indications détaillées à la section 4 de EC (2005).

Pour estimer la CL_{50} , on combine les données recueillies pour toutes les répétitions de chaque concentration. Lorsque la mortalité n'est pas égale ou supérieure à 50 % dans au moins une concentration, il est impossible d'estimer la CL_{50} . Lorsque la mortalité est nulle à une certaine concentration, ce renseignement est appliqué à l'ajustement de la courbe de probit, cette valeur étant associée à un effet de 0 % de mortalité. Cependant, lorsque la mortalité est nulle dans une série de concentrations successives, une seule de ces valeurs devrait être utilisée pour l'estimation de la CL_{50} , et elle constituera le résultat associé à la plus forte concentration, c'est-à-dire la valeur qui est « la plus près du centre » de l'intervalle de distribution des données. De la même façon, s'il y avait une série de taux de mortalité de 100 % aux concentrations élevées dans un essai, une seule valeur correspondant à un effet de 100 % serait utilisée; là encore, ce serait celle qui est « le plus près du centre » de l'intervalle des valeurs, c'est-à-dire l'effet à la plus faible de ces concentrations. L'utilisation d'une seule valeur correspondant à 0 % et d'une seule valeur correspondant à 100 % d'effet s'applique à l'analyse des données au moyen d'un programme informatique ou à l'établissement manuel d'un graphique (v. ci-après). L'utilisation de valeurs additionnelles de 0 % et/ou de 100 % pourrait fausser l'estimation de la CL_{50} .

On peut utiliser différents programmes informatiques pour calculer la CL_{50} et ses limites de confiance. Stephan (1977) a mis au point un programme de calcul de la CL_{50} qui fait appel à trois méthodes (probits, moyenne mobile, binomiale) et l'a adapté aux ordinateurs personnels compatibles IBM. Il est recommandé d'utiliser ce programme en BASIC; avec la permission de Charles E. Stephan (USEPA, Duluth, MN), il est possible d'en obtenir une copie en envoyant une disquette à Environnement Canada (v. les adresses à l'annexe B). On peut également se procurer un programme efficace d'analyse des probits sur micro-ordinateur auprès de J.J. Hubert (1987); en outre, on peut utiliser d'autres méthodes manuelles et informatiques qui donnent des résultats satisfaisants (APHA et coll., 1989, 2005; USEPA, 1989, 1994, 2002). Des programmes qui font appel à la méthode d'équantage de Spearman-Kärber (Hamilton et coll., 1977) sont disponibles pour les ordinateurs personnels, mais il faudrait les utiliser avec circonspection (EC, 2005), car les personnes qui ne connaissent pas bien les incidences de l'équantage des données dose-réponse pourraient obtenir des résultats divergents.

Le programme de Stephan (1977), que nous recommandons, fournit des estimations de la CL_{50} et des limites de confiance selon chacune des trois méthodes qu'il utilise, pourvu que l'ensemble de données comprenne au moins deux cas où une partie des daphnies sont mortes. Avec des données uniformes ou régulières, les trois estimations seront sans doute semblables (v. ci-après), et les valeurs fournies par l'analyse des probits devraient être privilégiées par rapport aux autres et consignées dans le rapport d'essai. L'estimation à l'aide de la méthode binomiale pourrait différer quelque peu des autres. Lorsqu'il

n'y a pas, dans les résultats, deux cas où une partie des daphnies sont mortes, seule la méthode binomiale fonctionne; elle peut être appliquée à l'obtention de la meilleure estimation possible de la CL_{50} , avec des limites de confiance prudentes (larges).

Toute CL_{50} qui résulte de calculs informatiques devrait être vérifiée au moyen d'un graphique, sur échelle de probabilité logarithmique, du pourcentage de mortalité après un temps d'observation donné (p. ex. 96 h) aux différentes concentrations expérimentales (APHA et coll., 1989, 2005; v. l'exemple à la figure F.1). Tout écart important entre la CL_{50} estimée au moyen de ce graphique et la valeur calculée par ordinateur doit être résolu.

Dans l'exemple théorique montré à la figure F.1, 10 daphnies ont été exposées à chacune des 5 concentrations suivantes : 1,8, 3,2, 5,6, 10 et 18 mg/L. Les pourcentages de mortalité correspondant au nombre d'organismes morts (0, 2, 4, 9, et 10) ont été inscrits sur le graphique et l'on a tracé une ligne ajustée à l'œil. On a pu établir la concentration que l'on prévoyait être létale pour 50 % des organismes en suivant la ligne pointillée à partir du niveau de 50 % jusqu'à son intersection avec la ligne ajustée à l'œil, puis vers le bas jusqu'à l'axe horizontal; on a ainsi obtenu une CL_{50} estimative de 5,6 mg/L.

En traçant une ligne comme celle de la figure F.1, on devrait attribuer relativement plus d'importance aux points qui sont proches de 50 % de mortalité. On peut se procurer du papier graphique de probabilité logarithmique (« log-probit », comme à la figure F.1) dans toutes les bonnes librairies à vocation technique, ou en commander par leur entremise.

Les programmes informatiques ont donné des estimations très proches de celle fournie par le graphique, à partir de données régulières de la figure F.1. Les CL_{50} (et leurs limites de confiance à 95 %) étaient les suivantes :

Analyse des probits de Hubert (1987) :		5,56 (4,28–7,21)
Stephan (1977)	probits :	5,58 (4,24–7,37)
	moyenne mobile :	5,58 (4,24–7,33)
	binomiale :	6,22 (1,8–10)
Méthode de Spearman-Kärber (Hamilton et coll., 1977)	équeutage de 0 % :	5,64 (4,38–7,26)
	équeutage de 10 % :	5,73 (4,34–7,58)
	équeutage de 20 % :	5,95 (4,34–9,80)

La méthode binomiale n'a pas donné d'estimation des limites de confiance, mais elle a permis de choisir deux concentrations d'essai comme limites extérieures d'une plage à l'intérieur de laquelle se trouveraient les vraies limites de confiance.

On peut aussi, si on le souhaite, estimer le temps léthal 50 (TL_{50}) à une concentration donnée. Pour cela, on trace un graphique semblable à celui de la figure F.1 en portant le logarithme du temps sur l'axe horizontal. Les temps précis de la mort des organismes pourraient être utilisés, mais ils sont rarement connus puisque les essais ne sont pas surveillés en permanence. Le pourcentage cumulatif de mortalité aux différentes observations successives donne des résultats tout à fait satisfaisants pour l'établissement du graphique, et une ligne ajustée à l'œil permet d'estimer les limites de confiance lorsqu'on suit la

démarche décrite dans Litchfield (1949). Lorsque les données le permettent, ces TL_{50} pourraient être estimés à partir de relevés successifs de la mortalité à intervalles de 24 h. La mortalité observée doit être supérieure à 50 % pour que l'on puisse estimer le TL_{50} .

Ni le TL_{50} ni le pourcentage de mortalité après de courtes périodes d'exposition ne constituent une méthode fiable pour établir la toxicité définitive; c'est pourquoi des comparaisons qui s'appuient sur ces paramètres ne donnent que des indications semi-quantitatives. Toutefois, il pourrait parfois être utile d'indiquer si la substance ou la matière d'essai ont un effet létal rapide ou lent. Ainsi, cet élément d'information pourrait servir à déterminer si des dépassements de concentrations à court terme sont admissibles par rapport à une limite à long terme prévue dans un règlement. En principe, le fait d'établir un TL_{50} au lieu d'une CL_{50} peut conduire à une utilisation encore plus complète de l'information tirée des essais, et une courbe de létalité en fonction du temps et de la concentration pourrait se révéler utile pour l'examen des mécanismes d'effet des substances toxiques (Sprague, 1969; Suter et coll., 1987).

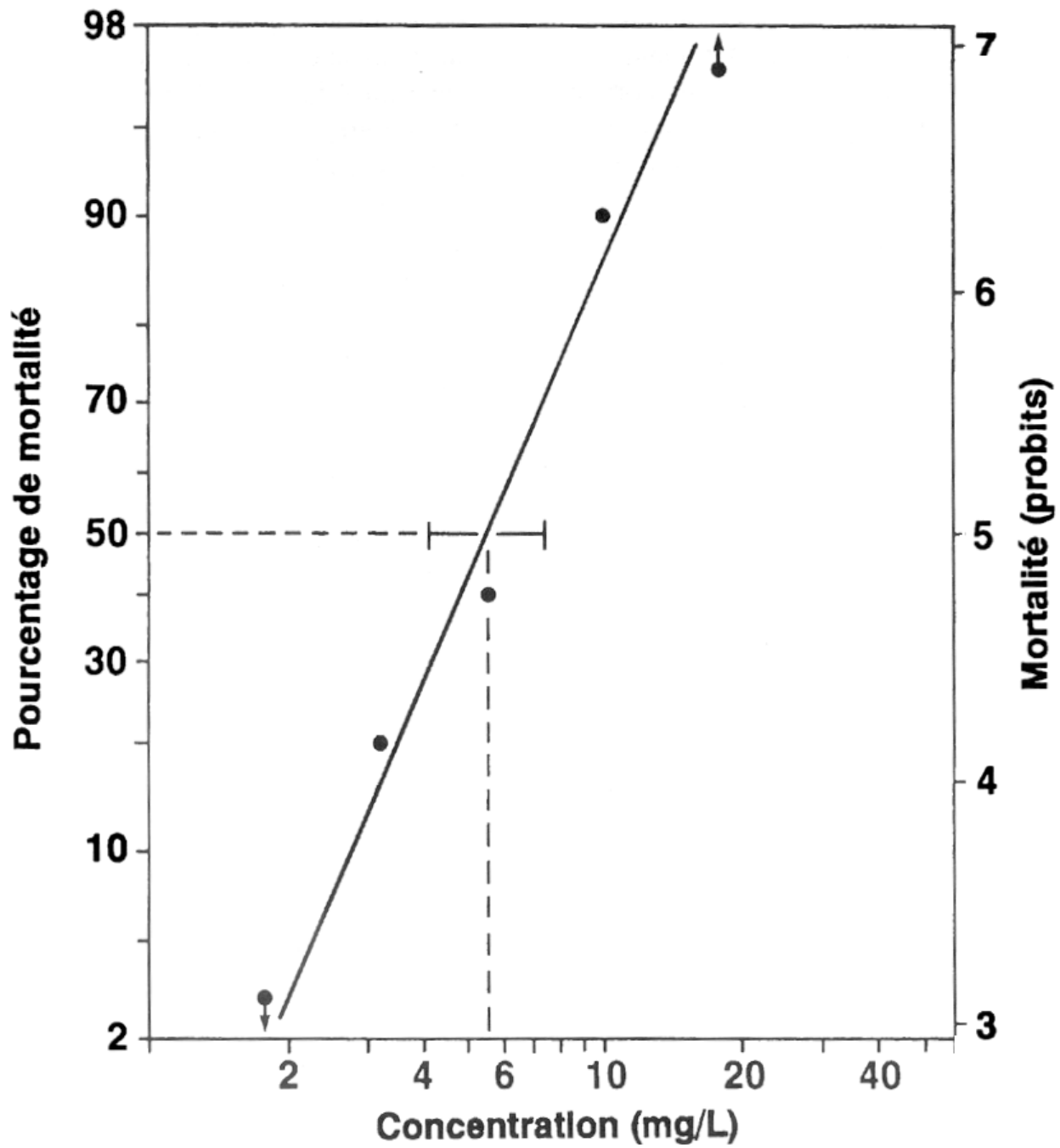


Figure F.1 Estimation d'une concentration létale médiane (CL_{50}) par la représentation graphique de la mortalité sur papier de probabilité logarithmique

Annexe H

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada^a

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur <i>Daphnia</i> spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie du cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21 2 ^e édition	Février 2007	—
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22	Février 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente <i>Photobacterium phosphoreum</i>	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce	SPE 1/RM/25 2 ^e édition	Mars 2007	—
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27	Décembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique)	SPE 1/RM/28 1 ^{re} édition	Décembre 1992	Janvier 1995
Essai de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2 ^e édition	Juillet 1998	—

^a Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Services des communications, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada. Pour en commander des copies papier, prière d'envoyer un courriel à epspubs@ec.gc.ca. Il est également possible de les télécharger gratuitement en format PDF à partir de l'adresse suivante : http://www.etc-etc.gc.ca/organization/bmd/bmd_publist_f.html. Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le chef de la Division des méthodes biologiques, Centre des sciences et technologies environnementales, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)			
Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (<i>Chironomus tentans</i> ou <i>Chironomus riparius</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	—
Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyaella azteca</i> dans les sédiments	SPE 1/RM/33	Décembre 1997	—
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37 2 ^e édition	Janvier 2007	—
Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides (<i>Polydora cornuta</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	—
Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre <i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia fetida</i> ou <i>Lumbricus terrestris</i>	SPE 1/RM/43	Juin 2004	—
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Février 2005	—
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol (titre provisoire)	SPE 1/RM/47	Décembre 2006	—
B. Méthodes de référence^b			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 1 ^{re} édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2 ^e édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 1 ^{re} édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 2 ^e édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/35	Décembre 1998	—
Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	—

^b Dans le présent contexte, on définit une *méthode de référence* comme étant une méthode d'essai biologique spécifique en vue de la réalisation d'un essai de toxicité, respectant une série de conditions expérimentales et de modes opératoires décrits avec précision dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique génériques (polyvalentes ou « universelles ») publiées par Environnement Canada, les *méthodes de référence* sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
C. Documents d'orientation			
Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence	SPE 1/RM/12	Août 1990	—
Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques	SPE 1/RM/29	Décembre 1994	—
Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence	SPE 1/RM/30	Septembre 1995	—
Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats	SPE 1/RM/34	Décembre 1999	—
Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres	SPE 1/RM/44	Mars 2004	—
Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité	SPE 1/RM/46	Mars 2005	—