

**SPE 1/RM/14 Deuxième Édition - Décembre 2000**  
Section de l'élaboration des méthodes et des applications  
Centre de technologie environnementale  
Environnement Canada



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

## **Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna***



Environnement  
Canada

Environment  
Canada

Canada

# **Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna***

Section de l'élaboration des méthodes et des applications  
Centre de technologie environnementale  
Environnement Canada  
Ottawa (Ontario)

Méthode de référence SPE 1/RM/14  
DEUXIÈME ÉDITION  
Décembre 2000

**Données de catalogue avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada**

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique. Méthode de référence pour  
la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez  
*Daphnia magna*

2<sup>e</sup> éd.

(Méthode de référence ; SPE 1/RM/14)

Texte en français et en anglais disposé tête-bêche.

Titre de la p. de t. addit.: Biological test method.

Reference method for determining acute lethality  
of effluents to *Daphnia magna*.

ISBN 0-660-61649-1

No. de cat. En49-24/1-14-2001

1. Daphnies -- Mortalité -- Essais -- Normes -- Canada.
  2. Daphnies -- Microbiologie -- Normes -- Canada.
  3. Effluents -- Qualité -- Essais -- Normes -- Canada.
- I. Canada. Environnement Canada.  
II. Centre de technologie environnementale (Canada)  
III. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/14.

QL444.B56 2001      595.3'2      C2001-980198-XF

## **Commentaires des lecteurs**

---

Pour formuler des commentaires sur le contenu de la présente méthode de référence, s'adresser à:

M. Richard Scroggins  
Section de l'élaboration des méthodes et des applications  
Environnement Canada  
335 River Road  
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 a été approuvé pour publication. La mention de marques de commerce ou de produits commerciaux ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable sont disponibles.



## Résumé

---

*Le présent document décrit en termes explicites une méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez le crustacé *Daphnia magna* (« puce d'eau »). Il donne des instructions précises pour l'exécution d'essais de létalité aiguë portant sur des échantillons d'effluents et pour la présentation des résultats de ces essais. Les lignes directrices données dans le document de méthodologie intitulé : *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë sur *Daphnia* spp. (EC, 1990a avec modifications apportées en mai 1996)* ont été incluses.*

*Le présent rapport est la deuxième édition de la Méthode de référence SPE 1/RM/14 publiée en juillet 1990, à laquelle des modifications ont été apportées en mai 1996 (EC, 1990b - comprend les modifications de mai 1996). Cette méthode remplace la version précédente et doit être appliquée comme la méthode de référence actuelle d'Environnement Canada pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*.*

*Trois méthodes sont exposées: 1) pour un essai à concentration unique portant sur l'effluent non dilué, sauf indication contraire; 2) pour un essai à concentrations multiples visant à déterminer la concentration létale 50 (CL50) de l'effluent; 3) pour un essai portant sur un produit toxique de référence. Des instructions sont fournies concernant la détention et l'élevage des daphnies, les installations et l'approvisionnement en eau, la manipulation et le stockage des échantillons, la préparation des solutions, les conditions de l'essai, les observations à faire, les résultats de l'essai et les méthodes de calcul connexes ainsi que l'utilisation de produits toxiques de référence.*

## Avant-propos

---

*Ce rapport fait partie de la collection des **méthodes de référence** pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets toxiques sur une seule espèce d'organismes aquatiques ou terrestres exposés à des échantillons de matières ou de substances d'essai dans des conditions de laboratoire définies et contrôlées.*

*Dans le présent document, une **méthode de référence** est définie comme une méthode d'essai biologique spécifique pour conduire un essai de toxicité, c'est-à-dire une méthode d'essai qui donne un ensemble d'instructions et de conditions détaillées dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes (générales) publiées par Environnement Canada, l'utilisation d'une **méthode de référence** se résume fréquemment aux exigences associées à des règlements précis.*

*Les **méthodes de référence** sont celles qui ont été développées et publiées par Environnement Canada (EC) et sont privilégiées :*

- en vue de l'application des règlements dans les laboratoires de toxicité environnementale des agences fédérales et provinciales;*
- pour des essais de toxicité à des fins de réglementation confiés par Environnement Canada à des laboratoires externes ou demandés par des agences externes ou l'industrie;*
- pour incorporation dans les règlements ou permis fédéraux, provinciaux ou municipaux, comme exigence de surveillance réglementaire;*
- comme base pour la stipulation d'instructions très explicites.*

## Table des matières

---

<b>Résumé</b> .....	v
<b>Avant-propos</b> .....	vi
<b>Glossaire</b> .....	ix
<b>Remerciements</b> .....	xii
 <i>Section 1</i>	
<b>Introduction</b> .....	1
 <i>Section 2</i>	
<b>Élevage des organismes</b> .....	3
2.1 Procédés d'élevage .....	3
2.2 Eau .....	4
2.3 Conditions physico-chimique .....	4
 <i>Section 3</i>	
<b>Installations</b> .....	6
 <i>Section 4</i>	
<b>Mode opératoire générale pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents</b> .....	7
4.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons .....	7
4.2 Conditions de l'essai .....	7
4.3 Préparation des solutions d'essai .....	8
4.4 Mise en route de l'essai .....	9
4.5 Observations et mesures .....	10
 <i>Section 5</i>	
<b>Mode opératoire pour la détermination du taux de mortalité après 48 h dans un essai à concentration unique</b> .....	11
 <i>Section 6</i>	
<b>Mode opératoire pour la détermination de la CL50 – 48 h dans un essai à concentrations multiples</b> .....	12
 <i>Section 7</i>	
<b>Mode opératoire pour l'essai avec un produit toxique de référence</b> .....	13
 <i>Section 8</i>	
<b>Présentation des résultats</b> .....	15
8.1 Données à consigner au procès-verbal .....	15
8.1.1 Effluent .....	15
8.1.2 Installations et conditions de l'essai .....	15
8.1.3 Résultats .....	16



8.2	Données à verser au dossier .....	16
8.2.1	Effluent .....	16
8.2.2	Installations et conditions de l'essai .....	17
8.2.3	Résultats .....	18
	<b>Références .....</b>	<b>19</b>

*Annexe*

<b>Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale et adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada .....</b>	<b>21</b>
---	-----------

## Glossaire

---

Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux modes opératoires énoncées dans la présente méthode de référence; les autres définitions figurant dans le document d'accompagnement détaillé (EC, 1990a, avec modifications apportées en mai 1996) s'y appliquent aussi.

### Termes grammaticaux

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) et *il faut* sont utilisés pour exprimer une obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait* (*devraient*) et le mode conditionnel (*il faudrait*, etc.) sont utilisés pour indiquer que la condition ou la méthode en cause est recommandée et doit être respectée dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut* (*peuvent*) indique qu'on est autorisé à faire une chose ou en mesure de le faire.

### Termes techniques

*Aigu* - Survenant dans un bref délai, normalement  $\leq 48$  h dans le cas des daphnies.

*CE50* - Concentration efficace 50, soit la concentration dans l'eau d'une substance qui est censée causer un effet particulier, létal ou non létal, pour 50 % des organismes soumis à l'essai. L'effet particulier doit être précisé, ainsi que la durée d'exposition (p. ex., CE50 d'inhibition de la mobilité après 48 h).

*CL50* - Concentration létale 50, soit la concentration dans l'eau d'une substance (dans le cas présent, un effluent) qui est censée être létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % sont généralement obtenues par l'analyse statistique des pourcentages de mortalité dans plusieurs concentrations d'essai, après une période fixe d'exposition qui doit être précisée (p. ex., CL50 – 48h).

*Conductivité* - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. 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 s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en  $\mu\text{mhos/cm}$  ( $1 \text{ mS/m} = 10 \mu\text{mhos/cm}$ ).

*Contrôle* - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans un essai de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais ne pas renfermer la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison de conditions de base de l'essai, telles que la qualité de l'eau de dilution et l'état de santé ou la manipulation des organismes soumis à l'essai.

*Dureté* - Concentration des cations dans l'eau qui réagira avec un savon sodique pour précipiter un résidu insoluble. En général, la dureté est une mesure des concentrations d'ions calcium et magnésium dans l'eau, exprimée en mg/L de carbonate de calcium.

*Eau de contrôle/de dilution* - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter et pour l'essai de contrôle.

*Eau déchlorée* - Eau chlorée (généralement, eau potable du réseau d'alimentation municipale) qui a été traitée afin d'en éliminer le chlore et les composés chlorés.

*Eau désionisée* - Eau purifiée par passage dans les colonnes de résine ou par osmose inverse afin d'en extraire les ions et de la purifier.

*Eau reconstituée* - Eau pure désionisée ou distillée au 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, l'alcalinité et la dureté souhaités.

*Effluent* - Tout déchet liquide (industriel ou urbain) rejeté dans l'environnement aquatique.

*Élevage* - Ensemble des animaux qu'on élève dans des conditions contrôlées afin d'obtenir, par reproduction, un stock de génitrices.

*Éphippium* - Sac ovigère qui se forme sous la partie postéro-dorsale de la carapace de la daphnie femelle adulte, dans des conditions d'élevage difficiles. Les oeufs qui s'y trouvent ont généralement été fertilisés par reproduction sexuelle.

*Immobilité* - Inaptitude à la nage pendant les 15 secondes suivant une légère agitation de la solution d'essai, même si les daphnies peuvent encore bouger leurs antennes.

*Létal* - Qui entraîne la mort par action directe. Dans le cas de la daphnie, on entend par « mort » la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité, notamment en ce qui concerne les antennes, les pattes abdominales et le battement cardiaque observés au microscope.

*Lux* - Unité SI d'éclairement, mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie; 1 pied-bougie = 10,76 lux.

*Méthode de référence* - Méthode d'essai biologique spécifique pour réaliser un essai de toxicité, c'est-à-dire une méthode d'essai comportant un ensemble d'instructions et de conditions explicites stipulées dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essais biologiques polyvalentes publiées par Environnement Canada, une *méthode de référence* est fréquemment utilisée aux seules fins de tester les exigences associées à des règlements précis; ou tester dans le but de déterminer s'il y a violation des dispositions générales de la Loi canadienne sur les pêches.

*Néonate* - daphnie « née » depuis peu, c.-à-d. au premier stade larvaire, âgée de 24 h ou moins.

*pH* - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en équivalents grammes par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acides et alcalines selon une échelle de 0 à 14, où le nombre 7 représente la neutralité et les nombres inférieurs correspondent, en ordre décroissant, à des réactions acides de plus en plus fortes. Les chiffres supérieurs à indiquent, en ordre croissant, des réactions basiques ou alcalines de plus en plus fortes.

*Photopériode* - Durée d'éclairement et d'obscurité au cours d'un cycle de 24 h.

*Prétraitement* - Dans le présent rapport, traitement d'un échantillon ou de sa dilution avant l'exposition des daphnies.

*Produit toxique de référence* - Étalon chimique utilisé pour évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai aux limites de confiance établies pour les données de toxicité obtenues pour une matière ou un produit soumis à un essai. Dans la plupart des cas, un essai de toxicité avec un produit de référence est exécuté pour évaluer la sensibilité des organismes au moment où l'on évalue la matière d'essai et la précision des résultats obtenus par le laboratoire avec ce produit chimique.

*Salinité* - Quantité totale, en grammes, de substances solides dissoutes dans 1 kg d'eau. Elle se détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toutes les matières organiques. La salinité peut aussi se mesurer directement grâce à un salinimètre/conductimètre ou par d'autres moyens (APHA *et al.*, 1989). Elle s'exprime habituellement en grammes par kilogramme ou en parties par mille (‰).

*Stock de génitrices* - Groupe de génitrices élevées pour la reproduction de organismes d'essai.

*Sublétales* - Nocif pour les daphnies, mais en deçà du niveau qui entraîne directement la mort pendant la durée de l'essai.

*Toxicité* - Potentiel ou capacité propre d'une substance de provoquer un ou des effets nocifs chez les daphnies ou autres organismes vivants. Le (ou les) effet(s) peut(ent) être létales ou sublétales.

## Remerciements

---

La première édition de ce rapport, imprimée en juillet 1990 et à laquelle des modifications ont été apportées en mai 1996 (EC, 1996b), a été réalisée par D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario). M. R. Scroggins and M.G. Sergy (SPE, Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont pourvu aux orientations et à l'aide technique.

La première édition a été établie en fonction des objectifs, des besoins et des commentaires d'un sous-comité du Service de la protection de l'environnement (SPE) formé de: N. Bermingham (SPE, Montréal); C. Blaise (SPE, Longueuil); G. Coulombe (SPE, Montréal); K. Doe (SPE, Dartmouth); G. Elliott (SPE, Edmonton); D. Macgregor (SPE, Ottawa); J. MacLatchy (SPE, Ottawa); W. Parker (SPE, Dartmouth); D. Robinson (Pêches et Océans Canada, Ottawa); T. Ruthman (SPE, Ottawa); R. Scroggins (SPE, Ottawa); G. Sergy (SPE, Edmonton); et R. Watts (SPE, North Vancouver). Les représentants des provinces au sein du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique, en place en 1990, ont apporté à l'époque une centralisation et des commentaires fort utiles (G. Joubert, ministère de l'Environnement du Québec; G. Westlake, ministère de l'Environnement de l'Ontario; W. Young, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba; K. Lauten, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan; J. Somers, ministère de l'Environnement de l'Alberta; S. Horvath et G. van Aggelen, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique). Les personnes suivantes ont également revu les versions préliminaires de la première édition et contribué à sa publication: D. Vaughan (SPE, Dartmouth); S. Wade (SPE, Dartmouth); A. Beckett (SPE, Edmonton); F. Zaal (SPE, Edmonton); S. Yee (SPE, North Vancouver); D. Moul (SPE, North Vancouver); V. Zitko (Pêches et Océans Canada, St. Andrews); V. Cairns (Pêches et Océans Canada, Burlington); S. Samis (Pêches et Océans Canada, Vancouver); R. Martion (ministère de l'Environnement et des Terres de Terre-Neuve, St. John's); J. Lee (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale); J. Moores (ministère de l'Environnement de l'Alberta, Vegreville); P. Martel (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire); Y. Bois (Technitrol · Eco Inc., Pointe-Claire); C. R. Cook (produits forestiers E.B. Eddy Ltée, Espanola); G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton); ainsi que D. Bradley, D. Monteith, et J. Pickard (B.C. Research Corp., Vancouver). Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (adresses en annexe).

Les personnes suivantes ont contribué aux modifications apportées en mai 1996 à la première édition de cette méthode de référence (EC, 1990b), qui sont maintenant incorporées dans cette deuxième édition (avec des modifications si besoin était) : B. Bayer (ministère de l'Environnement du Manitoba, Winnipeg); K. Doe (Service de conservation de l'environnement - SCE - Moncton); G. Elliott (SPE, Edmonton); P. Jackman (SCE, St. John's); J. Miller (SPE, Ottawa); D. Piorier (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale); G. van Aggelen (SCE, North Vancouver); R. Watts (SCE, North Vancouver) et G. Westlake (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale).

Cette deuxième édition a été préparée par J.A. Miller (Miller Environmental Sciences Inc., Stroud) qui a reçu des conseils et de l'aide de R.P. Scroggins (Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Environnement Canada, Ottawa) et de D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., Victoria). Les membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale (voir annexe) ont contribué aux modifications introduites dans cette édition et les ont appuyées. Nous tenons à remercier tout spécialement les personnes suivantes à qui nous devons certaines des modifications et ajouts : U. Borgmann (CCEI, Burlington); K. Doe (SCE, Moncton), G. Elliott (SPE, Edmonton); P. Jackman (SCE, Moncton) et J. Schroeder (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale).

## Introduction

Le présent document remplace la première édition de la *méthode de référence* SPE 1/RM/14 (EC, 1990b) publiée en juillet 1990 et à laquelle de modifications ont été apportées en mai 1996. Cette deuxième édition reprend les instructions, lignes directrices et le libellé du rapport SPE 1/RM/14 tel que modifié en mai 1996, à l'exception de modifications ou d'ajouts qui ont été nécessaires ou qui constituaient de améliorations prudentes selon Environnement Canada.

Le présent document décrit les modes opératoires à employer pour les essais de létalité aiguë sur *Daphnia magna*, tels que précisés par les gouvernements canadiens impliqués dans la surveillance et le contrôle de la pollution des effluents industriels ou municipaux. Ces modes opératoires ont pour origine des méthodes d'essai portant sur des poissons publiées antérieurement par Environnement Canada (p. ex., SPE, 1980). La présente méthode de référence devrait être utilisée conjointement avec un rapport plus complet qui présente des explications et des détails additionnels (EC, 1990a, avec modifications apportées en mai 1996).

Par bien aspects, les modes opératoires exposés ci-après sont semblables à des méthodes établies par les provinces canadiennes (Colombie-Britannique, 1998; Poirier *et al.*, 1988; BNQ, 1990) ou employées aux États-Unis (USEPA, 1982, 1985a et 1985b; Plotkin et Ram, 1983; ASTM, 1984; APHA *et al.*, 1998; Greene *et al.*, 1988) et dans d'autres pays (Pays-Bas, 1980; BHSC, 1982; OCDE, 1981; ISO, 1982; Groupe intergouvernemental de la toxicité, 1986). Ces méthodes se sont révélées fort utiles à la rédaction de l'ensemble du présent document, et elles constituent des sources de renseignements complémentaires très valables. Toutefois, aux

fins de la réglementation, ce sont les modes opératoires présentés ci-après qu'on devrait appliquer.

La « puce d'eau » (*Daphnia magna*), un petit crustacé d'eau douce de l'ordre Cladocera, doit être utilisé comme organisme d'essai lorsqu'on applique cette *méthode de référence*. Cette daphnie se retrouve dans les étangs et les lacs de l'Amérique du Nord, y compris l'Ouest canadien, et elle est souvent un élément important des communautés aquatiques. Les daphnies sont sensibles à une vaste gamme de contaminants aquatiques, et elles sont utilisées dans de nombreux pays pour des essais de toxicité. À cet égard, elles présentent les avantages d'une petite taille et d'un cycle biologique court, qui permet des essais rapides; elles sont en outre relativement faciles à élever en laboratoire.

Trois modes opératoires de base sont décrits ci-après. Le premier porte sur une concentration unique d'effluent (l'échantillon non dilué, sauf indication contraire) et sur un contrôle, et il conviendrait à des essais comportant une cote de réussite ou d'échec. Le deuxième permet d'établir la concentration létale 50 (CL50) ou, au besoin, la concentration efficace 50 (CE50) d'inhibition de la mobilité (c.-à-d., de déterminer le degré de toxicité de l'effluent au moyen de diverses concentrations, dont l'échantillon non dilué). Le troisième s'applique à un essai à concentrations multiples portant sur un produit toxique de référence, qui permet d'évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai à un produit toxique étalon ainsi que la précision des données produites par le laboratoire pour ce produit chimique.

Les essais doivent porter sur des effluents contenant de l'eau douce ou ayant une salinité inférieure ou égale à 10 ‰, définie par une

conductivité inférieure ou égale à 1550 mS/m à une température de 20° C (1 mSm = 10 micromhos/cm). Les effluents de salinité supérieure à 10 ‰ qui sont rejetés dans des eaux douces devraient aussi faire l'objet d'essais fondés sur la présente méthode de référence et portant sur des daphnies élevées en eau douce.

Pour ceux de salinité supérieure à 10 ‰ qui sont rejetés directement en mer ou dans des eaux estuariennes, on devrait utiliser une espèce autorisée par le laboratoire régional d'Environnement Canada (adresses à l'annexe) et acclimatée à une eau de mer de salinité semblable à celle de l'échantillon.

## Élevage des organismes

On trouvera ci-après des exigences particulières pour l'élevage des daphnies; de plus amples explications sont fournies dans le document détaillé (EC, 1990a). Il existe divers procédés d'élevage (USEPA, 1982, 1985a; ASTM, 1984; Greene *et al.*, 1988; Poirier *et al.*, 1988); on peut juger de la réussite de chacun au moyen des critères énoncés à la fin de la section 2.1.

Des néonates de *Daphnia magna* doivent être utilisées pour les essais.

### 2.1 Procédés d'élevage

Il est recommandé d'utiliser comme récipients d'essai des aquariums, des bocal à large ouverture ou des béciers de verre. Ceux-ci doivent être munis d'un couvercle non-étanche pour les mettre à l'abri de la poussière et réduire l'évaporation. Les récipients et tous les accessoires entrant en contact avec les organismes ou l'eau des milieux d'élevage doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, acier inoxydable, Nalgene<sup>MC</sup>, porcelaine, polyéthylène).

L'eau des réservoirs d'élevage devrait être presque entièrement remplacée au moins une fois par semaine. On devrait alors réduire la densité de la population de daphnies adultes à 20 animaux ou moins par litre.

On peut manipuler les daphnies adultes en versant doucement du liquide d'un récipient à un autre ou encore en les pipettant ou en les siphonnant avec soin. Les daphnies néonates sont vulnérables à l'emprisonnement d'air sous leur carapace, et on devrait les manipuler le moins possible, au moyen d'une pipette de verre jetable dont l'extrémité d'éjection est coupée et polie à la flamme pour assurer une ouverture de 5 mm. L'extrémité de la pipette devrait rester

sous la surface de l'eau quand on libère les daphnies. Il faudrait procéder rapidement au transfert des organismes, en transportant le moins d'eau possible dans le nouveau récipient.

On doit utiliser au moins une espèce d'algue verte pour nourrir les daphnies, bien qu'il est fortement recommandé d'utiliser un mélange d'au moins deux espèces. Il est avantageux de combiner une ou plusieurs espèces d'algues avec une diatomée; les algues doivent être cultivées dans un milieu de culture adéquat (EC, 1990a). De plus, on peut se servir d'un supplément tel que de la moulée de levure, de Cerophyll<sup>MC</sup> et de truite (EC, 1990a; annexe C).

La santé du stock de génitrices de daphnies est évaluée au moyen des critères de santé suivants, qui doivent être respectés pour que les daphnies néonates puissent être utilisées dans des essais de toxicité.

- Il ne doit pas y avoir d'éphippiums dans le stock de génitrices.
- Les femelles doivent avoir au plus 12 jours au moment de la naissance de la première génération.
- Les femelles de deux à cinq semaines doivent produire une moyenne de 15 néonates ou plus par génération.
- Il ne faut pas enregistrer plus de 25 % de mortalité dans le stock de génitrices au cours des sept jours précédant l'essai.

Pour surveiller ces critères de santé, on peut placer, dans une cuve en verre séparée, une daphnie ou un groupe de daphnies représentatives du stock de génitrices et les maintenir dans des conditions identiques à celles



du stock de génitrices. La ou les daphnies utilisées pour cette surveillance doit (doivent) :

- Avoir le même âge que le stock de génitrices dont l'âge doit être connu.
- Provenir de la génitrice ou des génitrices avant servi à créer le stock de génitrices.
- Être élevées en respectant une densité et un taux d'alimentation identiques à ceux utilisés pour le stock de génitrices.
- Être détenues tant et aussi longtemps que le stock de génitrices sert à produire des néonates comme organismes d'essai.

Il faut pouvoir retracer l'origine des néonates utilisées dans un essai donné à une ou des daphnies spécifiques ayant servi à la surveillance des critères de santé et au stock de génitrices que la ou les daphnies représentent. À défaut de pouvoir en retracer l'origine, il n'y a pas d'assurance que les critères de santé applicables aux organismes d'essai spécifiques utilisés dans le test ont été respectés.

Les résultats de l'essai négatif de contrôle et les conclusions d'un essai portant sur un produit toxique de référence (section 7) permettent aussi d'établir si l'élevage de daphnies convient à des essais de toxicité.

## 2.2 Eau

L'eau devant servir pour l'élevage des daphnies et comme eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau naturelle ou de l'eau reconstituée. Dans le premier cas, on peut utiliser de l'eau souterraine ou de surface non contaminée ou de l'eau déchlorée du réseau municipal d'alimentation, pourvu que sa dureté se situe entre 80 et 250 mg/L. Dans le deuxième cas, on doit utiliser de l'eau modérément dure (c.-à-d., d'une dureté de 80 à 100 mg/L).

S'il faut utiliser de l'eau déchlorée du réseau municipal d'alimentation pour l'élevage ou comme eau de contrôle/de dilution, elle doit être exempte de toute concentration nocive de chlore ou de composés chlorés au moment de l'exposition des daphnies. Le nombre-guide établi pour la concentration en chlore résiduel total dans les élevages et dans l'eau de contrôle/de dilution des récipients d'essai est d'au plus 0,002 mg/L (EC, 1990a).

Si l'on doit utiliser de l'eau reconstituée modérément dure (de 80 à 100 mg/L), on peut la préparer au moyen de toute formule éprouvée permettant d'obtenir des élevages de daphnies qui répondent aux critères de santé énoncés précédemment (EC, 1990a). Le pH de cette eau doit être compris entre 7,0 et 8,0; des valeurs variant entre 7,4 et 7,8 sont fréquentes (EC, 1990a). Il est nécessaire d'ajouter du sélénium et de la vitamine B12 à l'eau reconstituée servant à l'élevage des organismes (EC, 1990a). Ces nutriments peuvent aussi être ajoutés à de l'eau naturelle, mais uniquement si cela est requis pour assurer le respect des critères de santé.

L'eau d'élevage/de contrôle/de dilution doit favoriser de façon constante la survie, la croissance et la reproduction des daphnies. Il faudrait mesurer aussi souvent que nécessaire les caractéristiques chimiques de l'alimentation en eau du laboratoire pour consigner les variations. Ceci devrait tout au moins inclure la dureté, le pH, la conductivité, l'oxygène dissous et les gaz totaux dissous. L'eau ne doit pas être sursaturée en gaz; toute sursaturation devrait être éliminée (EC, 1990a). On devrait effectuer périodiquement une analyse chimique plus détaillée sur d'autres points précisés par Environnement Canada (1990a).

## 2.3 Conditions physico-chimiques

L'éclairage devrait être entre 400 et 800 lux à la surface de l'eau; idéalement le spectre de

lumière devrait tendre vers le violet (indice de rendu des couleurs supérieur ou égal à 90). Un éclairage fluorescent blanc froid est approprié. La photopériode doit correspondre à une séquence de  $16 \pm 1$  h de lumière et  $8 \pm 1$  h d'obscurité.

La température de l'eau d'élevage doit être de  $20 \pm 2^\circ$  C pendant au moins deux semaines avant que les organismes servent à des essais.

La teneur en oxygène dissous de chaque élevage ne devrait pas être inférieure à 60 % de saturation en air. Elle devrait être maintenue à ce niveau, au besoin, grâce à une légère aération au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile, de poussières et d'odeurs.

Le pH de l'eau utilisée pour l'élevage et comme eau de contrôle/de dilution devrait être compris entre 6,0 et 8,5 (de préférence, entre 6,5 et 8,5).

On devrait contrôler, de préférence chaque jour, la température, la teneur en oxygène et le pH ainsi que la présence ou l'absence d'éphippiums dans chaque récipient d'élevage du stock de génitrices. Une vérification hebdomadaire ou plus fréquente est aussi recommandée pour ce qui est de la dureté de l'eau d'élevage et de l'eau de contrôle/de dilution et du chlore résiduel total s'il s'agit d'eau provenant du réseau municipal d'alimentation.

## Installations

L'essai doit être réalisé dans un laboratoire isolé, soit dans une zone entourée d'un mur ou d'un rideau pour permettre de régler l'éclairage, ou dans une chambre de croissance. L'installation doit être à l'écart de tout dérangement; la poussière et les émanations devraient être réduites au minimum.

Les réservoirs d'essai doivent être assez grands pour que la densité de chargement ne dépasse pas une daphnie par 15 mL de solution. On peut utiliser des béciers de verre borosilicaté (de 150 ou 250 mL) ou des éprouvettes de verre à bouchon vissé; on peut aussi se servir de sacs de

plastique inerte et non toxique de qualité supérieure (p. ex., en polyéthylène, en polypropylène ou de marque Whirl-Pak<sup>MC</sup>), qui ne doivent pas être réutilisés. Les récipients et tout le matériel ou l'équipement pouvant entrer en contact avec les solutions d'essai ou l'eau de contrôle/de dilution ne doivent pas contenir de substances pouvant être entraînées dans les solutions d'essai ou se lier avec les produits chimiques qu'elles contiennent. Tous les récipients et appareils doivent être nettoyés et rincés à fond avec de l'eau désionisée ou de l'eau de contrôle/de dilution conformément à de bonnes pratiques de laboratoire.

## Mode opératoire général pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents

### 4.1 *Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

Le volume requis pour les échantillons dépend du nombre de daphnies exposées à chaque solution d'essai, des exigences concernant la densité de chargement, des concentrations d'essai et de l'utilisation de répétitions. Normalement, le volume nécessaire est de 2 L ou plus (selon les exigences de l'analyse chimique), tant pour les essais à concentration unique que pour ceux visant à établir une CL50.

Les récipients utilisés pour le transport et le stockage des échantillons doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, polyéthylène ou polypropylène). Ils doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et séchés, et on devrait les rincer avec de l'eau non contaminée, puis avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir afin de réduire les vides d'air, puis les fermer hermétiquement (p. ex., au moyen d'un couvercle-pression si l'échantillon est placé dans un seau). L'étiquette qu'ils doivent porter doit indiquer au moins le type d'échantillon, la source, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom de ou des préposés à l'échantillonnage.

Les échantillons ne doivent pas geler. Pendant le transport, ils devraient être conservés dans l'obscurité, à une température de 1 à 8° C si le voyage dure plus de deux jours. À l'arrivée au laboratoire, la température de chaque échantillon devrait être mesurée et consignée. La température de chaque portion d'échantillon qui servira à l'essai de toxicité doit être ajustée à 20 ± 2° C, avant que l'essai ne soit mis en route.

Pour que l'essai puisse être mis en route le jour où l'échantillon parvient au laboratoire, on peut ajuster rapidement la température du ou des échantillons d'effluent (section 4.3). Le laboratoire peut aussi choisir d'entreposer l'échantillon à l'obscurité, à 4 ± 2° C pour une courte période (p. ex., pendant la fin de semaine si l'échantillon arrive le vendredi après-midi). Si l'on a recours à cette alternative, l'échantillon doit être entreposé dans des récipients remplis à capacité et hermétiquement fermés, et gardés à l'obscurité dans une installation réfrigérée. Une troisième option est de garder l'échantillon pendant la nuit dans une installation dont la température est ajustée à celle de la température d'essai (c.-à-d., 20 ± 2° C); dans cette circonstance, l'essai doit être entrepris le jour suivant. Si un échantillon est réchauffé ou refroidi à 20 ± 2° C au cours de la nuit, il faut dans ce cas le garder dans un ou plusieurs récipients remplis à capacité et hermétiquement fermés.

L'essai des échantillons devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Il devrait débuter dans les trois jours et doit être commencé au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements. On doit agiter vigoureusement les échantillons juste avant d'en verser des aliquotes pour préparer les solutions. Les sous-échantillons (c.-à-d., les parties aliquotes d'échantillons réparties dans deux ou plusieurs récipients) doivent être combinés.

### 4.2 *Conditions de l'essai*

Il s'agit d'un essai statique (c.-à-d., sans renouvellement des solutions), d'une durée de 48 h. La densité de chargement des daphnies ne

doit pas dépasser un organisme par 15 mL. Il ne faut pas nourrir les daphnies pendant l'essai. Celui-ci n'est pas valide si plus de 10 % des organismes témoins meurent ou laissent apparaître un comportement stressé évident (p. ex., immobilité).

L'essai doit être mené à  $20 \pm 2^\circ \text{C}$ , la dureté des solutions étant supérieure ou égale à 25 mg/L. Les solutions ne sont pas aérées et leur pH n'est pas corrigé durant l'essai. L'éclairage d'obscurité doit être le même que pendant l'élevage (section 2.3). La photopériode (un cycle de lumière : noirceur de  $16 \pm 1 \text{ h} : 8 \pm 1 \text{ h}$ ) doit coïncider avec le cycle utilisé pour l'élevage.

L'essai doit être réalisé sans correction du pH de l'échantillons ou des solutions. Toutefois, si l'on désire comprendre dans quelle mesure les valeurs extrême du pH (c.-à-d., les valeurs inférieures à 6,0 ou supérieures à 8,5) peuvent contribuer à la létalité aiguë de l'échantillon ou des solutions, on peut effectuer parallèlement un deuxième essai (avec correction du pH). Si deux essais sont ainsi menés, les résultats définitifs devraient être ceux obtenus à la suite de l'essai sans correction du pH. Environnement Canada (1990a) fournit des explications et des détails méthodologiques concernant la correction du pH. La correction du pH compte parmi les techniques d'évaluation qualitative de la toxicité (connue sous l'appellation de *Toxicity Identification Evaluation*, ou *TIE*) qui permettent de définir la cause de la toxicité des échantillons (USEPA, 1991).

### 4.3 Préparation des solutions d'essai

La température de l'échantillon et de l'eau de dilution/de contrôle doit être ramenée à  $20 \pm 2^\circ \text{C}$  si elle ne se situe pas déjà dans cet intervalle. L'échantillon peut être refroidi au moyen d'un bain d'eau froide ou d'un refroidisseur à immersion fait d'un matériau non toxique. Pour le réchauffer, utiliser un bain-marie. *Ne pas utiliser* de thermoplongeurs pour réchauffer les

échantillons ou les solutions d'essai.

Comme il est possible que la dureté de l'échantillon d'effluent soit très faible (c.à.d., moins de 25 mg/L), la conductivité de l'échantillon doit être mesurée après l'avoir porté à la température de la pièce mais avant de procéder à toute dilution. Si la conductivité de l'échantillon est  $\leq 100$  mhos/cm, la dureté de l'échantillon doit être mesurée avant d'entreprendre l'essai. Lorsque l'analyse confirme que la dureté de l'échantillon est inférieure à 25 mg/L, il faut la corriger pour qu'elle s'établisse entre 25 et 30 mg/L en y ajoutant du bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ), du sulfate de calcium ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), du sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ) et du chlorure de potassium (KCl) dans les proportions suivantes : 1,6 : 1,0 : 1,0 : 0,0667 (voir les formules applicables à l'eau reconstituée – EC, 1990a, tableau 2). Pour chaque augmentation de dureté de 5 mg/L, il faut ajouter les quantités suivantes de produits chimiques à chaque litre d'effluent : 6,0 mg de ( $\text{NaHCO}_3$ ), 3,75 mg de  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3,75 mg de  $\text{MgSO}_4$ , et 0,25 mg de KCl.

L'eau de contrôle/de dilution doit être la même que celle qui a servi à l'élevage (section 2.2). Si l'on en augmente la température, il faut éviter la sursaturation en gaz. L'eau doit avoir une teneur en oxygène de 90 à 100 % de saturation en air, obtenue grâce à une aération vigoureuse au moyen d'air comprimé exempt d'huile passant par des pierres de barbotage ou un diffuseur en verre.

Chaque récipient d'essai, y compris les contrôles, doit contenir un volume identique de solution pendant l'essai. Les récipients d'essai devraient être rincés avec de l'eau de contrôle/de dilution juste avant d'être utilisés. Les solutions d'essai sont préparées immédiatement avant leur utilisation, en volume suffisant pour faciliter l'échantillonnage et les premières mesures chimiques. Il faut bien les mélanger avec une baguette de verre, un agitateur de Téflon<sup>MC</sup> ou

un autre dispositif fait d'un matériau non toxique. Tous les béciers ou éprouvettes, dispositifs de mesure, appareils d'agitation, et récipients pour le transfert des daphnies doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés.

La teneur de l'échantillon en oxygène dissous doit être mesurée immédiatement avant de commencer l'essai. Si l'oxygène dissous se situe en 40 % et 100 %, l'échantillon ne doit en aucun cas être préaéré. Si (et seulement si) cette valeur est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, l'échantillon doit être préaéré (c.-à-d., aéré avant l'exposition des daphnies), à raison de 25 à 50 mL/min · L. On utilisera pour cela de l'air comprimé et un diffuseur d'air propre en verre de silice ou une pipette de verre jetable (EC, 1990a). La période d'aération doit être limitée à 30 minutes, qu'on ait obtenu ou non de 40 à 100 % de saturation en air, après quoi il faut immédiatement préparer les solutions, y introduire les organismes et mettre en route l'essai. Donc, il n'y a aucune aération des solutions d'essai ou du contrôle durant la période d'essai de 48 heures.

Les récipients d'essai devraient être ouverts ou couverts de manière non hermétique. Si l'on croit que l'échantillon contient des substances volatiles et qu'il serait souhaitable d'en connaître l'effet sur la toxicité, on devrait conduire un essai parallèle dans des récipients fermés. Pour les essais en récipients fermés, ne laisser qu'un vide d'air minime au-dessous de la solution. Si l'on procède simultanément à des essais dans des récipients ouverts et fermés, les résultats finaux devraient être ceux obtenus dans les récipients ouverts.

#### **4.4 *Mise en route de l'essai***

Il faut préparer une ou plusieurs solutions de contrôle et les inclure dans chaque essai conduit sur chaque échantillon. L'utilisation d'une même solution de contrôle et des daphnies

qu'elle contient pour plus d'un essai de toxicité et/ou plus d'un échantillon d'effluent est inacceptable.

Chaque récipient d'essai doit porter un code ou une étiquette précisant clairement la concentration de la solution ainsi que la date et l'heure du début de l'essai. S'il s'agit d'un essai à concentrations multiples (section 6), les concentrations à expérimenter devraient être placées selon un ordre aléatoire.

On doit utiliser des néonates pour l'essai. Des femelles adultes portant des embryons dans leur cavité d'incubation peuvent être prélevées du stock de génitrices qui répondent aux critères de santé exigés, moins de 24 h avant d'essai. Ces femelles peuvent être transférées dans des béciers de verre propres (de 400 à 1000 mL) contenant de l'eau de contrôle/de dilution et un inoculum d'aliments préparés dont la concentration est identique à celle utilisée pour l'élevage. La température de l'eau doit être de  $20 \pm 2^\circ \text{C}$  et sa teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de saturation en air avant l'introduction des adultes. La densité de chargement dans les béciers devrait être d'environ 20 daphnies adultes ou moins par litre. Une autre façon de procéder serait d'enlever les néonates présentes dans le stock de génitrices le jour avant l'essai. Les néonates que l'on retrouve le lendemain dans le stock de génitrices ont moins de 24 h et peuvent par conséquent être utilisées pour l'essai de toxicité.

L'expérience a démontré que l'utilisation de femelles âgées de deux à cinq semaines évite d'utiliser celles qui sont trop jeunes ou sénescents. On peut périodiquement déposer des néonates dans des réservoirs d'élevage distincts. Des l'âge de deux à cinq semaines, ces néonates seront devenues des adultes dont la progéniture pourra servir à des essais.

Pour mettre en route l'essai, on doit introduire dans chaque solution d'essai et de contrôle des

nombres égaux de néonates. Au moins dix daphnies par concentration sont requises pour conduire un essai visant à déterminer la CL50. Pour un essai à concentration unique, on exige au moins 30 daphnies par concentration, réparties dans au moins trois solutions répétées. La densité de chargement ne doit pas dépasser un individu par 15 mL. Les néonates devraient être manipulées conformément aux instructions de la section 2.1; immédiatement après leur transfert, il faudrait remplacer celles qui flottent ou qui sont blessées.

En plus de disposer les récipients d'essai selon un ordre aléatoire dans le laboratoire, l'ordre selon lequel on dépose les daphnies dans les récipients d'essai devrait être établi au hasard. Une ou deux daphnies devraient être déposées successivement dans chaque solution d'essai, y compris la ou les solutions de contrôle, jusqu'à ce que l'on ait déposé dix daphnies dans chacune.

#### **4.5 Observations et mesures**

On devrait noter au début de l'essai la couleur, la turbidité et l'odeur de l'échantillon, ainsi que la présence de matières solides flottant ou décantables. Il faudrait aussi observer l'apparence des solutions d'essai, et consigner les modifications évidentes survenant au cours de l'essai.

Il faut mesurer la teneur en oxygène dissous, le pH et la température de chaque solution d'essai, y compris la ou les solutions de contrôle, au moins au début et à la fin de l'essai. Les mesures finales devraient être faites une fois que l'on a terminé les observations biologiques. On doit mesurer la conductivité de chaque solution d'essai au moins au début de l'essai.

La dureté des solutions de contrôle et de l'échantillon d'effluent non dilué doit être

mesurée au début de l'essai. On doit se servir pour cela des plus grands volumes de solution préparés dans des béciers, une fois toutes les corrections faites et juste avant qu'on s'en serve pour remplir les récipients servant à l'essai (section 4.3).

On devrait faire des observations générales des cas de narcose et de nage ou de comportement inhabituel au début de l'exposition. À la fin de l'essai (après 48 h), il faudrait consigner le nombre de daphnies mortes dans chaque récipient. Dans le cas présent, on entend par mort l'immobilité des antennes, des autres appendices et du cœur, observée avec un microscope à dissection.

Certains produits toxiques narcotiques peuvent rendre les daphnies complètement immobiles et ralentir leur rythme cardiaque à seulement un ou deux battements à la minute. Dans ce cas, le battement devient le critère définitif de la mort. Lorsqu'on soupçonne qu'il s'agit d'un tel cas de narcose et qu'on ne peut observer le cœur avec soin, on devrait consigner le nombre de daphnies immobilisées à 48 h. L'immobilisation s'entend ici de l'inaptitude à la nage pendant 15 secondes qui suivent une légère agitation de la solution, même si les antennes bougent encore.

Il est plus facile d'observer les daphnies si l'on dispose les récipients d'essai contre un fond noir ou si on les éclaire latéralement ou en dessous. Les solutions opaques et les solutions de contrôle correspondantes peuvent être déposées dans des boîtes de Pétri<sup>MC</sup> pour observation, mais seulement à la fin de l'essai (EC, 1990a). Au besoin, on peut verser les solutions dans des tamis à la fin de l'essai et suspendre à nouveau les daphnies dans l'eau pour observation.

## **Mode opératoire pour la détermination du taux de mortalité après 48 h dans un essai à concentration unique**

Toutes les conditions, méthodes et installations prévues aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 8 s'appliquent au présent mode opératoire.

L'essai porte sur une seule concentration d'effluent, soit l'effluent non dilué, sauf indication contraire, et sur une solution de contrôle. L'essai requiert des solutions répétées (au moins trois solutions répétées et 30 daphnies pour la concentration à 100 % et les solutions de contrôle). On obtient de la sorte une plus grande confiance dans les résultats de l'essai et leur interprétation.

Le résultat de cet essai est le pourcentage de mortalité après 48 h, consigné au procès-verbal pour chaque répétition ( $n \geq 10$ ). Si

l'immobilisation est le seul effet biologique observé (section 4.5), le résultat de l'essai est le pourcentage de daphnies immobilisées après 48 h, consigné lui aussi pour chaque répétition.

Afin d'obtenir une valeur unique représentant le pourcentage de mortalité (et/ou pourcentage immobilisation) pour l'effluent et pour la solution de contrôle, on doit combiner les données sur les mortalités (et/ou les cas d'immobilité) obtenues pour chacune des répétitions. L'essai n'est pas valide si l'on constate la mort ou un comportement stressé évident (p. ex., immobilité) chez plus de 10 % des organismes témoins (lorsque les données sont combinées), ou chez plus de deux organismes témoins dans tout récipient d'essai.



## Mode opératoire pour la détermination de la CL50 – 48h dans un essai à concentrations multiples

Toutes les conditions, méthodes et installations prévues aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 8 s'appliquent au présent mode opératoire.

Pour déterminer la CL50, l'essai doit porter sur au moins cinq concentrations d'effluent et sur une solution de contrôle (entièrement composée d'eau de dilution). La concentration la plus élevée doit être l'effluent non dilué, et chaque concentration successive doit correspondre à au moins 50 % de la précédente. Il est avantageux d'utiliser une série géométrique (ou logarithmique), p. ex., des concentrations de 100, 50, 25, 12,5, et 6,3 %. Les concentrations peuvent être basées sur d'autres proportions ou sur des séries de dilutions normalisées (EC, 1990a, annexe D). Au moins dix daphnies doivent être exposées à chaque concentration d'essai, y compris l'effluent non dilué et la solution de contrôle.

Comme cet essai de détermination de la CL50 doit inclure l'effluent non dilué comme la concentration la plus élevée, les résultats de cet essai peuvent aussi servir à déterminer le pourcentage de mortalité après 48 heures (voir section 5), résultat de l'essai à concentration unique.

Pour ces essais à concentrations multiples, calculer la CL50 à 48 h et ses limites de confiance à 95 % et indiquer la méthode utilisée pour les calculs. Des programmes informatiques existent à cette fin (EC, 1990a), et on devrait y

avoir recours. Un programme particulier est recommandé; les personnes qui fournissent une disquette peuvent se le procurer auprès d'Environnement Canada (adresses à l'annexe), avec la permission de C.E. Stephan (1977). On devrait vérifier toute CL50 calculée par ordinateur en examinant, sur une échelle de probabilité logarithmique, la courbe des pourcentages de mortalité après 48 h pour les diverses concentrations d'effluent (EC, 1990a).

Si la mort ne peut être confirmée, on devrait calculer une CE50 d'inhibition de la mobilité après 48 h (section 4.5) au lieu d'une CL50. Statistiquement, la CE50 et ses limites de confiance se calculent de la même façon que la CL50, à ceci près que le critère d'effet est différent.

On peut prévoir des répétitions de chaque concentration, mais cela n'est pas nécessaire. Si on le fait, les données obtenues doivent être combinées pour le calcul de la CL50. La précision de l'estimation de la CL50 augmente avec le nombre d'organismes exposés à chaque concentration d'essai, mais l'exactitude n'est pas nécessairement améliorée.

L'essai n'est pas valide si l'on constate la mort ou un comportement stressé évident (p. ex., immobilité) chez plus de 10 % des organismes témoins (les données étant combinées s'il y a des répétitions) ou chez plus de deux organismes témoins dans tout récipient d'essai.

## Mode opératoire pour l'essai avec un produit toxique de référence

On doit utiliser un produit toxique de référence pour évaluer la sensibilité relative de la population de daphnies utilisée dans l'essai de toxicité ainsi que la précision et la fiabilité des données produites par le personnel du laboratoire pour le produit toxique de référence en cause dans des conditions d'essai normalisée. La sensibilité des daphnies au(x) produit(s) toxique(s) de référence choisi(s) doit être évaluée dans les 14 jours précédant ou suivant tout essai d'un effluent. Les conditions et les méthodes à respecter sont identiques à celles énoncées à la section 4 et déterminées par Environnement Canada (1990a, c), à ceci près que c'est un produit chimique de référence, et non un effluent, qui est mesuré et soumis à l'essai. On doit utiliser pour ces essais l'eau d'élevage, de contrôle/de dilution (section 2.2) qui sert couramment aux essais d'effluents.

On recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence un ou plusieurs des composés suivants : chlorure de sodium (NaCl), bichromate de potassium ( $K_2Cr_2O_7$ ) ou sulfate de zinc ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ). La CL50 après 48 h devrait être déterminée pour le ou les produits de référence utilisés et exprimée sous forme de mg/L de NaCl, de chrome ou de zinc (EC, 1990a). Les solutions mères devraient être préparées le jour même de leur utilisation ou entreposées dans l'obscurité; les solutions de bichromate de potassium devraient être conservées dans des bouteilles à bouchon de verre, et les solutions de zinc devraient être conservées à un pH de 3 à 4.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (APHA *et al.*, 1989). Au moment de la préparation des solutions d'essai,

on doit prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure. Ces aliquotes doivent être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CL50 serait atypique (c.-à-d., à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on doit les tenir à l'obscurité, à une température de  $4 \pm 2^\circ C$ ; les solutions de zinc devraient être acidifiées avant d'être stockées. Les aliquotes stockées nécessitant une mesure chimique devraient être analysées aussitôt l'essai de toxicité terminé.

Il est souhaitable, mais non nécessaire, de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois les observations biologiques terminées. Le calcul de la CL50 devrait être fondé sur les concentrations mesurées, si elles diffèrent appréciablement (c.-à-d., d'au moins 20 %) des concentrations nominales.

Une fois que l'on a recueilli suffisamment de données (EC, 1990c), on doit établir et continuellement mettre à jour un diagramme de contrôle qui représente graphiquement les valeurs de la CL50 pour chaque produit toxique de référence utilisé. Ce diagramme devrait rapporter la concentration logarithmique en ordonnée et la date ou le numéro de l'essai en abscisse. Chaque nouvelle CL50 pour le produit toxique de référence devrait être comparée aux limites d'avertissement établies; pour être acceptable, la CL50 doit s'inscrire à l'intérieur des limites. La moyenne et l'écart type doivent toujours être calculés sur une échelle logarithmique. La moyenne logarithmique et ses limites d'avertissement inférieure et supérieure ( $\pm 2$  fois l'écart type) calculées en prenant les

valeurs logarithmiques disponibles, sont recalculées pour chaque CL50 successive, jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (USEPA, 1985; EC, 1990c).

Le diagramme de contrôle peut être établi en reportant simplement la moyenne et  $\pm 2$  fois l'écart type comme logarithmes, ou si l'on préfère, en les convertissant en valeurs arithmétiques et en reportant la CL50 et  $\pm 2$  fois l'écart type sur une échelle logarithmique de concentration. Si une CL50 s'inscrivait en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des

organismes ainsi que la performance et la précision de l'essai seraient douteuses. Dans cette éventualité, on doit alors vérifier toutes les conditions de culture et d'essai. Selon les constatations faites, il se peut qu'on doive prolonger l'acclimatation des organismes et les soumettre à une nouvelle évaluation au moyen d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence, ou encore obtenir une nouvelle culture de daphnies pour des essais de toxicité avec l'effluent et le ou les produit(s) toxique(s) de référence.

## Présentation des résultats

Voici un résumé des exigences de la présente *méthodes de référence* en matière d'établissement du procès-verbal des essais et de tenue de dossiers. Pour de plus amples détails des explications, on peut consulter les sections précédentes du présent document.

Sauf indication contraire d'Environnement Canada, tous les renseignements énumérés à la section 8.1 doivent être communiqués à Environnement Canada pour chaque essai entrepris. Ces renseignements doivent être fournis conformément aux règlements pertinents et dans la forme et les moyens précisés par Environnement Canada\* (c.-à-d., présentation manuelle ou informatique; mode de transmission; forme et contenu).

Environnement Canada peut aussi exiger la communication d'informations additionnelles, autres que celles spécifiées en section 8.1, telles que des renseignements requis en vertu d'un règlement particulier ou nécessaires pour faciliter la compréhension ou l'évaluation des données consignées au procès-verbal.

Sauf indication contraire d'Environnement Canada, les renseignements énumérés à la section 8.2 doivent être consignés et versés au dossier pour une période de cinq ans, et on doit pouvoir les produire à la demande d'Environnement Canada. Ils seront requis de façon moins fréquente, par exemple pendant un audit ou une enquête.

### 8.1 Données à consigner au procès-verbal

#### 8.1.1 Effluent

- Nom et adresse de l'installation produisant l'effluent.
- Date et heure du prélèvement de l'échantillon.
- Type d'échantillon (p. ex., « effluent non traité de l'usine », « effluent terminal de l'usine », « rejet de la lagune de déversement en cas d'urgence », « lixiviat »).
- Brève description du lieu de prélèvement.
- Méthode d'échantillonnage (p. ex., « échantillon instantané », « échantillon discontinu », « échantillon composite de 24 h, avec prélèvement de sous-échantillons à toutes les heures »).
- Personne ayant prélevé l'échantillon.

#### 8.1.2 Installations et conditions de l'essai

- Type et méthode d'essai (p. ex., « essai à concentration unique », « mode décrit dans la deuxième édition Décembre 2000 de la publication SPE 1/RM/14 »).
- Indication de toute exigence, exprimée par « doit », « doivent » ou « il faut », stipulée dans les sections 2 à 7 de ce rapport, qui n'a pas été respectée, avec les détails relatifs au non-respect de la ou des exigences.
- Nom du laboratoire d'essai et ville où il se trouve.
- Espèce d'organisme soumis à l'essai.
- Date et heure de mise en route de l'essai définitif.

---

\* Pour obtenir des détails, prière de communiquer avec un des bureaux énumérés à l'annexe.

- Personne(s) ayant mené l'essai et vérifié les résultats.
- pH, température, teneur en oxygène dissous et conductivité de l'effluent non dilué et non corrigé, juste avant la préparation de solutions d'essai.
- Confirmation que le pH de l'échantillon ou de la solution d'essai n'a pas été corrigé. Indication de la méthode utilisée pour la correction du pH si des essais avec et sans correction du pH ont été conduits (voir section 4.2).
- Renseignements sur toute correction de la dureté de l'échantillon d'effluent et, le cas échéant, mesures effectuées avant et après la correction.
- Renseignements sur toute aération de l'échantillon (débit, durée) avant l'introduction des daphnies.
- Concentrations et volume des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle, en mention de toute répétition.
- Mesures de la teneur en oxygène dissous, du pH et de la température de chaque solution d'essai, y compris des solutions de contrôle, au début et à la fin de l'essai. Mesure de la conductivité de chaque solution d'essai au début de l'essai. Mesure de la dureté de l'échantillon non dilué et des solutions de contrôle au début de l'essai.
- Pour les stocks de génitrices, estimation du temps pour produire une première génération, et nombre moyen de néonates par génération (c.-à-d., deuxième génération et les suivantes), et pourcentage de mortalité pendant les sept jours précédant l'essai.
- Nombre de néonates par récipient d'essai et de millilitres de solution par daphnie.

### 8.1.3 Résultats

- Nombre de daphnies mortes ou immobilisées dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) après 48 h.
- Pour les essais à concentration unique, nombre de daphnies mortes (ou immobilisées si la mort ne peut être confirmée) dans chacun des trois récipients d'effluent et des trois récipients de contrôle ( $n \geq 10$ ) à la fin de l'essai. Valeur moyenne représentant le pourcentage de mortalité (ou d'immobilisation) pour l'effluent et les solutions de contrôle.
- Pour les essais à concentrations multiples, estimation de la CL50 et ses limites de confiance à 95 %, si statistiquement possibles. CE50 d'inhibition de la mobilité après 48 h et ses limites de confiance à 95 %, si déterminées. Indication de la méthode statistique utilisée (p. ex., probabilité logarithmique, moyenne mobile).
- Pour le ou les essais de toxicité avec produit(s) de référence, dernière valeur de la CL50 après 48 h (et de ses limites de confiance à 95 %), calculées pour le ou les produits toxique de référence. Produit(s) en cause. Date de mise en route de l'essai. Moyenne géométrique des CL50 calculées antérieurement et limites de contrôle ( $\pm 2$  fois l'écart type).

## 8.2 Données à verser au dossier\*\*

### 8.2.1 Effluent

- Tout renseignement (p. ex., code, description de l'échantillon, date/heure d'échantillonnage) inscrit sur la ou les étiquettes du ou des

---

\*\* Ces données doivent être conservées pendant cinq ans à l'installation d'essai les bureaux du responsable des rejets. Certaines d'entre elles peuvent s'appliquer à une série d'essais être consignées et conservées dans un rapport général.

réipients contenant l'échantillon.

- Volume de l'échantillon.
- Conditions de transport et de stockage (durée; température à l'arrivée au laboratoire et durant l'entreposage; mention si l'échantillon était gelé en tout ou en partie à l'arrivée).
- Apparence et autres propriétés (observations sur la couleur, la turbidité, l'odeur et la présence de solides flottantes ou décantables).
- Modifications de la couleur, précipitation, floculation, rejet de substances volatiles et autres modifications survenues pendant la préparation des solutions d'essai.
- Mode opératoire et résultats de toute analyse chimique de l'effluent (p. ex., teneur en solides en suspension, teneur en métaux, teneur en acide résinique), si disponibles.

### 8.2.2 *Installations et conditions de l'essai*

- Adresse du laboratoire d'essai.
- Description des installations d'élevage et d'essai, y compris leur agencement général et leurs moyens d'isolation.
- Source et date d'obtention des organismes soumis à l'essai.
- Conditions normales d'élevage : réipients, emplacement, éclairage, températures, aération, fréquence du remplacement de l'eau, densité maximale, type de nourriture, ration et fréquence de l'alimentation.
- Bref résumé des conditions et modes opératoires propres à l'essai en ce qui touche l'élevage des daphnies, s'ils diffèrent de la pratique courante.
- Source de l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution. Prétraitement habituel, s'il y en a un

(p. ex., procédure pour la correction de la température, aération, déchloration).

Méthodes de préparation et de stockage de l'eau reconstituée, si l'on en utilise. Types et concentrations de tout nutriment ajouté (p. ex., sélénium, vitamine B12).

- Mesures (moyennes et intervalles) de la qualité de l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution. Renseignements à fournir : dureté, pH, conductivité, teneur en oxygène dissous et chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau déchlorée en provenance du réseau d'alimentation municipale). Autres renseignements souhaitables : gaz totaux dissous, alcalinité, matières solides, carbone organique, couleur, ions minéraux, métaux, ammoniac, nitrites et pesticides organophosphorés.
- Systèmes de réglage de l'éclairage et de la température.
- Source d'éclairage, photopériode et mesures antérieures de l'éclairage à la surface des réservoirs d'élevage et des réipients d'essai.
- Description des réipients d'essai (dimension, forme et matériau), des couvercles et de leurs méthodes courantes de nettoyage et de rinçage.
- Méthode utilisées pour l'introduction, selon un ordre aléatoire, des daphnies dans les réipients d'essai.
- Méthode d'obtention de néonates soumises à l'essai.
- Méthode utilisée pour surveiller les critères de santé des stocks de génitrices.
- Caractéristiques de la ou des daphnies utilisées pour la surveillance de la santé par rapport au stock de génitrices (c.-à-d., âge identique à

celui du stock de génitrices dont l'âge doit être connu; provenir de la génitrice ou du groupe de génitrices ayant servi à produire le stock de génitrices; élevées dans les mêmes conditions de densité de chargement; maintenues tant et aussi longtemps que le stock de génitrices sert à fournir des néonates).

- Apparence des solutions; toute modification survenue pendant l'essai.
- Concentrations d'essai des produits toxiques de référence, tant nominales que mesurées. Indication de l'ensemble de données utilisé pour estimer la CL50.
- Toute mesure de la qualité de l'eau des solutions d'essai non consignée au procès-verbal (section 8.1.2).

### **8.2.3 Résultats**

- Observations du nombre de daphnies mortes (ou immobilisées, si la mort ne peut être confirmée) non consignées au procès-verbal (section 8.1.3) (p. ex., après 24 h).
- Observations du comportement et de l'apparence des daphnies dans chaque solution d'essai faites au cours ou à la fin de l'essai.
- Toute représentation graphique manuelle des données utilisées pour vérifier une CL50 générée par ordinateur.
- Motif de la substitution du nombre de daphnies immobilisées au nombre de daphnies mortes.

## Références

---

- APHA, AWWA et WEF (*American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation*) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20<sup>e</sup> éd., L. Clesceri, A. Greenber et A. Eaton (éd.), APHA, AWWA et WEF, Washington, DC (1998).
- ASTM (*American Society for Testing and Materials*). “Standard Practice for Conducting Static Acute Toxicity Test on Wastewaters with *Daphnia*”, *Annual Book of ASTM Standards*, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, Vol. 11.01, p. 27–39, Designation D 4229 (1984).
- BHSC (*British Health and Safety Commission*). “Testing for Acute Toxicity to *Daphnia*”, Dans: *Methods for the Determination of Ecotoxicity*, pp. 14–18, BHSC, Londres (1982).
- BNQ (Bureau de normalisation du Québec) *Eaux - Détermination de la toxicité. Méthode avec le microcrustacé Daphnia magna*, ministère de l'Industrie et du Commerce, Bureau de Normalisation du Québec, Québec (1990).
- Colombie-Britannique, *Daphnia 48-hour Acute Mortality Bioassay Procedure*, Version préliminaire. ministère de l'Environnement et des Parks, Laboratoire environnemental. Vancouver (1988).
- EC (Environment Canada), *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur Daphnia spp.* Rapport SPE 1/RM/11 avec modifications apportées en mai 1996. Conservation et Protection. Ottawa, Ontario, 57 p. (1990a).
- EC, *Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez Daphnia magna*, Rapport SPE 1/RM/14 avec modifications apportées en mai 1996. Conservation et Protection, Ottawa, Ontario. 18 pages (1990b).
- EC, *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 Ottawa (1990c).
- Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique. *Acute Lethality/Immobility Testing Protocols and Procedures for the Water Flea, Daphnia magna. Addendum 2, Part C, Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection*, par G. Sergy, Environnement Canada, Edmonton, Alberta (1986).
- Greene, J.C., C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.P. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson, et W.E. Miller, *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*, USEPA, Corvallis, OR (1988).
- ISO (Organisation internationale de normalisation). *Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea), 1<sup>ère</sup> édition, Rapport ISO 6341-1982 (E), Genève, Suisse (1982).
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). *Daphnia sp., Essai d'immobilisation immédiate et essai de reproduction sur 14 jours*, Document N° 202, OCDE, Paris, France (1981).
- Pays-Bas, “Determination of Toxicity”, Dans : *Degradability toxicity and bio-accumulation. The Determination of the Possible Effects of Chemicals and Wastes on the Aquatic Environment*, Chapter 5, Publications officielles, La Haie, Pays-Bas (1980).



- Plotkin, S. et N.M. Ram, *Acute Toxicity Tests: General Description and Materials and Methods Manual, II. Daphnia*, Report No. Env. E. 73-83-4, Univ. of Massachusetts, Dept. of Civil Engineering, Amherst, MA (1983).
- Poirier, D.G., G.F. Westlake, et S.G. Abernethy, *Daphnia magna Acute Lethality Toxicity Test Protocol*, ministère de l'Environnement de l'Ontario, Division des ressources en eau, Unité de toxicité aquatique, Rexdale, Ontario (1988).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents*. Rapport SPE 1-WP-80-1. Environnement Canada, Ottawa, Ontario (1980).
- Stephan, C.E., "Methods for Calculating an LC50", Dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer and J.L. Hamelink (éd.), p. 65–84, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1977).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Daphnid Acute Toxicity Test*, USEPA, Office of Toxic Substances, Washington, DC (1982).
- USEPA, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*, Rapport EPA/600/4-85-013, 216 p. USEPA, Cincinnati, OH (1985a).
- USEPA, *Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates*, Rapport EPA-540/9-85-005, USEPA, Hazard Evaluation Division, Washington, DC (1985b).
- USEPA, *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures*, 2<sup>e</sup> édition. Rapport EPA/600/6-91/003. USEPA, Duluth, MN (1991).

## **Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale et adresses de l'administration centrale et des bureaux Régionaux d'Environnement Canada**

### **Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale (au mois de décembre 2000)**

#### ***Gouvernement fédéral*** (Environnement Canada)

C. Blaise

Centre Saint-Laurent  
Montréal (Québec)

M. Bombardier

Centre de technologie environnementale  
Ottawa (Ontario)

U. Borgmann

Institut national de recherche sur les eaux  
Burlington (Ontario)

J. Bruno

Pacific Environmental Science Centre  
North Vancouver (Colombie-Britannique)

C. Buday

Pacific Environmental Science Centre  
North Vancouver (Colombie-Britannique)

T. Corbin

Atlantic Environmental Science Centre  
Moncton (Nouveau-Brunswick)

K. Doe

Atlantic Environmental Science Centre  
Moncton (Nouveau-Brunswick)

G. Elliot

Service de la protection de l'environnement  
Edmonton (Alberta)

M. Fennell

Pacific Environmental Science Centre  
North Vancouver (Colombie-Britannique)

F. Gagné

Centre Saint-Laurent  
Montréal (Québec)

M. Harwood

Centre Saint-Laurent  
Montréal (Québec)

P. Jackman

Atlantic Environmental Science Centre  
Moncton (Nouveau-Brunswick)

N. Kruper

Service de la protection de l'environnement  
Edmonton (Alberta)

D. MacGregor

Centre de technologie environnementale  
Ottawa (Ontario)

D. Moul

Pacific Environmental Science Centre  
North Vancouver (Colombie-Britannique)

W. R. Parker

Service de la protection de l'environnement  
Fredericton (Nouveau-Brunswick)

L. Porebski

Division du milieu marin  
Hull (Québec)

D. Rodrigue

Direction générale de l'avancement des  
technologies environnementales  
Hull (Québec)

R. Scroggins

Centre de technologie environnementale  
Ottawa (Ontario)

A Steenkamer  
Centre de technologie environnementale  
Ottawa (Ontario)

G. van Aggelen (Chairperson)  
Pacific Environmental Science Centre  
North Vancouver (Colombie-Britannique)

R. Watts  
Pacific Environmental Science Centre  
North Vancouver (Colombie-Britannique)

P. Wells  
Service de la conservation de l'environnement  
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)

***Gouvernement fédéral***  
(Pêches et Océans Canada)

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

***Gouvernements provinciaux***

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

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

D. Bedard  
ministère de l'Environnement de l'Ontario  
Rexdale (Ontario)

M. Mueller  
ministère de l'Environnement de l'Ontario  
Rexdale (Ontario)

D. Poirier  
ministère de l'Environnement de l'Ontario  
Rexdale (Ontario)

J. Schroeder  
ministère de l'Environnement de l'Ontario  
Rexdale (Ontario)

**Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada****Administration centrale**

351, boulevard Saint-Joseph  
Place Vincent-Massey  
Hull (Québec)  
K1A 0H3

**Région de l'Ontario**

4905 rue Dufferin, 2<sup>e</sup> étage  
Downsview (Ontario)  
M3H 5T4

**Région de l'Atlantique**

15<sup>e</sup> étage, Queen Square  
45, promenade Alderney  
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)  
B2Y 2N6

**Région des Prairies et du Nord**

Twin Atria No. 2, pièce 210  
4999-98<sup>e</sup> avenue  
Edmonton (Alberta)  
T6B 2X3

**Région du Québec**

105 rue McGill, 8<sup>e</sup> étage  
Montreal (Québec)  
H2Y 2E7

**Région du Pacifique et du Yukon\***

224, rue Esplanade ouest  
North Vancouver (Colombie-Britannique)  
V7M 3H7

---

\* Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la CL50 existe et peut être reproduit sur une disquette compatible IBM, fournie par l'utilisateur. Pour se procurer ce programme, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.