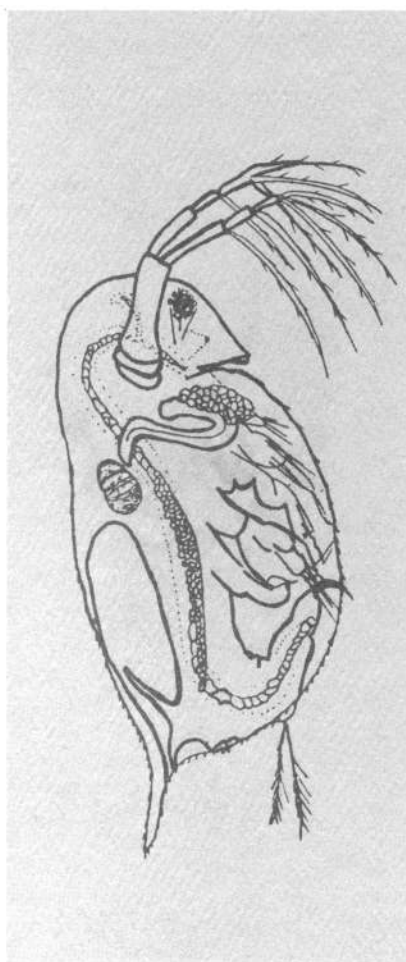


Série de la Protection de l'environnement



Méthode d'essai biologique
essai de létalité aiguë sur
Daphnia spp.

Rapport SPE 1/RM/11
Juillet 1990
(avec les modifications de mai 1996)

Canada



Environnement
Canada

Environment
Canada

Méthode d'essai biologique: essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.

**Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada**

**Rapport SPE 1/RM/11
Juillet 1990
(avec les modifications de mai 1996)**

Données de catalogue avant publication (Canada)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique: essai de létalité
aiguë sur *Daphnia* spp.

(Méthode générique; SPE 1/RM/11)

Publ. en anglais sous le titre: Biological test method,
acute lethality test using *Daphnia* spp.

Comprend des références bibliographiques.

ISBN 0-662-96303-2

No. de cat. MAS En49-24/1-11F

1. Hydrobiologie -- Aspect de l'environnement.

2. Daphnies --Toxicologie. 3. Mer -- Pollution.

4. Environnement -- Surveillance -- Canada. I. Canada.

Direction générale de la protection de l'environnement. II. Canada.

Environnement Canada. III. Coll.: Rapport

(Canada. Environnement Canada); SPE 1/RM/11.

IV. Titre: Essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.

QH90.57A114 1990 574.'92 C90-098698-0

Commentaires

Les personnes qui désirent faire part de leurs commentaires sur la teneur du présent rapport sont priées de les adresser à:

Richard Scroggins
Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
335 River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Daphnia spp.* For copies, please contact:

Environmental Protection Publications
Environmental Technology Advancement Directorate
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Résumé

*Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de létalité sur des daphnies (*Daphnia magna*, *D. pulex* ou l'une et l'autre espèces).*

Il présente les conditions et méthodes générales ou universelles permettant de réaliser des essais de létalité aiguë sur un large éventail de substances. Il précise d'autres conditions et méthodes propres à l'évaluation d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieu récepteurs. Le lecteur y trouvera des instructions sur les conditions et les règles d'élevage des daphnies, la manipulation et le stockage des échantillons, les installations d'essai requises, les méthodes de préparation des solutions d'essai et de mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et mesures appropriées, les résultats des essais, les méthodes de calcul et l'utilisation de produits toxiques de référence.

Abstract

This document describes methods recommended by Environment Canada for performing acute lethality tests with daphnids (Daphnia magna and/or D. pulex).

General or universal conditions and procedures are outlined for undertaking an acute lethality test using a variety of test materials. 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, 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 série de méthodes recommandées pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes ont été évaluées par la Direction de la protection de l'environnement (DPE); elles sont recommandées pour les applications suivantes:

- *utilisation dans les laboratoires de toxicité aquatique d'Environnement Canada et des provinces;*
- *essais confiés en sous-traitance par Environnement Canada ou demandés à des organismes ou à des entreprises de l'extérieur;*
- *remplacement d'instructions plus précises, par exemple celles prévues dans des règlements; et*
- *fondement pour l'établissement d'instructions très explicites devant figurer, en certaines circonstances, dans un protocole juridique ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais compris dans cette série ont été choisis parce qu'ils sont acceptables aux fins des programmes de protection et de conservation environnementales d'Environnement Canada. Ces documents visent à fournir des lignes directrices et à faciliter l'utilisation de méthodes cohérentes, pertinentes et exhaustives pour recueillir des données sur les effets toxiques d'échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats et de milieux récepteurs.

Dans le présent document, la mention d'appellations commerciales ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable peuvent être utilisés.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Avant-propos	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xii
Glossaire	xiii
Remerciements	xviii

Section 1

Introduction	1
1.1 Contexte	1
1.2 Répartition de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais	1

Section 2

Organismes soumis à l'essai	4
2.1 Espèces	4
2.2 Cycle biologique	4
2.3 Source	4
2.4 Élevage	4
2.4.1 Généralités	4
2.4.2 Installations	7
2.4.3 Gestion des élevages	7
2.4.4 Éclairement	8
2.4.5 Eau	8
2.4.6 Température	8
2.4.7 Oxygène dissous	9
2.4.8 pH	9
2.4.9 Dureté	9
2.4.10 Alimentation	10
2.4.11 Manipulation des organismes	11
2.4.12 Critères de santé	12

Section 3

Système d'essai	13
3.1 Installations	13
3.2 Éclairement	13
3.3 Récipients d'essai	13
3.4 Eau de contrôle/de dilution	14

Section 4

Méthode d'essai universelles	15
4.1 Préparation des solutions d'essai	15

4.2	Mise en route de l'essai	19
4.3	Conditions de l'essai	21
4.3.1	Oxygène dissous	21
4.3.2	pH	21
4.4	Observations et mesures	22
4.5	Résultats et calculs	23
4.6	Produits toxiques de référence	26
4.7	Considérations juridiques	28

Section 5

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques	29
5.1 Propriétés, étiquetage, transport et stockage des échantillons	29
5.2 Préparation des solutions d'essai	29
5.3 Eau de contrôle/de dilution	30
5.4 Observations et mesures	31
5.5 Résultats et calculs	31

Section 6

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats et de lixiviats		32
6.1	Étiquetage, transport et stockage des échantillons	32
6.2	Préparation des solutions d'essai	32
6.3	Eau de contrôle/de dilution	33
6.4	Observations et mesures	33
6.5	Résultats et calculs	34

Section 7

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs	35
7.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons	35
7.2 Préparation des solutions d'essai	35
7.3 Eau de contrôle/de dilution	35
7.4 Observations et mesures	35
7.5 Résultats et calculs	36

Section 8

Procès-verbal de l'essai	37
8.1 Substance à expérimenter	37
8.2 Organismes soumis à l'essai	37
8.3 Installations et appareils	38
8.4 Eau de contrôle/de dilution	38
8.5 Méthode d'essai	38
8.6 Conditions de l'essai	38
8.7 Résultats de l'essai	39

Références	40
<i>Annexe A</i>	
Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique et adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada	44
<i>Annexe B</i>	
Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de létalité aigüe sur <i>Daphnia</i> spp.	47
<i>Annexe C</i>	
Méthode de préparation de l'YCT et de la nourriture à base d'algues pour les élevages de daphnies	54
<i>Annexe D</i>	
Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité	59

Liste des tableaux

1	Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour l'élevage des daphnies	6
2	Préparation d'eau reconstituée d'une dureté particulière	11
3	Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées	16

Liste des figures

1	Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances	2
2	Anatomie de la daphnie femelle	5
3	Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique des mortalités (ou d'une concentration efficace 50 par la représentation des cas d'immobilité) sur papier de probabilité logarithmique	25

Liste des abréviations

BPC	biphényles polychlorés
°C	degré Celsius
CaCO ₃	carbonate de calcium
CaSO ₄	sulfate de calcium
CE50	concentration efficace 50
CL50	concentration létale 50
d	jour
EIT	Évaluation d'identification de la toxicité
g	gramme
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
H ₂ O	eau
KCl	chlorure de potassium
L	litre
^{MC}	marque de commerce
mg	milligramme
MgSO ₄	sulfate de magnésium
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
N	normal
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
OD	oxygène dissous (concentration)
SI	Système international d'unités
TL50	temps léthal 50
YCT	moulée de levure, de Cerophyll ^{MC} et de truite (<i>Yeast Cerophyll^{MC}, Trout</i>)
μ	micro
>	supérieur à
<	inférieur à
≥	supérieur ou égal à
≤	inférieur ou égal à

Glossaire

Remarque: Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; il se peut qu'elles ne soient pas adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) est utilisé 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 la faire.

Termes techniques généraux

Acclimatation - Adaptation physiologique à un niveau précis d'une ou de plusieurs variables environnementales, par exemple la température. Ce terme s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

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 milli siemens par mètre (unité SI), ou en $\mu\text{mho/cm}$ ($1 \text{ mS/m} = 10 \mu\text{mhos/cm}$).

Conformité - Fait de respecter les exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Daphnie - Invertébré micro crustacé d'eau douce, communément appelé puce d'eau. *Daphnia magna* et *D. pulex* sont deux espèces de daphnies.

Dispersant - Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex., du pétrole), ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Dureté - Concentration, dans l'eau, de cations réagissant avec une solution savonneuse de sodium pour entraîner la précipitation d'un résidu insoluble. En règle générale, la dureté correspond à la concentration d'ions de calcium et de magnésium dans l'eau et s'exprime en mg/L de carbonate de calcium ou l'équivalent.

Élevage - Ensemble des animaux qu'on élève dans des conditions contrôlées afin d'obtenir, par reproduction, des organismes devant être soumis à des essais.

Émulsifiant - Substance chimique qui facilite le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance normalement hydrophobe.

Floculation - Formation d'un précipité léger en suspension (floc) dans une solution.

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

Néonate - Individu né ou éclos depuis peu (daphnie 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 7 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.

Pourcentage (%) - Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent représente une unité ou partie de matière (p. ex., effluent, éluviat, lixiviat ou milieu récepteur) diluée dans l'eau, jusqu'à concurrence de 100 parties. On peut préparer des concentrations en masse par unité de masse ou en volume par unité de volume; on les exprime en pourcentage de la matière en cause dans la solution définitive.

Précipitation - Formation d'un solide (précipité) à partir d'une solution.

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

Salinité - Quantité totale, en grammes, de solides dissous dans 1 kg d'eau de mer. 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 parties par millier (‰).

Surfactant - Substance chimique active en surface (p. ex., un détergent) qui, ajoutée à un liquide non aqueux, en diminue la tension superficielle et facilite la dispersion des matières dans l'eau.

Surveillance - Activités de vérification de la qualité ou de collecte et de communication de données, effectuées de façon régulière (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimensuelle). Dans le contexte du présent rapport, ce terme s'applique à la vérification et à la mesure périodiques (régulières) de certaines variables biologiques ou de la qualité de l'eau, ainsi qu'au prélèvement et à l'essai d'échantillons d'effluents, d'éluviats, de lixiviats ou de milieux récepteurs pour la mesure de leur toxicité.

Turbidité - Degré de réduction de la clarté de l'eau par la présence de matières en suspension ou autres qui entraînent la diffusion et l'absorption de la lumière, plutôt que sa transmission en ligne droite dans l'échantillon. La turbidité s'exprime généralement en unités de turbidité néphélométrique.

Termes désignant les substances d'essais

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 (p. ex., qualité de l'eau de contrôle/de dilution, état de santé ou la manipulation des organismes soumis à l'essai).

Eau d'amont - Eau de surface (p. ex., d'un ruisseau, d'une rivière ou d'un lac) qui n'est pas soumise à l'influence de la substance à expérimenter, du fait qu'elle se trouve contre le courant ou assez loin perpendiculairement à celui-ci.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour le contrôle, pour diluer la substance à expérimenter ou à l'une et l'autre de ces fins.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations pour les divers traitements des essais de toxicité.

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

Eau désionisée - Eau qu'on a fait passer à travers des colonnes de résine afin d'en extraire les ions et de la purifier.

Eau distillée - Eau qu'on a fait passer à travers un appareil de distillation (au verre borosilicaté ou autre) afin d'en éliminer les impuretés.

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

Eau usées - Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les élutriats.

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

Élutriat - Solution aqueuse obtenue après avoir ajouté de l'eau à un déchet solide (p. ex., stériles ou boues de forage ou de dragage), avoir agité le mélange, puis l'avoir centrifugé ou filtré ou avoir décanté le surnageant.

Lixiviat - Eau ou eau usée ayant traversé une colonne de sols ou de déchets solides dans l'environnement.

Milieu récepteur - Eau de surface (p. ex., dans un cours d'eau) où des déchets ont été ou sont sur le point d'être déversés (p. ex., immédiatement en amont du point de rejet). D'autres termes doivent être employés afin de préciser le sens de ce terme dans son contexte.

Produit chimique - Dans le présent rapport, se dit de tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui peut se retrouver dans l'environnement aquatique par déversement, application ou rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés contre la lamproie marine et les agents de traitement des déversements de pétrole sont des exemples des produits chimiques qui se retrouvent dans l'environnement.

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour mesurer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir les limites de confiance des données de toxicité recueillies sur une substance à expérimenter. Dans la plupart des cas, on exécute un essai de toxicité sur un produit toxique de référence afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'étude d'une substance à expérimenter, ainsi que la précision des résultats obtenus par le laboratoire.

Termes de toxicologie

CE50 - Concentration efficace 50, soit la concentration que 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 qui est censée être létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % s'obtiennent généralement par analyse statistique des mortalités dans plusieurs concentrations d'essai, après une durée fixe d'exposition. La durée d'exposition doit être précisée (p. ex., CL50 après 96 h).

Essai à renouvellement continu - Essai de toxicité pendant lequel les solutions des réservoirs d'essai sont renouvelées en continu par l'apport constant d'une solution fraîche ou par un apport intermittent fréquent.

Essai à renouvellement périodique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai sont renouvelées périodiquement, généralement aux 24 heures. Syn. *Renouvellement*, semi-statique, à renouvellement séquentiel.

Essai de toxicité - Détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes sélectionnés, dans des conditions définies. Un essai de toxicité aquatique permet généralement de mesurer dans quelle proportion des organismes sont affectés par une exposition à des concentrations particulières de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs.

Essai statique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Évaluation d'identification de la toxicité - Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex., correction du pH, filtration, aération), suivi d'essais de toxicité aiguë. Cette évaluation permet de définir le ou les agents causals qui sont les principaux responsables de la toxicité aiguë dans un mélange complexe.

Évident - Clairement discernable dans les conditions d'essai utilisées.

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.

Résultat - Variable (p. ex., le délai, la réaction des organismes soumis à l'essai) indiquant la fin d'un essai; mesure ou valeur dérivée caractérisant l'effet de la substance à expérimenter (CL50, TL50, etc.).

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

TL50 - Temps létal 50, soit la durée d'exposition qui est censée entraîner 50 % de mortalité au sein d'un groupe d'organismes détenus dans une solution d'essai particulière. Cette valeur s'estime le mieux par une représentation graphique.

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants.

Toxicité aiguë - Effet nocif discernable (létal ou sublétal) provoqué chez les organismes soumis à l'essai dans une courte période d'exposition à une substance à expérimenter, soit généralement 48 h ou moins dans le cas des daphnies.

Remerciements

Le présent document a été rédigé en collaboration par M. Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et M. John Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario).

M. G. Sergy et M. R. Scroggins (Protection de l'environnement (PE), Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont apporté leur collaboration et leurs conseils techniques pendant la durée des travaux.

Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) (annexe A) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document et méritent tous nos remerciements. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (composé de K. Doe, D. MacGregor, R. Parker, R. Scroggins, G. Sergy, R. Watts et G. Westlake) qui a assumé la responsabilité de la première et de la dernière révisions. Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (annexe A).

Les personnes suivantes, qui ont en passé en revue la version définitive, ont apporté des observations et des conseils à la fois nombreux et utiles : S. Wade (PE, Dartmouth, N.-É.), B. Dutka (NWRI, Burlington, Ont.), D. Moul (PE, North Vancouver, C.-B.), S. Yee (PE, North Vancouver, C.-B.), J. Vandermeulen (ministère des Pêches et Océans (MPO), Dartmouth, N.-É.), B. Hobden (MPO, Winnipeg, Man.), J. Servizi (MPO, Cultus Lake, C.-B.), G. Joubert (ministère de l'Environnement du Québec, Sainte-Foy, Québec), D. Poirier (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale, Ont.), S. Horvath (ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Vancouver C.-B.), J. Greene (Environmental Protection Agency, Corvallis, OR), T. Kovacs (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers (ICRPP), Pointe-Claire, Québec), S. Gibbons (ICRPP, Pointe-Claire, Québec), G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.), R. Evers (BAR Environmental, Guelph, Ont.), P. Chapman (EVS Consultants Ltd., North Vancouver, C.-B.), D. Monteith (B.C. Research Corp., Vancouver, C.-B.), et B. Tepper (U.S. Testing Co. Inc., Hoboken, NJ).

Introduction

1.1 Contexte

On ne peut s'attendre à ce qu'un seul organisme ou une seule méthode d'essai répondent aux besoins d'une démarche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement. Pour mettre en oeuvre les mesures préventives et correctives nécessaires afin de gérer l'environnement, il faut pouvoir faire appel à une batterie d'essais de toxicité aquatique bien définis et triés sur le volet. Sergy (1987), en collaboration avec le Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (consulter la liste des membres à l'annexe A), a proposé une série d'essais qui seraient généralement acceptables et qui permettraient de mesurer différents types d'effets toxiques chez divers organismes. L'essai de létalité aiguë sur les daphnies est l'un des essais de toxicité aquatique «de base» qu'on a choisi de normaliser de sorte qu'il permette de respecter les exigences d'Environnement Canada en matières d'essais.

Le présent rapport décrit les méthodes universelles qui s'appliquent à tout essai de létalité aiguë ou d'inhibition de la mobilité chez *Daphnia magna* ou *D. pulex* exécuté dans des conditions contrôlées en laboratoire. Il présente également des ensembles particuliers de conditions et de méthodes, prescrits ou recommandés lorsqu'on utilise des essais de létalité aiguë pour l'évaluation de différents types de substances (à savoir des échantillons de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs) (figure 1). Les méthodes et conditions particulières applicables à la conduite de l'essai et à sa normalisation sont définies et, au besoin, analysées dans des notes en bas de page. En mettant au point ces méthodes, on s'est efforcé de mettre en balance des considérations scientifiques, pratiques et financières, en plus de veiller à ce que les

résultats soient assez exacts et précis pour la majorité des cas d'application des méthodes.

Les auteurs ont supposé que le lecteur connaît déjà, dans une certaine mesure, les essais de toxicité aquatique. Le présent document ne renferme pas d'instructions explicites sur tous les détails, comme celles qui peuvent s'avérer nécessaires dans un protocole réglementaire particulier; néanmoins, il est destiné à servir de document directeur pour cette application et d'autres utilisations.

1.2 Répartition de l'espèce et utilisation antérieure pour des essais

Les daphnies sont des micro crustacés d'eau douce, généralement connus sous le nom «puce d'eau», qui appartiennent à l'ordre (ou sous-ordre) des cladocères. *D. pulex* atteint une longueur maximale d'environ 3,5 mm, alors que *D. magna* atteint de 5 à 6 mm. Ces espèces invertébrées constituent un élément important du zooplancton d'eau douce dans le monde entier (Herbert, 1979) et peuvent être les herbivores dominants dans les lacs. *D. magna* habite les lacs et les étangs; on la retrouve dans les eaux du nord et de l'ouest de l'Amérique du Nord dont la dureté atteint des valeurs supérieures à 150 mg/L (Pennak, 1978; Greene *et al.*, 1988). Moins grosse, *D. pulex* habite essentiellement les étangs, les sections calmes des cours d'eau et, dans une moindre mesure, les lacs des quatre coins de l'Amérique du Nord, à des endroits où l'eau peut être douce ou très dure (EPA, 1985a).

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

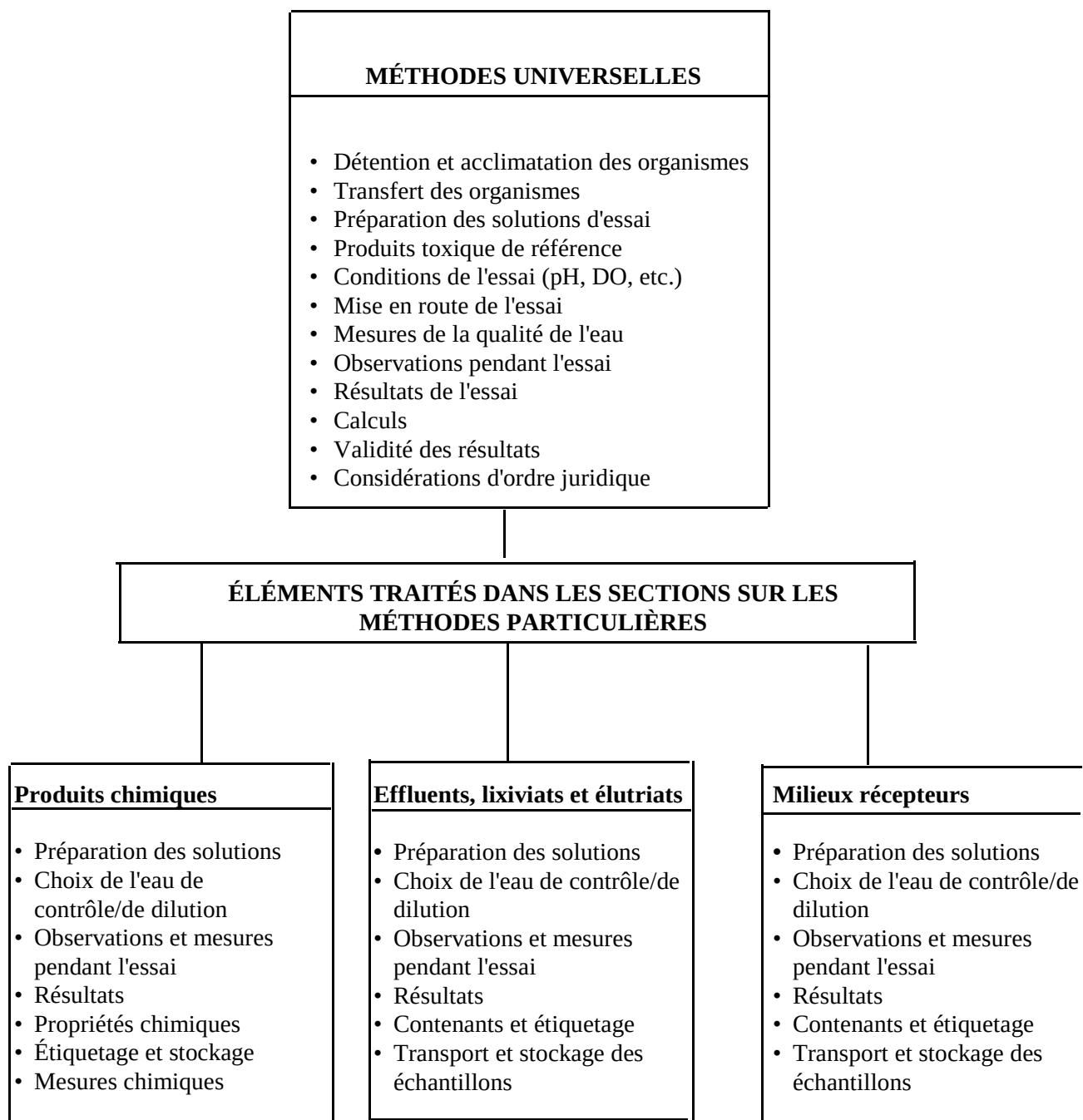


Figure 1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances

- Au Canada, on les retrouve un peu partout dans les nappes d'eau douce et dans un large éventail d'habitats.
- Elles constituent un lien important dans de nombreuses chaînes alimentaires aquatiques et représentent une source appréciable de nourriture pour les juvéniles des salmonidés et d'autres espèces de poissons.
- Elles ont un cycle de vie relativement bref et sont assez faciles à 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 de produits chimiques et d'effluents.
- En raison de leur petite taille, on n'a besoin que de faibles volumes d'eau pour les essais, ce facilite le prélèvement et le transport des échantillons d'eaux usées.

À l'étranger, les daphnies (*D. magna*, *D. pulex* ou l'une et l'autre espèces) sont fréquemment utilisées, depuis quelques années, pour l'évaluation de la létalité aiguë de substances à expérimenter dans des conditions de laboratoire définies (Pays-Bas, 1980; OCDE, 1981; BHSC, 1982; ISO, 1982; AFNOR, 1984; Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique, 1986). Aux États-Unis, on a également mis au point des méthodes d'essai normalisées sur *D. magna* ou *D. pulex* pour connaître la toxicité aiguë d'échantillons d'effluents et de produits chimiques (EPA, 1982; Plotkin et Ram, 1983; ASTM, 1984; EPA, 1985a; 1985b; 1987; APHA *et al.*, 1989) ou pour analyser la toxicité de sites de déchets dangereux (Greene *et al.*, 1988). Au Canada, certaines provinces ont récemment ébauché ou publié des documents de méthodologie pour la réalisation d'essais de létalité aiguë sur des daphnies avec des échantillons d'effluents (Colombie-Britannique, 1988; Poirier *et al.*, 1988; BNQ, 1990). Partout au Canada, les laboratoires d'Environnement Canada (annexe A) disposent des compétences voulues pour l'exécution d'essais de létalité aiguë

sur des daphnies, mais les méthodes utilisées diffèrent légèrement d'un établissement à un autre et aucune méthodologie «normalisée» n'a encore été élaborée ni adoptée (Sergy, 1987).

Les méthodes d'essai particulières exposées dans les documents de méthodologie existants sont suffisamment variées pour qu'on ne puisse garantir de résultats comparables pour différents essais portant sur des daphnies. En outre, ces documents passent sous silence de nombreuses questions de méthodologie (p. ex., celles concernant les influences modificatrices du pH ou de la dureté de l'eau d'essai); ils ne prévoient pas les mêmes résultats et limitent l'application des essais quant à leur contexte, à leur objet ou au type de substance à expérimenter. L'annexe B donne un aperçu des variables et des méthodes exposées dans les rapports de méthodologie actuels. Le présent document vise à définir une méthodologie canadienne «normalisée» pour l'exécution, au moyen de daphnies, d'essais de toxicité létale aiguë (ou d'inhibition aiguë de la mobilité) portant sur diverses substances à expérimenter.

Les questions dont nous venons de traiter ont été prises en considération dans l'élaboration du présent rapport. La méthodologie qu'il expose est conçue pour des daphnies acclimatées en eau douce et pour des solutions d'essai essentiellement constituées d'eau douce (c.-à-d. dont la salinité est inférieure ou égale à 10 ‰) ou constituées d'eau salée mais devant ensuite être rejetées dans des eaux douces; elle fait en outre appel à de l'eau douce comme eau de contrôle/de dilution. On peut l'utiliser dans d'autres contextes mais, dans certains cas, l'incidence réelle ou potentielle de substances données sur l'environnement d'eau douce est encore à l'étude. Il est possible d'utiliser d'autres essais, sur des espèces acclimatées à l'eau de mer, pour déterminer l'incidence réelle ou potentielle de substances dans les environnements estuariens ou marins, ou encore pour évaluer des solutions d'essai d'une salinité supérieure à 10 ‰ qui doivent être rejetées dans de tels environnements.

Section 2

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèces

Il faut utiliser, dans un essai de toxicité donné, soit *Daphnia magna*, soit *Daphnia pulex* (figure 2). Le choix de l'espèce dépend de la dureté de l'eau de contrôle/de dilution. *D. pulex* peut être utilisée dans tous les cas, mais il est recommandé d'y avoir recours si la dureté de l'eau de contrôle/de dilution est inférieure à 80 mg/L; on peut se servir de *D. magna* lorsque la dureté de l'eau est supérieure ou égale à cette valeur^a.

2.2 Cycle biologique

On doit utiliser des daphnies néonates (âgées de 24 h ou moins) pour les essais. On les obtient en transférant des femelles gravides des réservoirs d'élevage à de plus petits contenants d'eau d'élevage/de contrôle/de dilution, 24 h avant le début de l'essai. Il est recommandé d'ajouter de la nourriture et, au besoin, des nutriments à cette eau (section 2.4.10) afin d'accroître la proportion d'adultes qui muent et libèrent leur couvée. Il est souhaitable, mais non nécessaire, de connaître

^a Les néonates de *D. magna* sont plus grosses et plus faciles à observer dans les solutions d'essai. Cependant, cette espèce ne se retrouve, dans la nature, que dans de l'eau d'une dureté supérieure à 150 mg/L (Pennak, 1978), et son utilisation dans des solutions d'eau douce peut donner lieu à des mortalités provoquées par le stress osmotique (Greene et al., 1988). Le stress subléthal provoqué par une dureté inférieure de l'eau pourrait aussi avoir une incidence sur la résistance des organismes à la substance à expérimenter. Étant donné que *D. pulex* vit naturellement tant dans les eaux douces que dans les eaux dures, on en recommande l'utilisation pour les solutions d'essai dont la dureté est inférieure à 80 mg/L.

Selon des études inédites d'Environnement Canada (PE, région de l'Atlantique), au moins certaines souches de *D. magna* élevées en laboratoire peuvent survivre et se reproduire normalement dans de l'eau dont la dureté est supérieure ou égale à 25 mg/L. Cependant, de l'eau plus douce peut provoquer des mortalités aiguës. Une dureté supérieure ou égale à 80 mg/L est donc recommandée pour l'élevage de *D. magna* et les essais sur cette espèce.

l'âge des femelles et de les utiliser vers le milieu de leur période de reproduction (c.à-d., lorsqu'elles ont entre deux et quatre semaines; voir les section 2.4.3 et 4.2).

2.3 Source

On peut se procurer des élevages de *D. magna* ou de *D. pulex* auprès de maisons commerciales de fournitures biologiques et de laboratoires du gouvernement. Pour obtenir des conseils sur les sources de daphnies convenant à l'exécution d'essais de toxicité aquatique, on peut communiquer avec les bureaux régionaux de la Protection de l'environnement (annexe A).

Pour lancer un élevage, très peu d'organismes sont nécessaires (de 20 à 30). Si l'on a des doutes sur l'espèce de daphnies, il faut la confirmer, sur le plan taxonomique, au moyen d'un examen microscopique de la taille et du nombre des épines sur la griffe post-abdominale (figure 2) (Pennak, 1978; EPA, 1985a). Tous les organismes utilisés au cours d'un essai doivent provenir du même élevage.

2.4 Élevage

2.4.1 Généralités

Les conditions et méthodes recommandées pour l'élevage des daphnies sont exposées ci-après; le lecteur en trouvera un résumé au tableau 1. Ces conditions et méthodes visent à laisser une certaine marge de manoeuvre aux divers laboratoires, tout en normalisant les conditions, qui, si elles n'étaient pas contrôlées, pourraient influencer sur la santé et le rendement des organismes.

Certaines méthodes d'élevage fructueuses sont couramment utilisées au Canada et ailleurs (EPA, 1982; ASTM, 1984; EPA, 1985a; Greene *et al.*, 1988; Poirier *et al.*, 1988; BNQ, 1990). Le

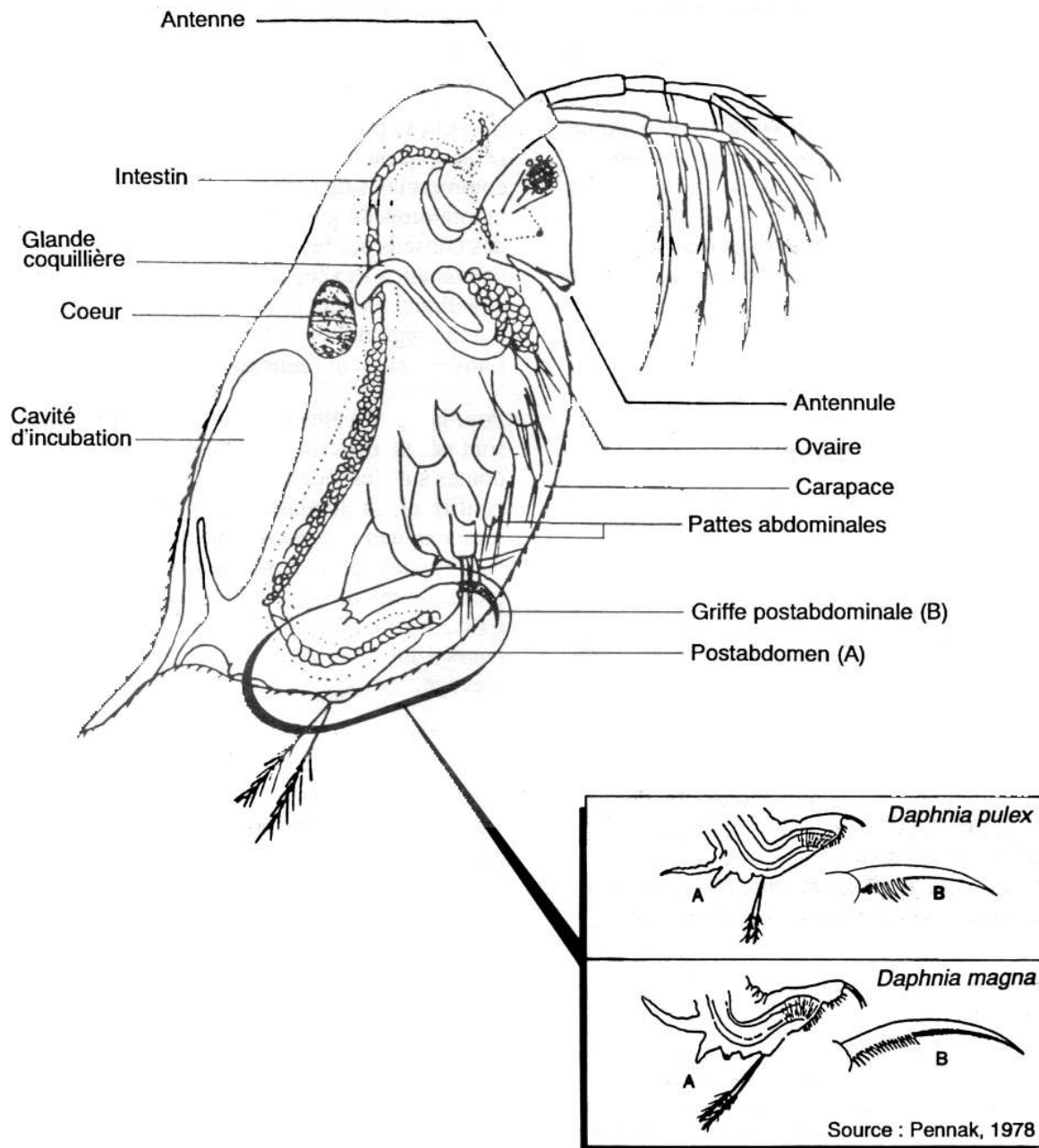


Figure 2 Anatomie de la daphnie femelle (Sources : EPA, 1985a; Poirier *et al.*, 1988)

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour l'élevage des daphnies

Source de daphnies	Maisons de fournitures biologiques ou laboratoires du gouvernement; espèce confirmée par examen microscopique.
Eau	Eau de surface ou souterraine non contaminée, eau municipale déchlorée ou eau reconstituée; l'eau doit être remplacée au moins une fois par semaine et la densité des daphnies réduite à 20 par litre.
Température	20 ± 2 °C pendant deux semaines aux moins avant l'essai.
Oxygénation/aération	Oxygène dissous de 60 à 100 % de saturation, maintenu au besoin par aération avec de l'air filtré et exempt d'huile.
pH	Entre 6,0* et 8,5 de préférence entre 6,5 et 8,5.
Dureté	Correspondant, à 20 % près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution, pendant sept jours au moins avant l'essai.
Qualité de l'eau	Température, oxygène dissous et pH surveillés dans chaque réservoir de élevage, de préférence chaque jour.
Éclairage	Éclairage fluorescent, de préférence «blanc froid»; entre 400 et 800 lux à la surface; lumière pendant 16 ± 1 h, obscurité pendant 8 ± 1 h.
Alimentation	Cultures d'algues avec ou sans suppléments (p. ex., YCT).
Manipulation	Manipulation minimale, en prenant toutes les précautions nécessaires pour verser, siphonner ou pipetter.
Critères de santé	Génitrices sans éphippium; 25 % ou moins de mortalité pendant la semaine précédant l'essai; âge maximal de 12 jours à la première couvée; femelles de deux à cinq semaines, pour assurer une moyenne de 15 néonates ou plus.

* Pour l'élevage de *D. magna*, on devrait utiliser des eaux dont le pH est supérieur à 7,4 et la dureté supérieure ou égale à 80 mg/L.

présent document n'a pas pour objet de reprendre en détail les renseignements concernant ces méthodes; les personnes qui souhaitent lancer des élevages de daphnies sont donc invitées à examiner les publications indiquées pour obtenir de plus amples renseignements sur les méthodes éprouvées d'élevage de ces organismes. Les recommandations et exigences suivantes visent à assurer un degré supérieur de normalisation et de contrôle de la qualité dans la production de daphnies en vue d'essais de toxicité aquatique.

2.4.2 Installations

Les daphnies doivent être élevées et conservées dans un laboratoire. L'alimentation en air devrait être exempte d'odeurs et de poussières détectables. Idéalement, l'installation d'élevage devrait être isolée de l'installation d'essai, afin d'éviter ou de réduire les risques de contamination des élevages par les produits volatils libérés par les échantillons et les solutions d'essai.

Les réservoirs et accessoires en contact avec des organismes et les milieux d'élevage doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, acier inoxydable, Nalgene^{MC}, porcelaine ou polyéthylène). Pour les élevages en masse, on recommande l'usage d'aquariums de verre ou de bocaux à ouverture large d'une capacité de 3 L ou plus, étant donné qu'ils permettent d'observer facilement les daphnies.

Les matériaux comme le cuivre, le laiton, le métal galvanisé, le plomb et le caoutchouc naturel ne doivent pas entrer en contact avec les réservoirs ou les milieux d'élevage, ni avec les échantillons et réservoirs d'essai. On devrait couvrir les réservoirs d'élevage, afin de les mettre à l'abri de la poussière et de minimiser l'évaporation.

2.4.3 Gestion des élevages

Dans les élevages de masse de 3 L ou plus, l'eau de chaque réservoir devrait être remplacée presque

entièrement, au moins une fois par semaine^b (EPA, 1982; Greene *et al.*, 1988). La densité de la population de daphnies devrait alors être réduite à environ 20 animaux ou moins par litre. Une valeur inférieure peut permettre d'obtenir des résultats plus satisfaisants, et une densité d'élevage de seulement quatre *D. magna* adultes par litre a été recommandée ailleurs, afin d'éviter la production d'éphippiums (Cowgill, 1989). Il est souhaitable de disposer d'au moins cinq réservoirs d'élevage pour chaque espèce servant aux essais^c.

D'autres méthodes ont été fructueuses; par exemple, on a utilisé des bocaux d'élevage de 1 L, en nourrissant les daphnies et en changeant l'eau trois fois par semaine. Selon ce régime, il faudrait réduire la densité des daphnies conformément à la valeur normalisée de 20 animaux ou moins par litre.

Une solution de rechange recommandée consiste à lancer de nouveaux élevages chaque semaine, en utilisant de l'eau nouvelle et des néonates provenant de l'élevage de la semaine précédente. Il faudrait conserver des élevages de trois générations successives (soit les mères, les filles et les petite-filles), en prévoyant des réservoirs en double pour chaque âge. Ainsi, on pourrait toujours disposer d'adultes de deux à cinq semaines capables de fournir des néonates pour les essais (section 4.2).

^b Si le milieu n'est pas remplacé au moins une fois par semaine et la densité de la population réduite à un niveau admissible ($\leq 20/L$, PE, région de l'Atlantique), les déchets accumulés pourraient entraîner un effondrement de la population ou la production de mâles, d'éphippiums ou des deux (Green *et al.*, 1988). On trouvera dans Greene *et al.* (1988) des détails sur une technique de siphonnage permettant de remplacer 90 % du milieu d'élevage.

^c Des élevages multiples permettent de prévenir la perte de toute une population en raison d'effondrements de la population dans un ou plusieurs réservoirs (EPA, 1985a).

2.4.4 Éclairement

L'éclairement devrait être entre 400 et 800 lux à la surface de l'eau; idéalement, la lumière devrait tendre vers l'extrémité violette du spectre (indice de rendu des couleurs supérieur ou égal à 90) (Buikema, 1973; ASTM, 1984; Poirier *et al.*, 1988). Des appareils fluorescents blanc froid sont indiqués, mais on peut utiliser d'autres sources d'éclairage (p. ex., des fluorescents à spectre continu), à la condition de pouvoir respecter les critères de santé définis à la section 2.4.12. La photopériode doit normalement correspondre à une séquence de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité^d.

2.4.5 Eau

L'eau pour l'élevage des daphnies peut consister en un approvisionnement non contaminé d'eau souterraine ou de surface, d'eau potable municipale déchlorée ou d'eau reconstituée, corrigée pour obtenir une dureté particulière (sections 2.4.9, 4.1 et 5.3); il peut aussi s'agir d'un échantillon de milieu récepteur «en amont», prélevée dans la nappe d'eau visée par l'essai. Cette eau devrait favoriser de façon constante et fiable la survie, la santé, le développement et la reproduction des daphnies. Afin d'assurer une bonne qualité de l'eau, il faudrait effectuer, aussi souvent que nécessaire, des contrôles et des évaluations des variables comme la dureté, l'alcalinité, le chlore résiduel (si l'on utilise de l'eau municipale), le pH, le carbone organique total, la conductivité, les solides en suspension, l'oxygène dissous, les gaz totaux dissous, la température, l'azote ammoniacal, les nitrites, les métaux et l'ensemble des pesticides organophosphorés.

S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour l'élevage des daphnies et comme eau de contrôle/de dilution, il faut la soumettre à une

déchloration efficace, de sorte qu'elle soit exempte de toute concentration nocive de chlore. La teneur en chlore résiduel total des élevages et de l'eau de contrôle/de dilution dans les récipients d'essai ne devrait pas dépasser 0,002 mg/L (CCMRE, 1987). Pour atteindre cet objectif, il est recommandé d'utiliser des filtres de charbon activé (charbon d'os), puis un rayonnement ultraviolet (Armstrong et Scott, 1974)^e; par ailleurs, on peut aussi conserver l'eau dans des réservoirs et l'aérer vigoureusement pendant au moins 24 h après la filtration au charbon. Dans les cas très difficiles, on pourrait encourager la croissance d'algues dans les réservoirs d'aération de l'eau afin d'éliminer le chlore résiduel, puis filtrer l'eau avant de l'utiliser avec les daphnies.

L'eau d'élevage ne doit pas être sursaturée en gaz. Si on a lieu de croire qu'il peut y avoir sursaturation, on devrait vérifier fréquemment la pression de gaz totale de l'alimentation en eau (Bouck, 1982). Si la saturation en gaz dissous dépasse 100 %, il faut recourir à des mesures correctives (p. ex., l'utilisation de colonnes d'aération ou une aération vigoureuse dans un réservoir ouvert). Il n'est pas facile d'éliminer complètement la sursaturation; si l'on sait ou si l'on soupçonne que ce problème existe, il faudrait effectuer fréquemment des contrôles.

La température de l'eau, sa teneur en oxygène dissous et son pH devraient être contrôlés dans chaque élevage, de préférence chaque jour.

2.4.6 Température

La température de l'eau d'élevage devrait être de $20 \pm 2^\circ \text{C}$. Un incubateur, un bain-marie, une pièce à température contrôlée ou un chauffe-

^d Un longue période d'éclairement diurne (16 ± 1 h) stimule la reproduction asexuelle (nécessaire pour l'essai), alors que de brèves périodes d'éclairement stimulent la reproduction sexuelle (Buikema *et al.*, 1980).

^e L'addition de thiosulphate ou d'autres produits chimiques à l'eau pour enlever le chlore résiduel n'est pas recommandée. Ces produits chimiques pourraient emprisonner les métaux traces essentiels à la santé des daphnies ou, s'ils se retrouvaient dans l'eau de dilution, ils pourraient modifier la toxicité de l'échantillon.

aquarium peuvent servir à régler la température. Si les élevages se retrouvent à une température inférieure ou supérieure, il faudrait la corriger progressivement (à raison d'au plus 3° C/d) pour la ramener à $20 \pm 2^\circ \text{C}$, et la maintenir à ce niveau pendant au moins deux semaines.

2.4.7 Oxygène dissous

L'eau destinée aux élevages devrait être aérée vigoureusement avant usage, de sorte qu'elle soit saturée d'oxygène et exempte de toute sursaturation en gaz. Après l'aération, il faudrait la laisser reposer pendant environ 0,5 h avant de l'utiliser dans les élevages, pour permettre aux bulles d'air de se dissiper et pour favoriser la mise en équilibre définitive du pH ainsi que de l'oxygène et des autres gaz dissous.

La teneur en oxygène dissous des élevages ne devrait pas être inférieure à 60 % de saturation en air. Afin de la maintenir à ce niveau, on devrait assurer, au besoin, une légère aération de chaque élevage au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile (OCDE, 1981; EPA, 1982; Greene *et al.*, 1988; Poirier *et al.*, 1988).

2.4.8 pH

Le pH de l'eau utilisée pour l'élevage des daphnies devrait être compris entre 6,0 et 8,5. Il est préférable d'utiliser une eau dont le pH se situe entre 6,5 et 8,5 (Poirier *et al.*, 1988). L'élevage de *D. magna* requiert normalement une eau dont le pH est supérieure à 7,4 et la dureté supérieure ou égale à 80 mg/L.

2.4.9 Dureté

Lorsqu'on utilise de l'eau naturelle (eau souterraine ou de surface non contaminée ou eau municipale déchlorée) pour l'élevage et comme eau de contrôle/de dilution, il est recommandé que sa dureté se situe entre 80 et 250 mg/L si c'est *D. magna* qu'on élève ou qui sert aux essais, et entre 10 et 250 mg/L si l'on utilise *D. pulex*^a. On ne devrait pas utiliser d'eaux dont la dureté est supérieure à 250 mg/L, sauf si l'on étudie l'incidence de la dureté de l'eau sur la toxicité aiguë.

On peut utiliser de l'eau reconstituée lorsqu'on a besoin d'un milieu d'élevage et d'une eau de contrôle/de dilution normalisée, ou lorsqu'on ne dispose pas d'un approvisionnement convenable en eau naturelle non contaminée. Il est recommandé d'utiliser une eau reconstituée relativement douce; la dureté totale devrait être de 40 à 48 mg/L pour *Daphnia pulex* et de 80 à 100 mg/L pour *Daphnia magna* (sections 4.1 et 5.3). Ces valeurs correspondent relativement bien à celles qui sont recommandées dans d'autres documents de méthodologie (annexe B), ce qui facilite les comparaisons des résultats de toxicité.

On peut obtenir une dureté particulière en préparant de l'eau reconstituée. Le tableau 2 présente des formules permettant d'obtenir d'une dureté et d'un pH particuliers (EPA, 1985); il existe aussi d'autres formules appropriées (ISO, 1982). On peut aussi corriger la dureté de l'eau du laboratoire (eau souterraine ou de surface non contaminée, ou eau municipale déchlorée) en la diluant, si elle est trop dure, ou en y ajoutant de l'eau dure reconstituée ou des proportions et des quantités appropriées de sels, si elle est trop douce.

Que l'on utilise de l'eau naturelle ou de l'eau reconstituée comme milieu d'élevage et comme eau de contrôle/de dilution, les daphnies doivent être élevées pendant au moins sept jours dans une eau d'une dureté identique ou semblable à celle de l'eau de contrôle/de dilution employée pour les essais^f. Sauf dans des circonstances spéciales ou lorsque les besoins de l'essai l'imposent, on devrait utiliser le même approvisionnement en

^f L'eau d'élevage pourrait être de l'eau reconstituée provenant de la même source et possédant la même formule que celle devant servir d'eau de contrôle/de dilution, ou encore de l'eau naturelle dont la dureté a été corrigée pour correspondre, à 20 % près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution. Tout écart supérieur de dureté entre l'eau d'élevage et l'eau de contrôle/de dilution pourrait entraîner des résultats erronés, en raison du stress osmotique imposé aux organismes.

eau comme milieu d'élevage et comme eau de contrôle/de dilution.

2.4.10 Alimentation

Il faut nourrir les daphnies pendant leur élevage. La nourriture utilisée devrait être offerte en quantité suffisante et permettre de maintenir les organismes dans un état nutritif qui soutienne leur activité métabolique normale et qui soit conforme aux critères de santé définis à la section 2.4.12. Les suggestions suivantes pourront permettre d'éviter les problèmes connus.

La documentation (EPA, 1982; ASTM, 1984; EPA, 1985a; Colombie-Britannique, 1988; Greene *et al.*, 1988; Poirier *et al.*, 1988) décrit dans les détails un certain nombre de régimes, de rations alimentaires et de calendriers éprouvés pour l'élevage des daphnies. Les méthodes d'alimentation et d'élevage de Goulden *et al.* (1982) ont connu du succès. L'alimentation avec des cultures de laboratoire d'algues vertes (*Selenastrum capricornutum* ou *Chlorella pyrenoidosa*) est répandue (EPA, 1982; Poirier *et al.*, 1988) et souhaitable; un mélange de deux ou plusieurs espèces est avantageux, en particulier un mélange d'algues vertes et d'une diatomée telle que *Nitzschia frustulum* (Cowgill, 1989). On sait également que les daphnies se développent bien lorsqu'elles sont nourries de *Scenedesmus acutus*. *Chlorella vulgaris*, *Chlamydomonas reinhardtii* et *Ankistrodesmus convolutus* (ou *A. faculatus*) sont d'autres espèces d'algues qui ont été utilisées. La collection de cultures de l'université de Toronto* est une source de cultures pour ces espèces; on peut aussi en obtenir dans certaines maisons commerciales de fournitures biologiques. Pour pouvoir offrir aux daphnies les nutriments qui leur conviennent, chaque espèce d'algue doit croître dans un milieu de culture convenable.

À titre de solution de rechange, ou de pair avec les algues, on a aussi utilisé une nourriture préparée composée d'une moulée de levure et de truite (EPA, 1985a; Colombie-Britannique, 1988; Greene *et al.*, 1988) ou d'une moulée de levure, de Cerophyll^{MC} et de truite (YCT) (EPA, 1989). On a également utilisé avec succès, à titre de supplément alimentaire, une suspension de nourriture pour poissons tropicaux de marque Tetramin^{MC**}. Cependant, un régime entièrement artificiel (p. ex., reposant exclusivement sur de la moulée de truite ou de la levure) n'est pas recommandé, car il peut abréger la vie des néonates et réduire leur résistance aux substances toxiques (Cowgill, 1989). On a relevé dans certaines nourritures commerciales pour poissons des niveaux indésirables de pesticides ou de métaux et de BPC; par conséquent, certains expérimentateurs préfèrent n'utiliser que de la levure, du Cerophyll^{MC} ou une combinaison de ces deux produits comme supplément pour l'élevage des daphnies. Dans l'ensemble, l'expérience des laboratoires au Canada donne à croire qu'il faudrait utiliser au moins une et, de préférence, deux ou plusieurs espèces d'algues, peut-être avec un supplément de levure, de moulée de truite ou de Cerophyll^{MC}.

On trouvera à l'annexe C des formules permettant de préparer de la moulée de levure, de Cerophyll^{MC} et de truite (YCT) et un concentré d'algues (*Selenastrum capricornutum* ou un mélange d'espèces d'algues) pour nourrir les élevages de daphnies. Si l'on y a recours, on devrait nourrir les daphnies à raison de 7 mL d'YCT et de 7 mL de concentré d'algues par litre (EPA, 1989). On devrait mélanger parfaitement le concentré d'algues et l'YCT (annexe C) en les agitant ensemble avant de les distribuer. Si l'YCT est congelée, les aliquotes dégelées pour utilisation devraient être conservées dans un réfrigérateur sans être recongelées. Les portions

* Département de botanique, Université de Toronto, Toronto (Ontario) M5S 1A4. Téléphone : (416) 978-3641; télécopieur : (416) 978-3884.

** Communication personnelle, PE, région de l'Atlantique.

Tableau 2 Préparation d'eau reconstituée d'une dureté particulière

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

* Ajouter des produits chimiques de qualité «réactif» à de l'eau distillée ou désionisée.

** En mg/L (CaCO₃).

*** pH équilibré approximatif après aération pendant 24 h.

Source: EPA, 1985a.

inutilisées d'YCT non congelée ou dégelée devraient être jetées après deux semaines. Les portions inutilisées de concentré d'algues devraient être conservées au réfrigérateur et jetées après un mois.

Une carence en vitamine B₁₂ ou en sélénium peut nuire à l'état de santé des daphnies; il faudrait donc en ajouter régulièrement à l'eau d'élevage, du moins si l'on utilise de l'eau reconstituée. Le sélénium devrait être ajouté à raison de 2 µg par litre, au moyen de sélénate de sodium (Na₂SeO₄). Une insuffisance en sélénium dans l'eau peut entraîner la détérioration de la carapace externe des daphnies, réduire leur espérance de vie et empêcher leur progéniture de parvenir à maturité et de se reproduire, d'après les conclusions des travaux effectués par Keating et Dagbuson (1984), telles que citées par Cowgill (1989). Il faudrait aussi ajouter de la vitamine B₁₂ à l'eau d'élevage artificielle à raison de 2 µg/L de cyanocobalamine. Les solutions mères de vitamine B₁₂ sont instables et ne devraient pas être stockées pour plus de deux semaines. Une carence de cette vitamine peut retarder la reproduction, causer une réduction de la fréquence des mues et empêcher la progéniture de se reproduire (Cowgill, 1989; d'après Keating, 1985).

Le choix définitif de la ration et du régime d'alimentation est laissé à la discrétion de chaque laboratoire, en fonction de son expérience et de sa réussite quant au respect des critères de santé précisés pour les organismes élevés (section 2.4.12).

2.4.11 Manipulation des organismes

On peut transférer des daphnies adultes d'un contenant à un autre en versant doucement le liquide où elles se trouvent, sans risquer d'emprisonner de l'air sous leur carapace ni de leur causer d'autres dommages appréciables. On peut retirer des réservoirs d'élevage les daphnies adultes convenant à la création d'une colonie d'élevage (c.-à-d. d'une source de néonates) en les pipettant ou en les siphonnant doucement dans un tamis de calibre approprié (p. ex., avec des mailles de 2 mm sur 1mm), puis en les transférant rapidement dans un autre contenant (section 4.2).

La manipulation et le transfert des néonates devraient être réduits au minimum, et il faut protéger les réservoirs d'élevage contre les chocs. Les jeunes daphnies sont vulnérables à l'emprisonnement d'air et devraient être d'une pipette de verre. Une pipette jetable dont l'extrémité d'éjection est coupée et polie à la

flamme pour assurer une ouverture de 5 mm est idéale à cette fin (EPA, 1985a; Greene *et al.*, 1988). L'extrémité de la pipette devrait rester sous la surface de l'eau quand on libère les daphnies (ASTM, 1984).

2.4.12 Critères de santé

Les élevages de daphnies devant servir à des essais de toxicité devraient respecter les critères suivants en matière de santé (Hebert, 1978; Plotkin et Ram, 1983; Colombie-Britannique, 1988; Poirier *et al.*, 1988; APHA *et al.*, 1989) :

- Il ne doit pas avoir d'éphippiums dans l'élevage.
- Il ne faut pas enregistrer plus de 25 % de décès dans le stock de génitrices au cours des sept jours précédant l'essai, s'il s'agit d'un élevage regroupant plusieurs groupes d'âge.
- Les daphnies devraient être âgées d'au plus 12 jours au moment de leur première couvée.

- Les femelles de deux à cinq semaines doivent produire une moyenne de 15 néonates ou plus par couvée; une couvée de 20 néonates devrait être facile à obtenir.

On peut suivre de près l'état de santé des élevages en vérifiant fréquemment le temps écoulé jusqu'à la première couvée et le nombre moyen de néonates par couvée (Poirier *et al.*, 1988). Pour établir ces indices sur la santé, on peut placer quelques néonates (âgées de moins de 24 h) dans des béciers de verre, les conserver dans les mêmes conditions que l'élevage principal et consigner le temps écoulé jusqu'à la première couvée et le nombre moyen de néonates par couvées au cours d'une période d'observation de 21 jours.

L'essai de sensibilité des daphnies à un produit toxique de référence (section 4.6) fournit un autre indice de l'état de santé de l'élevage et son aptitude à subir un essai de toxicité.

Système d'essai

3.1 Installations

L'essai peut être effectué dans un bain-marie, un simulateur d'environnement ou une installation équivalente avec réglage de température ($20 \pm 2^\circ \text{C}$). Cette installation devrait être isolée des bouleversements physiques qui peuvent influencer les organismes soumis à l'essai. Étant donné qu'il faut contrôler la photopériode (section 3.2), l'installation doit consister en un laboratoire distinct ou en une partie de laboratoire entourée de rideaux (p. ex., en plastique noir). La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum.

Les matériaux de construction et tout appareil pouvant entrer en contact avec l'eau de contrôle/de dilution ou les solutions d'essai dans lesquelles les organismes seront déposés ne devraient pas renfermer de substances susceptibles de dénaturer par lixiviation les solutions d'essai ou d'accroître la sorption de la substance à expérimenter^g (section 2.4.2). Le laboratoire doit être doté des appareils permettant de mesurer les variables fondamentales de la qualité de l'eau (température, conductivité, oxygène dissous et pH), et l'on doit être prêt à effectuer une analyse rapide et exacte d'autres variables, comme la dureté et le chlore résiduel.

3.2 Éclairement

Les conditions d'éclairement auxquelles les organismes sont soumis devraient être identiques

^g Il faudrait choisir les matériaux et les appareils de façon à réduire ou à éliminer la probabilité d'introduire dans les solutions d'essai des produits chimiques contaminants qui pourraient avoir des effets toxiques sublétaux. De même, les matériaux retenus ne devraient pas provoquer d'adsorption de produits chimiques ni d'accroissement de la volatilité, ce qui donnerait lieu à une perte de produits chimiques dans la solution et à des erreurs dans les résultats de l'essai.

à celles définies à la section 2.4.4. À noter cependant que l'intensité de la radiation ultraviolette (UV-B) obtenue avec un éclairage fluorescent blanc froid ou des fluorescents à spectre continu ne se rapproche pas de celle obtenue avec un éclairage naturel, et que la toxicité de certains effluents et produits chimiques peut être fortement altérée par des réactions photolytiques causées par les rayons UV-B. Pour certains essais (p.ex., photo-activation ou photodégradation de matières toxiques causées par les rayons UV), des éclairages spéciaux (p. ex., lampes à vapeur de mercure à haute pression) dotés de caractéristiques spectrales différentes peuvent convenir. Des informations utiles sont données à ce sujet dans la publication de l'ASTM (1995). Les études visant à déterminer l'influence de l'éclairement sur la toxicité pourraient comprendre des comparaisons juxtaposées avec des réplicats de solutions exposées à des conditions d'éclairement différentes (p. ex., éclairage fluorescent blanc froid *versus* lampe à vapeur de mercure haute pression). La photopériode (en principe 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité) doit être établie pour coïncider avec celle à laquelle les organismes ont été acclimatés.

3.3 Récipients d'essai

Les récipients d'essai doivent être en verre^h ou en plastique transparent. On peut utiliser des béchers de verre borosilicaté (d'une capacité de 150 ou de 250 mL) ou des éprouvettes de verre (Poirier *et al.*, 1988). On peut également utiliser des sacs de plastique non toxique et inerte (p. ex., Whirl-Pak^{MC}), sauf pour les essais de produits

^h Les contenants en verre sont inertes et faciles à nettoyer, et ils permettent d'observer sans obstacle les organismes soumis à l'essai. L'adsorption des contenants qui ne sont pas en verre (p. ex., en polyéthylène, en polypropylène, en acier inoxydable) varie considérablement d'un produit chimique à un autre.

chimiques (section 5.2). Le récipient retenu devrait être assez grand pour permettre que la densité de chargement ne soit pas supérieure à une daphnie par 15 mL de solution d'essai.

3.4 Eau de contrôle/de dilution

Le choix de l'eau de contrôle/de dilution dépend d'un certain nombre de variables, notamment la substance à expérimenter et l'objet de l'essai (sections 5 à 7), la dureté des solutions d'essai ainsi que la dureté et la nature de l'eau à laquelle les organismes ont été acclimatés (section 2.4). En conséquence, l'eau de contrôle/de dilution peut être : de l'eau souterraine; de l'eau de surface non polluée (provenant d'un cours d'eau ou d'un lac); de l'eau municipale déchlorée provenant d'une source non contaminée; de l'eau reconstituée d'un pH et d'une dureté particuliers (sections 2.4.9 et 4.1); ou un échantillon de milieu récepteur recueilli en amont ou à

proximité de la source de contamination, mais à l'abri de son influence. Les conditions relatives au prélèvement, au transport et au stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1.

Idéalement, l'eau de d'élevage de contrôle/de dilution devrait être de qualité identique ou essentiellement semblable, et la dureté de toutes les solutions d'essai ne devrait pas différer appréciablement de celle de l'eau d'élevage. Malgré tout, en raison de l'objet de l'essai (p. ex., évaluation de milieux récepteurs pour déterminer les effets toxiques d'un déversement de produits chimiques), ou encore de problèmes d'ordre pratique, logistique ou financier, on peut être amené à choisir une eau de contrôle/de dilution inférieure à la qualité optimale. La dureté de cette eau doit être connue avant le début de l'essai, puisqu'elle peut influencer sur l'espèce de daphnies à utiliser (sections 2.1 et 2.4.9).

Section 4

Méthodes d'essai universelles

Les méthodes exposées dans la présente section s'appliquent à l'ensemble des essais d'eaux usées et de produits chimiques visés dans les sections 5, 6 et 7. Tous les aspects du système d'essai défini dans la section précédente doivent leur être intégrés.

Le tableau 3 fournit une liste de contrôle récapitulative des méthodes recommandées pour tous les essais de toxicité létale aiguë sur des daphnies et pour ceux portant sur des types de substances particuliers.

4.1 Préparation des solutions d'essai

Tous les réservoirs, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et contenants servant pour le transfert des daphnies doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément à de bonnes pratiques de laboratoire. Des méthodes de nettoyage appropriées ont été établies par l'ASTM (1984).

On peut préparer de l'eau reconstituée d'une dureté particulière^f pour l'utiliser comme eau de contrôle/de dilution. Le tableau 2 indique les types et les quantités de produits chimiques de qualité «réactif» qu'il faut ajouter à de l'eau distillée ou désionisée pour obtenir de l'eau de contrôle/de dilution (ou un milieu d'élevage) possédant une dureté, une alcalinité et un pH particuliers (ASTM, 1980; EPA, 1985a).

D'autres formules, qui ont été utilisées avec succès, ont été établies par l'ISO (1982). Les formules prévues pour l'eau «douce» et l'eau «modérément dure» sont recommandées pour la préparation d'eaux normalisées destinées à *Daphnia pulex* et *D. magna* respectivement (section 2.4.9). L'eau reconstituée devrait être aérée vigoureusement dans un réservoir non toxique pour une durée d'au moins 24 h avant son utilisation (EPA, 1985a).

De l'eau souterraine non contaminée, de l'eau de surface naturelle ou de l'eau municipale déchlorée peuvent également subir une correction de leur dureté et servir comme eaux de contrôle/de dilution. On peut en effet diluer l'eau en cause avec de l'eau désionnée ou distillée (si elle est trop dure), ou augmenter sa dureté par l'addition d'une proportion et d'une quantité appropriée de produits chimiques de qualité «réactifs» (tableau 2). La dureté de l'eau de contrôle/de dilution doit correspondre, à 20 % près, à celle de l'eau utilisée pour l'élevage des organismes soumis à l'essai^f (section 2.4.9).

L'eau de contrôle/de dilution utilisée pour les essais sur les daphnies doit être amenée à la température d'essai (normalement, $20 \pm 2^\circ \text{C}$) avant d'être utilisée. La saturation de cette eau en gaz excédentaires doit être évitée (section 2.4.5).

Avant d'être utilisée, l'eau de contrôle/de dilution devrait avoir une teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de la valeur de saturation en air. Au besoin, on devrait aérer vigoureusement le volume nécessaire d'eau de contrôle/de dilution (au moyen d'un jet d'air par comprimé exempt d'huile passant par des pierres de barbotage) immédiatement avant de l'utiliser, et vérifier sa teneur en oxygène dissous afin de confirmer que le niveau de saturation de 90 à 100 % a été atteint.

Les concentrations d'essai et le nombre de solutions d'essai à préparer dépendent de l'objet de l'essai. Les essais de surveillance et de conformité portent sur des eaux usées ou des milieux récepteurs peuvent, dans certains cas, exiger la préparation d'une seule concentration d'essai (p. ex., l'échantillon non dilué) et d'une solution de contrôle (sections 6 et 7). Pour chaque essai visant à y établir une CL50

Tableau 3 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées**Méthodes Universelles**

Type d'essai	Statique, durée de 48 h*.
Eau de contrôle/ de dilution	Eau souterraine ou eau de surface non contaminée ou municipale déchlorée; eau reconstituée s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; milieu récepteur «en amont» pour évaluer l'effet toxique à un endroit précis**; oxygène dissous (OD) de 90 à 100 % de saturation au moment de l'utilisation.
Organismes	Néonates de <i>Daphnia magna</i> ou de <i>D. pulex</i> ; au moins dix organismes par concentration; densité de chargement maximal : une daphnie par 15 mL.
Température	20 ± 2°C.
Oxygène/ aération	Aucune aération pendant l'essai.
pH	Aucune correction si le pH de la solution d'essai est compris entre 6,0 et 8,5***; un deuxième essai (à pH corrigé) peut s'avérer nécessaire ou pertinent si le pH de l'échantillon ou de la solution n'est pas compris dans cet intervalle.
Éclairement	Fluorescent, de préférence «blanc froid»; entre 400 et 800 lux à la surface; normalement, 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité.
Alimentation	Ne pas nourrir les organismes pendant l'essai.
Observations	Mort et comportement atypique (p. Ex., immobilité, léthargie, rotation, flottaison), au moins au début et à la fin d'essai.
Mesures	Température, pH et OD de la solution, au moins au début et à la fin de l'essai; conductivité, au moins au début; dureté.
Résultats	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai et la substance à expérimenter; il peut s'agir d'établir la CL50 après 48 h (nécessitant des limites de confiance à 95 %) ou d'un essai à concentration unique (pourcentage de mortalité après 48 h ou moins; TL50).
Produits toxiques de référence	Un ou plusieurs des composés suivantes : sulfate du zinc, chlorure de sodium ou bichromate de potassium; essai statique de CL50 après 48 h, dans les 14 jours précédant ou suivant l'essai.
Validité de l'essai	L'essai n'est pas valable si plus de 10 % des organismes témoins meurent ou ont un comportement manifestement stressé (p. ex., immobilité).

Produit Chimiques

Solvants	À utiliser seulement dans des cas particuliers.
Concentration	Il est recommandé de mesurer la concentration au début et à la fin de l'exposition, dans les solutions à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle; si les concentrations diminuent de plus de 20 %, réévaluer en utilisant un essai à renouvellement continu ou périodique.
Eau de contrôle/ de dilution	Selon l'objet de l'essai; eau reconstituée s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; milieu récepteur pour étudier les effets toxiques locaux; sinon, eau du laboratoire non contaminée.

Effluents et Lixiviats

Transport et stockage	Transport à la température ambiante (plus de 1°C, moins de 30 °C) ou entre 1 et 8°C si le délai de transport est supérieur à deux jours; les échantillons ne devraient pas geler pendant le transport; stocker dans l'obscurité entre 1 et 8°C (de préférence à $4 \pm 2^\circ \text{C}$); l'essai devrait commencer dans les trois jours et doit être mis en route dans les cinq jours du prélèvement des échantillons.
Eau de contrôle/ de dilution	Selon l'objet de l'essai; eau du laboratoire, eau reconstituée ou milieu récepteur «en amont» pour les essais de surveillance et de conformité.

Élutriats

Transport et stockage	Procéder à l'extraction dans les sept jours de la réception des échantillons; conserver dans l'obscurité entre 1 et 8°C (de préférence à $4 \pm 2^\circ \text{C}$); effectuer l'essai dans les dix jours de la réception des échantillons.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau reconstituée s'il faut assurer un degré élevé de normalisation.

Milieux récepteurs

Transport et stockage	Comme pour les effluents et lixiviats.
Eau de contrôle/ de dilution	Selon l'objet de l'essai; milieu récepteur «en amont» pour les effets locaux.

* Dans des cas particuliers (p. ex., produits chimiques instables), il se peut qu'on doive recourir à des essais à renouvellement continu ou périodique, ou encore modifier la durée de l'essai.

** Si le milieu récepteur est utilisé comme eau de contrôle/de dilution, un contrôle supplémentaire est nécessaire; il faut alors utiliser l'eau de laboratoire non contaminée dans laquelle les daphnies ont été élevées.

*** Si le pH n'est pas compris dans cet intervalle, les résultats peuvent indiquer une toxicité attribuable à un pH biologiquement nocif.

définitive après 48 h, il faut préparer au moins cinq concentrations d'essai ainsi qu'une solution de contrôle (eau de dilution à 100 %)ⁱ. On peut utiliser une série géométrique de dilutions, dans laquelle chaque concentration successive s'établit à environ 50 % de la précédente (p. ex., 100, 50, 25, 12,5, 6,3), afin de faciliter le calcul précis de la CL50 et de ses limites de confiance à 95 %. On peut aussi choisir les concentrations d'essai à partir d'une série logarithmique appropriée de dilutions (annexe D).

On peut prévoir, si on le souhaite, des répétitions de chaque concentration d'essai. Cela offre un avantage considérable, puisqu'on peut alors utiliser deux estimations ou plus de la CL50 (ou de la CE50, section 4.4) dans l'examen statistique des écarts par rapport aux résultats obtenus dans d'autres laboratoires, à d'autres moments, pour une autre espèce, etc., en supposant que ces autres essais prévoient également des répétitions. La précision de l'estimation de la CL50 ou de la CE50 (mais pas nécessairement son exactitude) augmente également du seul fait qu'on utilise un plus grand nombre d'organismes. Cette façon de procéder peut convenir particulièrement bien à l'évaluation de nouveaux produits chimiques (section 5.2).

Si l'on utilise un milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution, il faudrait préparer une deuxième solution de contrôle en utilisant l'eau du laboratoire à laquelle les organismes ont été acclimatés pendant deux semaines ou plus. On ne peut utiliser de l'eau d'amont si elle est manifestement toxique selon les critères de

l'essai auquel elle est destinée^j; en pareil cas, l'eau du laboratoire à laquelle les daphnies ont été acclimatées devrait être utilisée comme eau de contrôle et pour l'ensemble des dilutions. Pour un essai donné, il faut utiliser la même eau afin de préparer la solution de contrôle et toutes les concentrations d'essai.

Il se peut qu'on doive corriger le pH des échantillons ou des solutions. Des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre inférieur ou égal à 1 N devraient normalement être utilisées pour toutes les opérations de correction du pH. Certaines situations (p. ex., des échantillons d'effluents à pouvoir tampon élevé) peuvent exiger l'utilisation de teneurs supérieures d'acide ou de base.

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des lignes directrices utiles pour la correction du pH. Il faudrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les solutions d'essai ou les aliquotes d'échantillons faisant l'objet d'une correction du pH^k. On devrait veiller à éviter toute modification excessive du pH. Le délai nécessaire pour atteindre l'équilibre dépend du pouvoir tampon de la solution ou de

ⁱ On peut procéder à un essai préalable (de détermination de l'ordre de grandeur) avant d'entreprendre l'essai définitif; cet essai porte généralement sur une gamme de concentrations plus vaste et se déroule fréquemment en 24 h ou moins. Pour l'essai définitif (qu'il s'agisse d'une concentration unique ou de concentrations multiples), le volume de chaque solution d'essai, y compris les contrôles, doit être identique.

^j L'utilisation d'une eau distincte du milieu récepteur en amont comme eau de dilution ne permet pas aux substances naturelles ou aux autres contaminants présents dans le milieu récepteur de laisser apparaître quelque effet que ce soit sur la toxicité de la substance à expérimenter. Par exemple, des agents chélateurs naturels, comme l'acide humique ou l'acide fulvique, pourraient se lier à la substance à expérimenter et en réduire la toxicité. À l'inverse, la présence de contaminants dans l'eau d'amont pourrait accroître la toxicité établie pour la substance à expérimenter si on la diluait dans cette eau.

^k Pour les essais de produits chimiques ou d'échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats nécessitant une correction du pH, on doit généralement corriger séparément le pH de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle). Les essais qui portent sur des échantillons de milieux récepteurs requièrent normalement la correction du pH d'une aliquote de l'échantillon non dilué, avant la préparation des concentrations d'essai.

l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, il est recommandé de prévoir une durée de 30 à 60 minutes pour la correction du pH (Abernethy et Westlake, 1989).

S'il se peut que la dureté de l'échantillon d'essai (p. ex., eau usée ou milieu récepteur) soit très faible (moins de 25 mg/L) et si l'organisme prévu pour l'essai est *D. magna*, il faut mesurer la conductivité de l'échantillon après qu'il ait atteint la température ambiante mais avant toute dilution. Si la conductivité est de $\leq 100 \mu\text{ohms/cm}$, il faut mesurer la dureté de l'échantillon. Lorsque l'analyse confirme que la dureté de l'échantillon est inférieure à 25 mg/L, il faudrait soit utiliser *D. pulex* pour l'essai*, soit, s'il faut utiliser *D. magna*, corriger la dureté de l'échantillon pour qu'elle s'établisse à 25 mg/L. Cette correction devrait être effectuée par l'addition de la proportion et de la quantité appropriées de produits chimiques de qualité «réactif» requis à cette fin (section 2.4.9.). On doit mélanger parfaitement tout échantillon dont la dureté est corrigée et confirmer sa dureté avant de l'utiliser. À cette exception près, il ne faut pas corriger la dureté de l'échantillon.

Lorsqu'on veut connaître l'influence de la dureté de la solution sur la toxicité de l'échantillon, on devrait au moins mesurer la dureté de la solution de contrôle et des solutions d'essai à teneur inférieure et supérieure, avant le début de l'essai. Ces mesures préalables portent sur des volumes de solutions préparés dans des béchers, une fois apportée toute correction du pH, immédiatement avant qu'on remplisse les récipients d'essai.

Si (et seulement si) la teneur en oxygène dissous mesurée à ce moment dans l'échantillon (p. ex., effluent soumis à l'essai) ou dans une ou plusieurs solutions d'essai (p. ex., substance chimique testée) est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, l'échantillon ou toutes les solutions d'essai devraient être préaérés avant l'exposition des daphnies. On utilisera pour cela de l'air

comprimé exempt d'huile et un diffuseur d'air* propre en verre de silice ou une pipette de verre jetable. Le débit de préaération de l'échantillon ou des solutions d'essai devrait s'établir entre 25 et 50 mL/min.L., et la durée de préaération devrait être limitée à 30 minutes, qu'on ait obtenu ou non de 40 à 100 % de saturation. Les solutions d'essai contenant suffisamment d'oxygène (de 40 à 100 % de saturation en air) ne devraient pas être aérées ni avant ni pendant l'essai.

4.2 Mise en route de l'essai

L'essai doit porter sur des néonates (âgées d'au plus 24 h) de *D. magna* ou de *D. pulex*. Pour en obtenir le nombre nécessaire, il faut enlever des élevages les femelles adultes portant des embryons dans leur cavité d'incubation, 24 h avant le début de l'essai. Ces femelles devraient de préférence être âgées de deux à cinq semaines (section 2.4.3). On transfère ensuite ces adultes dans des béchers de verre propres (d'une capacité de 400 mL ou 1 L) renfermant de l'eau de contrôle/de dilution et un inoculum d'aliments préparés fournissant la même concentration de nourriture que celle qui est utilisée pour l'élevage (section 2.4.10). L'eau de contrôle/de dilution doit au préalable avoir été amenée à la température d'essai ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) et saturée avec de l'oxygène dissous; l'eau dans les béchers de transfert ne devrait pas être aérée. La densité de population dans ces contenants devrait être d'environ 10 adultes par litre ou moins (Poirier *et al.*, 1988).

Les jeunes daphnies que l'on retrouve dans les béchers le lendemain sont utilisées pour l'essai de toxicité. Normalement, cinq béchers renfermant chacun dix adultes permettent

* Un diffuseur convenable mesurant 3,8 cm sur 1,3 cm et adapté à un tube capillaire jetable en plastique d'un diamètre hors-tout de 1,5 cm est offert (article de catalogue no AS-1) par Aqua Recherches Ltée., C.P. 208, North Hatley (Québec), J0B 2C0; Tél. : (819 842-2890). d'obtenir un nombre suffisant de néonates pour

un essai de toxicité (Greene *et al.*, 1988).

Dans la production des néonates, il est recommandé, même si ce n'est pas absolument nécessaire, de connaître approximativement l'âge des adultes, afin d'éviter l'utilisation de femelles jeunes ou sénescences. Les daphnies peuvent ne produire que deux ou trois jeunes organismes au cours de la première couvée; ce nombre peut ensuite passer à 20 ou plus, mais diminue avec la sénescence. Certains auteurs recommandent d'éviter l'utilisation de la première couvée (Goulden *et al.*, 1982) ou des trois premières couvées (Cowgill *et al.*, 1985; Cowgill, 1989). Il est recommandé d'utiliser des femelles âgées de deux à cinq semaines, afin d'obtenir une de leurs couvées «intermédiaires». Pour ce faire, il faut aménager des réservoirs d'élevage distincts à intervalles périodiques et y déposer des néonates ou des groupes de néonates d'âge connu; une fois que ces organismes ont atteint l'âge approprié de deux à cinq semaines, on peut les utiliser pour produire des néonates pour les essais (section 2.4.3).

Dans la plupart des cas, les récipients d'essai ne comportent pas de couvercle et sont ouverts. Si l'on pense que l'effluent ou autres échantillons peuvent contenir des substances volatiles et que l'on désire étudier l'effet qu'elles peuvent avoir sur la toxicité, un essai en parallèle pourrait être conduit dans des récipients fermés, en ne laissant qu'un vide d'air minime au-dessus de la solution d'essai. Lorsque l'on sait que l'effluent ou autres échantillons renferment des substances chimiques volatiles, on pourrait exiger que les essais soient conduits dans des récipients fermés.

Chaque récipient placé dans l'installation d'essai doit porter un code ou une étiquette précisant clairement la substance à expérimenter et sa concentration, ainsi que la date et l'heure du début de l'essai. Les récipients devraient être installés de façon à faciliter l'observation du comportement et de la mortalité des daphnies. De préférence, les solutions d'essai devraient être

placées selon un ordre aléatoire (Sprague, 1973).

Avant la mise en route de l'essai, la température, la teneur en oxygène dissous et le pH des solutions d'essai devraient être vérifiés et, si cela est nécessaire ou permis, corrigé pour s'établir à des niveaux admissibles. La conductivité de chaque solution d'essai devrait également être mesurée et consignée à ce moment. Les diverses possibilités qui s'offrent pour la correction du pH sont exposées à la section 4.3.2. Chaque solution d'essai devrait être bien mélangée, au moyen d'une baguette de verre, d'un agitateur en téflon ou d'un autre dispositif non réactif, avant l'introduction des organismes.

Il faut déposer, dans chaque solution d'essai et dans l'eau de contrôle, des nombres égaux de daphnies néonates, soit au moins dix dans chaque solution, sans dépasser la densité de chargement d'au plus un individu par 15 mL. L'ordre selon lequel on dépose les daphnies dans les récipients d'essai devrait être établi au hasard au préalable.

On devrait transférer les daphnies dans les récipients d'essai le plus rapidement possible, en ajoutant un minimum d'eau d'élevage et en imposant le moins possible de stress aux organismes (section 2.4.11). On devrait maintenir l'extrémité de la pipette sous la surface de la solution d'essai pendant qu'on libère les organismes¹. Il faudrait vérifier les néonates

¹ Le fait de maintenir l'extrémité de la pipette sous la surface permet de s'assurer que les néonates ne sont pas emprisonnées par la tension superficielle à l'interface entre l'air et l'eau et qu'aucune bulle d'air n'est emprisonnée sous leur carapace, ce qui les ferait flotter.

Même si cela est difficile à réaliser, il ne faut transférer qu'une quantité négligeable d'eau d'élevage dans les solutions d'essai au moyen de la pipette. Une technique utile consiste à prendre dans la pipette les daphnies, dans une petite quantité d'eau, et à les laisser nager à l'extérieur de la pipette pendant que son extrémité est maintenue dans l'eau d'essai. Si la dilution de la concentration d'essai par l'eau d'élevage présente une difficulté, la solution d'essai devrait, à l'origine, manquer d'un peu d'eau de dilution et

immédiatement au moment du transfert; celles qui flottent ou qui sont blessées devraient être remplacées. Il faut également éliminer tous les organismes qu'on échappe ou qui sont blessés pendant le transfert. Les pipettes servant au transfert devraient être nettoyées à fond entre les transferts si elles sont entrées en contact avec une solution d'essai; elles devraient au moins être rincées dans de l'eau de contrôle/de dilution.

4.3 Conditions de l'essai

L'essai doit être statique* (pas de renouvellement des solutions pendant l'essai) et durer 48 h.

La température d'essai devrait être de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

La densité de chargement des daphnies dans les solutions d'essai ne devrait pas dépasser un organisme par 15 mL.

Il ne faut pas nourrir les daphnies pendant l'essai.

Les solutions d'essai ne doivent pas être aérées.

L'essai n'est pas valable si plus de 10 % des daphnies dans l'eau de contrôle meurent ou laissent apparaître un comportement atypique ou stressé (p. ex., immobilité). Dans ce cas, il faudrait examiner l'état de santé apparent des organismes d'élevage en vérifiant leur rendement reproducteur (section 2.4.12), et chercher s'il y a des traces de chlore dans l'eau (lorsqu'on utilise de l'eau municipale déchlorée) ou s'il se pose des

aspects de l'élevage. La recherche devrait se poursuivre jusqu'à ce que la mortalité ou le comportement atypique des organismes témoins ait pratiquement disparu.

4.3.1 Oxygène dissous

Si la concentration en oxygène dissous dans un récipient d'essai devient inférieure à 40 % de la valeur de saturation en air ou à environ 5,5 mg/L, le stress créé par la faible teneur en oxygène pourrait interagir avec celui causé par les substances toxiques, les faisant paraître plus toxiques, qu'elles ne le sont^m. Dans certains cas, cela est acceptable comme partie intégrante de l'action d'un effluent ou d'un autre échantillon, mais le résultat obtenu pour un récipient d'essai ne saurait être valable si la concentration en oxygène dissous devient inférieure à 40 % de saturation en raison de méthodes d'essai inadéquates, par exemple une teneur en oxygène dissous insuffisante de l'eau de contrôle/de dilution au moment de la préparation des solutions d'essai. Lorsque les méthodes sont satisfaisantes (d'après les contrôles) et qu'il est souhaitable d'évaluer l'effet des substances toxiques sans l'action modificatrice de la faible teneur en oxygène, on devrait réaliser un essai à renouvellement périodique ou continuⁿ (section 5.4).

4.3.2 pH

Les essais de toxicité devraient normalement être effectués sans correction du pH. Il se peut que l'échantillon de produit chimique, d'eaux usées ou

* Dans des cas particuliers (p. ex., produits chimiques volatils ou instables en solution), il se peut qu'on doive recourir à des essais à renouvellement continu ou périodique, ou encore modifier la durée de l'essai.

problèmes concernant la nutrition ou d'autre

avoir un volume légèrement inférieur à son volume définitif. Après l'introduction des daphnies, une dernière addition d'eau de dilution permettrait d'atteindre le volume prévu jusqu'à un point de repère indiqué sur le récipient, ou on pourrait recourir à un moyen équivalent.

^m La teneur minimale recommandée de 40 % de saturation est plus élevée que les niveaux critiques qui ont pour effet de diminuer le taux de filtration des daphnies. Ce niveau d'oxygène dissous est jugé adéquat pour les essais portant sur ces organismes.

ⁿ Les essais à renouvellement continu font appel à des diluteurs proportionnels, à des pompes doseuses ou à d'autres appareils pour assurer un débit continu ou intermittent et fréquent de solution d'essai fraîche dans chaque récipient d'essai. La température et la teneur en oxygène dissous des solutions d'essai sont corrigées pour s'établir à des valeurs admissibles, immédiatement avant l'introduction des solutions dans l'appareil utilisé.

de milieu récepteur produise, pour une solution d'essai, un pH qui se situe en dehors de l'intervalle de 6,50 à 8,5, et que l'on cherche à évaluer des produits chimiques toxiques plutôt que les effets létaux ou modificateurs du pH; en pareil cas, on devrait corriger le pH des solutions d'essai ou de l'échantillon avant d'y déposer les daphnies, ou effectuer parallèlement un deuxième essai (avec correction du pH)^o. Pour ce deuxième essai, avant l'exposition des daphnies, le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai^k peut, selon les objectifs de l'essai, être neutralisé (corrigé à une valeur de 7,0) ou ramené à des valeurs correspondant, à 0,5 unité près, au pH de l'eau de contrôle/de dilution.

^o Si l'on ne corrige pas le pH de la solution ou de l'échantillon, c'est essentiellement parce qu'il peut exercer une forte influence sur la toxicité des produits chimiques ou des substances contenues dans les eaux usées. Pour les concentrations (généralement) faibles d'eaux usées qu'on trouve dans les milieux récepteurs après dilution, toute modification du pH naturel (et toute modification concomitante de la toxicité) devrait être acceptée comme partie intégrante de la pollution. C'est pourquoi on en arrive à la conclusion que le pH ne devrait pas être corrigé.

Certains produits chimiques et eaux usées entraînent cependant des niveaux létaux de pH dans les solutions d'essai à concentration élevée, particulièrement dans le cadre d'essais de surveillance ou de conformité portant sur des effluents non dilués. Il semble peu probable que l'expérimentateur cherche essentiellement à savoir si un pH extrême dans un effluent non dilué serait nocif pour les organismes, étant donné que ce pH ne serait pas représentatif des conditions qui prévaudraient après une dilution, même modérée, dans le milieu récepteur. Si le pH en soi présentait un intérêt prépondérant, un essai de toxicité ne serait sans doute pas nécessaire, puisque la létalité d'un pH extrême est bien établie et qu'on pourrait évaluer beaucoup plus économiquement les risques par une simple mesure chimique. L'expérimentateur cherche généralement à savoir si des substances toxiques sont présentes dans les eaux usées; pour ce faire, il faut éliminer tout masquage dû à une action létale du pH. Ce principe conduit à l'utilisation d'échantillons ou de solutions d'essai à pH corrigé lorsque cela est indiqué. Exactement de la même façon, on normalise la température et l'oxygène dissous dans les essais de toxicité même si les eaux usées elles-mêmes avaient une température de 90 °C ou une teneur en oxygène dissous faible (p. ex., moins de 2 mg/L), car ces deux conditions seraient elles-mêmes rapidement létales pour les organismes.

Selon une autre démarche admissible pour ce deuxième essai, on peut ramener le pH de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) à une valeur de 6,0 à 6,5 (si l'échantillon d'essai a ou produit un pH inférieur à 6,0) ou de 8,0 à 8,5 (si l'échantillon a ou produit un pH supérieur à 8,5)(Abernethy et Westlake, 1989). Une fois l'essai mis en route, on surveille (section 4.4), sans corriger, le pH de chaque solution.

Si l'essai de toxicité vise à mieux comprendre la nature des produits toxiques présent dans un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou de milieu récepteur, on utilise souvent la correction du pH parmi un certain nombre de techniques de traitement (p. ex., l'oxydation, la filtration, l'extraction à l'air et l'addition d'agents chélateurs) pour caractériser la toxicité de l'échantillon. Mount et Anderson-Carnahan (1988) comptent la correction du pH parmi neuf techniques d'«Évaluation d'identification de la toxicité» (EIT) qui, lorsqu'on les applique à des échantillons aqueux de toxicité aiguë, constituent des méthodes utiles permettant de déterminer la nature physique ou chimique des produits toxiques et leur sensibilité à la détoxification.

4.4 Observations et mesures

On devrait observer les daphnies dans chaque récipient d'essai au début et à la fin de l'essai, au minimum. D'autres observations peuvent être justifiées pendant la période initiale de 24 h, selon les effets constatés et l'objet de l'essai. Par exemple, les expérimentateurs qui veulent obtenir des renseignements sur l'évolution de la situation pendant l'essai pourraient ajouter des observations à 1, 4 et 24 h. Dans tous les cas, il faudrait effectuer des observations générales du comportement et de l'activité des daphnies immédiatement au début de l'essai, puisque les daphnies peuvent être temporairement engourdies ou immobilisées par le produit toxique. La durée de 48 h permet à toutes les daphnies de connaître une mue, au moment de laquelle elles sont le plus sensibles, sans

toutefois prolonger l'essai au point que l'inanition devienne un facteur important.

Il est plus facile d'observer les daphnies si l'on éclaire temporairement chaque récipient d'essai de côté ou en dessous, en le déposant sur un boîte d'éclairage ou en faisant appel à un autre moyen. Un fond noir est également avantageux; il peut être combiné à un éclairage favorable si l'un est placé sur le côté et l'autre en dessous.

Pour les solutions d'essai rendues opaques en raison de leur couleur ou de la présence de solides en suspension, les observations se limitent à celles qui sont faites à la fin de la période d'exposition (48 h). La solution d'essai devrait alors être versée dans des récipients peu profonds (p. ex., des boîtes de Pétri). S'il est toujours impossible de faire des observations, on peut verser doucement les solutions dans un tamis à mailles fines (p. ex., une épuisette pour aquarium à mailles de 0,1 m) et remettre en suspension le contenu dans de l'eau de contrôle/de dilution pour établir le nombre de daphnies survivantes et observer leur comportement. Les solutions de contrôle devraient faire l'objet d'un traitement identique.

Au moment de chaque observation, il faudrait enregistrer le nombre de daphnies mortes dans chaque récipient d'essai et enlever ces daphnies. La mort est caractérisée par l'immobilité du corps, des appendices et du coeur, observés grâce à un microscope à dissection ou à un autre appareil grossissant. Certains produits toxiques narcotiques peuvent rendre les daphnies complètement immobiles et ralentir leur rythme cardiaque pour qu'il soit de seulement un ou deux battements à la minute. Dans ce cas, le battement cardiaque devient le critère définitif de la mort. Si l'on ne peut examiner attentivement le coeur, on devrait établir une *CE50 d'inhibition de la mobilité après 48 h*, de préférence à une CL50. La CE50 et ses limites de confiance se calculent de la même façon que la CL50 (section 4.5), sauf en ce qui a trait au critère différent concernant l'effet sur les daphnies.

Les comportements inhabituels devraient être enregistrés pour chaque observation. Par exemple, on devrait consigner, pour chaque solution d'essai et à chaque période d'observation, les cas d'immobilité (daphnies incapables de nager pendant les 15 secondes qui suivent une agitation légère de la solution d'essai, même si leurs antennes peuvent toujours bouger), de léthargie, de flottaison, de rotation ou de tournoiement. Des comparaisons de comportement devraient être établies avec des organismes témoins.

Il faut mesurer la teneur en oxygène dissous, le pH et la température de chaque solution d'essai, y compris 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. De plus, on doit mesurer, avant l'exposition des daphnies, la dureté de l'eau de contrôle/de dilution et au moins de la solution d'essai de la concentration la plus élevée.

Compte tenu du faible volume des récipients d'essai, les mesures au début de l'essai peuvent être faites dans une solution d'essai «supplémentaire» préparée à cette fin. Si deux ou plusieurs récipients renferment une même concentration, on peut effectuer les mesures chimiques définitives dans un seul d'eux, ou combiner les fluides d'essai. L'oxygène dissous devrait être mesuré avant le mélange.

4.5 Résultats et calculs

On doit consigner les mortalités de daphnies dans chaque solution d'essai après 48 h d'exposition. Dans les essais à concentrations multiples, (section 4.1, 5, 6 et 7), il faut calculer la CL50 après 48 h et ses limites de confiance à 95 %, en indiquant la méthode utilisée pour ces calculs.

On peut utiliser différents programmes informatiques pour le calcul de la CL50 (ou de la CE50) et de ses limites de confiance. Stephan

(1977) a mis au point un programme qui fait appel à trois méthodes (des probits, de la moyenne mobile et binomiale) et l'a adapté aux ordinateurs personnels compatibles IBM. Ce programme en BASIC est recommandé; les personnes qui fournissent une disquette peuvent se le procurer auprès d'Environnement Canada (annexe A), avec la permission de C.E. Stephan. Hubert (1987) offre aussi un programme micro-informatique efficace pour l'analyse des probits, et on peut utiliser d'autres méthodes informatiques et manuelles satisfaisantes (APHA *et al.*, 1989; EPA, 1985a). Des programmes utilisant la méthode abrégée de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977) existent pour les ordinateurs personnels, mais ne sont pas recommandés ici, puisque les personnes qui ne connaissent pas les incidences de l'écrêtement des données dose-effet peuvent obtenir des résultats divergents.

Le programme de C.E. Stephan, que nous recommandons, fournit des estimations de la CL50 et des limites de confiance selon chacune des trois méthodes qu'il utilise, si l'ensemble des données comprend au moins deux cas où une partie des daphnies sont mortes. Pour les données uniformes ou régulières, les trois résultats seront dans doute analogues et les valeurs de l'analyse des probits devraient être privilégiées et consignées dans le procès-verbal de l'essai. L'estimation binomiale peut différer légèrement des autres. Si les résultats ne comprennent pas deux cas où une partie des daphnies sont mortes, les méthodes des probits et de la moyenne mobile ne fonctionnent pas et la méthode binomiale peut être utilisée pour dégager la meilleure estimation possible de la CL50 (ou de la CE50) avec des limites de confiance prudentes (étendues).

On devrait vérifier toute CL50 calculée par ordinateur en examinant, sur une échelle de probabilité logarithmique, la courbe des pourcentages de (ou des pourcentages d'immobilité, si la mort n'est pas déterminée) après 48 h pour les diverses concentrations

d'essai ^P, (figure 3) (APHA *et al.*, 1989).

^P La figure 3 repose sur des concentrations de 1,8, 3,2, 5,6, 10 et 18 mg/L, avec des mortalités de 0, 2, 4, 9 et 10 daphnies, à raison de 10 daphnies par concentration. La ligne ajustée à l'oeil a permis d'estimer la CL50 à 5,6 mg/L.

Les programmes informatiques ont permis d'obtenir des estimations très semblables à celle de la représentation graphique pour les données régulières de la figure 3. Les CL50 (et les limites de confiance à 95 %) se sont établies comme suit:

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)

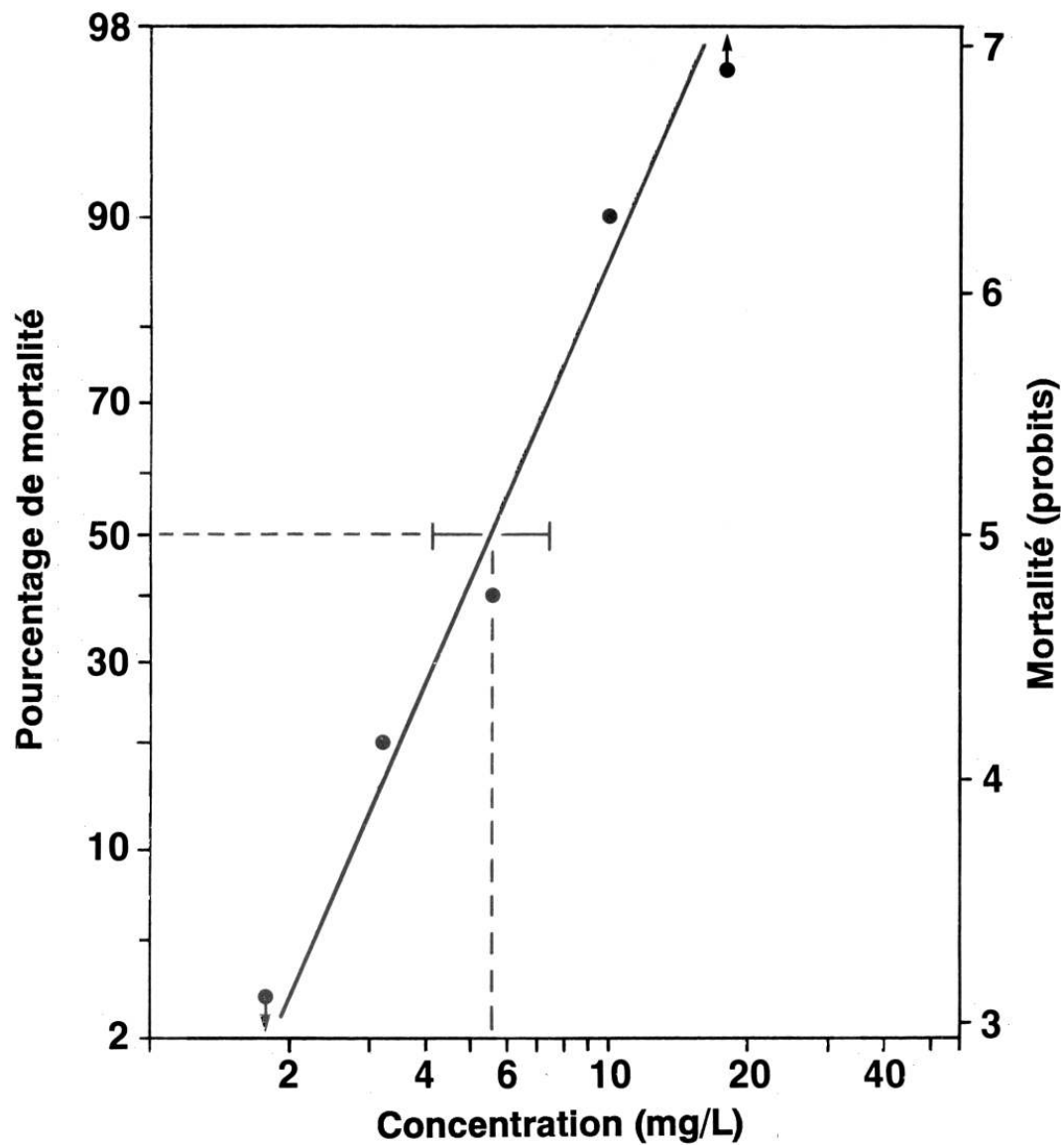
Méthode de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977) :

écrêtement 0 %	5,64 (4,38–7,26)
écrêtement 10 %	5,73 (4,34–7,58)
écrêtement 20 %	5,95 (4,34–9,80)

La méthode binomiale n'a pas permis d'estimer de limites de confiance, mais on a choisi deux concentrations d'essai comme limites d'un intervalle à l'intérieur duquel s'inscriraient les limites de confiance véritables.

En ajustant une ligne comme celle de la figure 3, on devrait attribuer relativement plus d'importance aux points qui sont proches de 50 % de mortalité. Si des concentrations successives produisent une série de 0 % de mortalité, cette valeur devrait être utilisée une seule fois pour ajuster la ligne (soit celle qui est la plus proche de la ligne médiane de distribution des données). De même, seule la première d'une série de valeurs successives de 100 % serait utilisée. Le même principe est valable pour les programmes informatiques : une seule valeur successive de 0 % ou 100 % doit être inscrite, car les autres valeurs peuvent entraîner la distorsion de l'estimation de la CL50. On peut se procurer du papier de probabilité logarithmique («log-probit», comme dans la figure 3) auprès des bonnes librairies à vocation technique.

Si l'on souhaite estimer le TL50, on peut tracer un graphique comme celui de la figure 3 en utilisant le logarithme du temps comme axe horizontal. On pourrait utiliser les temps létaux individuels des daphnies; cependant, ces temps sont rarement disponibles, puisque les daphnies ne font pas l'objet d'une surveillance continue. Le pourcentage cumulé de mortalité calculé à la suite d'inspections successives est tout à fait satisfaisant pour la représentation graphique; une ligne ajustée à l'oeil conduit à des estimations des limites de confiance suivant les étapes énumérées dans la méthode de Lichfield (1949).



Dans cet exemple hypothétique, dix daphnies ont été exposées à chacune de cinq concentrations. La ligne a été ajustée à l'oeil^P. On peut établir la concentration qu'on prévoit être létale pour 50 % des poissons en suivant la ligne pointillée à partir du niveau de 50 % jusqu'à son intersection avec la ligne ajustée, puis en passant à l'axe horizontal pour une estimation de la CL50 (5,6 mg/L).

Figure 3 Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique des mortalités (ou d'une concentration efficace 50 par la représentation des cas d'immobilité) sur papier de probabilité logarithmique

Tout écart important entre la CL50 (ou CE50) estimée au moyen de cette courbe et celle calculée par ordinateur doit être résolu.

Pour les essais à concentration unique, les résultats dépendent de l'objectif de l'essai. Il peut s'agir : a) du pourcentage de mortalité au terme de l'exposition des poissons à l'échantillon non dilué pendant 48 h; b) du pourcentage de mortalité à différents moments, pour la comparaison de la toxicité; ou c) du temps léthal de chaque poisson dans chaque solution.

Si des mesures successives sont effectuées (points b) ou c) ci-dessus), on peut estimer, si on le souhaite, le temps léthal 50 (TL50) en produisant un graphique semblable à la figure 3, à ceci près que l'axe horizontal est le logarithme du temps, au lieu de la concentration. On peut estimer et comparer les limites de confiance à 95 % en prolongeant d'une étape l'analyse graphique (Litchfield, 1949). Il faut tenir compte du fait que ni le TL50 ni le pourcentage de survie à de faibles durées d'exposition ne constituent des méthodes fiables permettant de juger de la toxicité ultime; par conséquent, les comparaisons reposant sur ces résultats ne donnent que des indications semi-quantitatives.

4.6 Produits toxiques de référence

L'utilisation courante de produits toxiques de référence est nécessaire pour qu'on puisse évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative des élevages de daphnies ainsi que la précision et la fiabilité des données obtenues en laboratoire (Environnement Canada, 1990). La sensibilité des daphnies aux produits toxiques de référence devrait être évaluée au moment de la préparation d'un nouveau lot de daphnies en vue d'une utilisation éventuelle, pendant l'essai de toxicité ou dans les 14 jours précédents ou suivants.

Voici les critères qu'on peut employer pour recommander les produits toxiques de référence convenant à cet essai :

- facilité d'obtention du produit à l'état pur;
- durée de conservation prolongée (stabilité);
- solubilité élevée dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- risque minimum pour l'utilisateur;
- facilité et précision de l'analyse;
- toxicité à une concentration relativement faible;
- courbe dose-effet satisfaisante pour l'organisme soumis à l'essai;
- incidence connue du pH sur la toxicité pour l'organisme soumis à l'essai;
- influence connue de la dureté de l'eau sur la toxicité pour l'organisme soumis à l'essai.

Pour cet essai, on recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence un ou plusieurs des composés suivants de qualité «réactif» : chlorure de sodium, sulfate de zinc ou bichromate de potassium. On devrait évaluer la sensibilité des daphnies grâce à des essais statiques visant à mesurer la CL50 après 48 h pour l'un ou plusieurs de ces produits, en utilisant l'eau de contrôle/de dilution employée couramment par le laboratoire*. Les conditions de l'essai (y compris la qualité de l'eau de dilution) et les méthodes employées devraient être aussi cohérentes que possible et conformes aux principes énoncés dans le présent document.

* On devrait utiliser de l'eau reconstitué si l'on souhaite atteindre un degré de normalisation supérieure, particulièrement lorsqu'on veut faire des comparaisons avec les résultats obtenus dans d'autres laboratoires. Des eaux normalisées sont recommandées à la section 4.1; si l'on obtenait assez de données en les utilisant, on pourrait élaborer des normes nationales quant aux limites admissibles pour les essais de produits toxiques de référence.

Un diagramme de contrôle devrait être établi et mis à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. Ce diagramme devrait rapporter la concentration logarithmique en coordonnée et la date 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 (± 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 (EPA, 1985a; Environnement Canada, 1990).

Le diagramme de contrôle peut être établi en reportant simplement la moyenne et ± 2 fois l'écart type comme logarithmes, ou si l'on préfère, en les convertissant en valeurs arithmétiques et en reportant la CL50 et ± 2 fois l'écart type sur une échelle logarithmique de concentration.

Si une CL50 s'inscrit en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des organismes et le système d'essai sont douteux. Dans la mesure où cela peut se produire 5 % du temps du fait du hasard seulement, une CL50 qui s'inscrit en dehors de ces limites ne signifie pas nécessairement qu'il faut mettre en question la sensibilité de la population de daphnies ou la précision des données de toxicité produites par le laboratoire; il s'agit plutôt d'un avertissement que cela peut être le cas. On doit alors vérifier attentivement l'état de santé de l'élevage (section 2.4.12) ainsi que toutes les conditions d'élevage et d'essai. Selon les constatations faites, il peut s'avérer nécessaire d'entreprendre l'acclimatation d'une nouvelle population de daphnies puis de la soumettre à une évaluation (avec un ou des produits toxiques de référence) avant de l'utiliser dans les essais de toxicité.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.*, 1989). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CL50 serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on devrait les tenir à l'obscurité, à une température de $4 \pm 2^\circ \text{C}$. Les solutions de zinc devraient être préservées avant d'être stockées (APHA *et al.*, 1989). Les aliquotes stockées nécessitant une mesure chimique devraient être analysées sans délai aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la CL50 devrait être fondé sur les concentrations moyennes mesurées, si elles diffèrent appréciablement (c.-à-d. de plus de 20 %) des concentrations nominales et si les analyses chimiques sont exactes et fiables.

Les concentrations de chlorure de sodium devraient être exprimées en poids du sel total (NaCl) dans l'eau (g/L). Cette valeur diffère légèrement de la mesure normale de la salinité en g/kg ou en parties par millier. On devrait utiliser du sulfate de zinc (généralement de formule $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et d'une masse moléculaire égale à 4,3982 fois celle du zinc) pour la préparation des solutions mères de zinc. Ces solutions devraient être acides (pH de 3 à 4), et on peut les conserver dans l'obscurité à $4 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant plusieurs semaines jusqu'au moment de l'utilisation. La concentration de zinc devrait être exprimée en $\text{mg Zn}^{++}/\text{L}$. Les solutions mères de bichromate de potassium devraient être conservées à l'obscurité dans des bouteilles à bouchon de verre, et leur concentration devrait s'exprimer en $\text{mg Cr}^{+++}/\text{L}$. La masse moléculaire du K_2CrO_7 est égale à 2,8290 fois celle du chrome.

4.7 Considérations juridiques

Les prescriptions complètes et détaillées établies pour les essais de létalité aiguë réalisés à des fins juridiques débordent le cadre du présent document. On doit absolument prendre soin de veiller à ce que les échantillons soumis à des essais soient recevables en preuve en cas d'action en justice devant un tribunal. Pour cela, les échantillons doivent : être représentatifs de la substance échantillonnée; ne pas être contaminés

par des substances étrangères; avoir des coordonnées précises (date, heure et lieu d'origine); être consignés clairement pour assurer la continuité de la preuve; et être analysés le plus tôt possible après leur prélèvement. Les personnes responsables de l'exécution de l'essai et de l'établissement du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve en cas d'action en justice (McCaffrey, 1979) ainsi que l'intégrité des résultats des essais.

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai de produits chimiques, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

5.1 Propriétés, étiquetage, transport et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à expérimenter, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche signalétique sur les marchandises dangereuses concernant ce produit, s'il en existe une. Quand la solubilité dans l'eau d'un produit chimique soulève des doutes ou des difficultés, les méthodes admissibles utilisées antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses de ce produit devraient être recueillies et consignées. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurale, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, ainsi que la présence et les quantités d'additifs^q.

Dès réception des produits chimiques, les contenants doivent être fermés hermétiquement et codé ou étiquetés (p. ex., nom du produit chimique, fournisseur et date de réception). Les conditions de stockage (p. ex., température et protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit chimique. Les modes

opératoires normalisés pour la manipulation et le stockage des produits chimiques devraient être respectés.

5.2 Préparation des solutions d'essai

Dans le cas des produits chimiques, on exécute généralement un essai à concentrations multiples afin d'établir la CL50. Il peut s'avérer souhaitable de prévoir des répétitions (deux ou trois) pour chaque concentration d'essai, lorsqu'ils s'agit d'évaluer de nouveaux produits chimiques. Des répétitions peuvent s'avérer nécessaires en vertu des règlements sur l'enregistrement des pesticides et des catégories analogues de produits chimiques. Si le produit à expérimenter est volatil, il faudrait fermer les récipients d'essai et laisser le moins possible de vide d'air au-dessus des solutions.

Les récipients d'essai doivent être en verre^h. On peut préparer les solutions en ajoutant des quantités prépesées (à l'aide d'une balance de précision) du produit chimique dans chaque réservoir d'essai, de façon à obtenir les teneurs nominales à expérimenter^r, ou en ajoutant des volumes mesurés d'une solution mère. On devrait préparer les solutions mères en dissolvant le produit chimique à expérimenter dans de l'eau de contrôle/de dilution. Pour les produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.*, 1988) ou, comme second choix, par dispersion ultrasonique. Cette dernière technique n'est pas

^q La connaissance des propriétés du produit chimique aide à déterminer les précautions et exigences particulières requises pour sa manipulation et pour les essais (p. ex., essais dans une installation bien aérée, nécessité d'utiliser un solvant). L'information concernant la solubilité et la stabilité chimique en eau douce est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

^r Cette démarche n'est normalement utilisée que pour préparer des concentrations élevées ou des volumes importants de solutions d'essai. Dans les autres cas, on peut obtenir une plus grande exactitude en préparant une solution mère.

nécessairement sans inconvénient; en effet, les ultrasons peuvent disperser une partie du produit chimique sous forme d'émulsion ou de fines gouttelettes, qui peuvent être absorbées sélectivement par les daphnies au cours de leurs activités de filtration. En outre, cette technique peut donner lieu à des variations de la disponibilité du produit chimique (et, par conséquent, de sa toxicité), en raison de la production de gouttelettes non uniformes et de tailles différentes. Les gouttelettes peuvent aussi remonter vers la surface au cours de l'essai.

On ne devrait pas utiliser de solvants organiques, d'émulsifiants ou de dispersants pour accroître la solubilité du produit chimique, sauf dans les cas où ces substances pourraient être formulées avec le produit en cause dans son utilisation commerciale normale. Les cas échéant, on devrait préparer une solution de contrôle supplémentaire renfermant la même concentration d'agent solubilisant que la solution la plus concentrée du produit chimique à expérimenter. Ces agents devraient être utilisés parcimonieusement, leur concentration ne devant pas dépasser 0,5 mL/L dans toute solution d'essai (EPA, 1985b). Si l'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants (EPA, 1985b) : le diméthylformamide, le triéthylèneglycol, le méthanol, l'acétone et l'éthanol.

5.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour l'évaluation normale, au laboratoire, de la toxicité d'un produit chimique, l'eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau reconstituée, de l'eau du laboratoire (eau souterraine ou de surface non contaminée ou eau municipale déchlorée). Si l'on doit évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, on pourrait prélever des échantillons de ce milieu, à l'abri de l'influence du produit, et les utiliser comme eau

de contrôle/de dilution ^{s, t}. Par exemple, il peut s'agir d'évaluer l'effet toxique sur une nappe d'eau particulière de déversements ou d'applications intentionnelles de produit chimiques (p. ex., vaporisation d'un pesticide). Le choix de l'eau de contrôle/de dilution dépend de l'objet de l'essai.

Si un degré élevé de normalisation est nécessaire (p. ex., s'il faut calculer la toxicité d'un produit chimique dans plusieurs installations d'essai et comparer les valeurs obtenues), il faudrait utiliser de l'eau reconstituée d'une dureté particulière pour toutes les dilutions et comme eau de contrôle^u. Il est recommandé d'utiliser une eau d'une dureté se situant entre 40 et 48 mg/L pour *Daphnia pulex* et entre 80 et 100 mg/L pour *D. magna* (section 2.4.9), ce qui est le plus conforme possible à ce qui se fait ailleurs (annexe B). Lorsqu'on pense que la dureté ou d'autres caractéristiques de l'eau de dilution peuvent influencer sur la toxicité du produit chimique à expérimenter, on peut mener deux essais ou plus avec différentes eaux reconstituées.

^s Les contaminants qui se trouvent déjà dans le milieu récepteur peuvent ajouter leur toxicité à celle du produit chimique ou de l'eau usée à expérimenter. Dans ce cas, de l'eau de contrôle/de dilution non contaminée (naturelle ou reconstituée) donnerait une estimation plus exacte de la toxicité du produit déversé ou appliqué, mais pas nécessairement de son impact total sur le site visé.

^t Une solution de rechange (compromis) quant à l'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution consiste à corriger le pH et la dureté de l'eau du laboratoire (ou d'une eau reconstituée) pour qu'ils correspondent à ceux du milieu récepteur. Selon la situation, la correction peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées dans le milieu récepteur à un moment particulier.

^u Comme la dureté, le pH et d'autres caractéristiques de l'eau de dilution peuvent influencer beaucoup sur la toxicité de la surface à expérimenter, l'emploi d'une eau reconstituée normalisée permet d'obtenir des résultats véritablement comparables à ceux d'autres laboratoires.

5.4 Observations et mesures

Pendant la préparation des solutions et à chacune des périodes d'observation prescrites, on devrait examiner chaque solution d'essai afin d'observer la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex., couleur et opacité de la solution, précipitation ou floculation du produit chimique). Toute observation devrait être consignée.

Il est souhaitable d'analyser les solutions d'essai afin de déterminer les concentrations de produits chimiques auxquelles les daphnies sont exposées^v. Pour le faire, on devrait prélever des échantillons dans les solutions d'essai à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle, au début et à la fin de l'essai au minimum. Ces échantillons devraient être conservés, stockés et analysés au moyen des meilleures méthodes éprouvées permettant d'établir la concentration du produit chimique visé en solution aqueuse.

Si le dosage du produit chimique indique que les concentrations ont fléchi de plus de 20 % pendant l'essai, la toxicité létale aiguë du produit chimique devrait être réévaluée au cours d'un

essai à renouvellement périodique (APHA *et al.*, 1989) ou continu (EPA, 1982 et 1995b). Dans tous les essais au cours desquels on mesure les concentrations, la toxicité devrait être calculée et exprimée en fonction des concentrations mesurées, sauf s'il y a de bons motifs de croire que les mesures chimiques ne sont pas exactes. Aux fins de ces calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la moyenne géométrique des concentrations mesurées auxquelles les organismes ont été exposés.

5.5 Résultats et calculs

Le résultat des essais de produits chimiques est généralement une CL50 après 48 h. Les méthodes admises pour le calcul de la CL50 et de son intervalle de confiance à 95 % sont énoncées à la section 4.5.

L'essai n'est pas valable si la mortalité dans la solution de contrôle contenant un solvant (ou dans l'eau de contrôle non traitée) est supérieure à 10 %, ou si plus de 10 % des daphnies dans l'une ou l'autre solution ont un comportement atypique ou stressé (p. ex., immobilité).

^v Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites de l'analyse, 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 recommandables si (EPA, 1985b) : les solutions d'essai sont aérées; la substance à expérimenter est volatile, insoluble ou se précipite; on sait que cette substance est absorbée par les matériaux dont les réservoirs d'essai sont construits; ou on fait appel à un système à renouvellement continu. Certains cas (p. ex., l'essai de pesticides en vue de leur enregistrement) peuvent nécessiter la mesure des concentrations du produit chimique dans les solutions d'essai.

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons, d'effluents, d'élutriats et de lixiviats

La présente section énonce des instructions particulières pour l'essai d'échantillons, d'effluents, d'élutriats et de lixiviats; ces instructions viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

6.1 *Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

Les contenants utilisés pour le transport et le stockage des échantillons d'effluents, de lixiviats et d'élutriats doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, polyéthylène ou polypropylène). Ils doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et rincés avec de l'eau non contaminée, et ils devraient également être rincés avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir afin de réduire les vides d'air.

Aussitôt l'échantillon recueilli, chaque contenant doit être rempli, fermé hermétiquement et étiqueté ou codé. L'étiquette devrait porter au moins le type d'échantillon, la source, la date et l'heure du prélèvement, ainsi que le nom des préposés à l'échantillonnage. Les contenants non étiquetés ou non codés livrés au laboratoire ne devraient pas être retenus pour des essais. En général, les échantillons livrés dans des contenants remplis en partie ne devraient pas non plus faire l'objet d'essais, puisque les produits toxiques volatils s'évaporent dans le vide d'air. Cependant, si l'on sait que la volatilité ne pose pas de problème, ces échantillons pourraient faire l'objet d'essais, à la discrétion de l'expérimentateur.

L'essai des échantillons d'effluents et de lixiviats devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Il devrait débuter dans les trois jours et doit être entrepris au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements. Les échantillons

recueillis pour extraction et essai de l'élutriat devraient subir l'essai dans les dix jours suivant leur réception. Les élutriats devraient faire l'objet d'un essai dans les trois jours suivant la préparation de l'échantillon ou selon les instructions fournies.

Il est souhaitable de ranger au froid les échantillons d'effluents et de lixiviats aussitôt recueillis et pendant le transport. Lorsque cela est peu pratique (p. ex., s'il faut expédier de forts volumes d'échantillons), on peut les conserver à la température ambiante pendant le transport. Cependant, quand cette température est extrême (c.-à-d. supérieure à 30° C ou inférieure à 1° C) ou quand on prévoit des délais de transport supérieurs à deux jours, la température des échantillons devrait être contrôlée (de 1 à 8° C) en cours de transport.

Les échantillons d'effluents et de lixiviats ne devraient pas geler pendant le transport. À l'arrivée au laboratoire, ils peuvent être ramenés immédiatement ou pendant la nuit à 20 ± 2° C et les essais peuvent être entrepris. Si un stockage plus long s'avère nécessaire, les contenants devraient être entreposés dans l'obscurité entre 1 et 8° C et, de préférence, à 4 ± 2° C.

Sauf précision contraire, les conditions de température pendant le transport et le stockage des élutriats, ainsi que des échantillons destinés à l'extraction aqueuse et à l'essai ultérieur de l'élutriat, devraient être conformes aux indications ci-dessus.

6.2 *Préparation des solutions d'essai*

Les contenants d'échantillons doivent être agités vigoureusement juste avant d'être vidés, afin d'assurer la resuspension des solides décantables.

Les sous-échantillons (c.-à-d. les échantillons répartis dans deux ou plusieurs contenants) doivent être mélangés ensemble, afin d'assurer leur homogénéité. S'il est nécessaire de stocker à nouveau les échantillons, l'échantillon composite (ou une partie de cet échantillon) devrait être retourné dans les contenants de sous-échantillons et stocké (section 6.1) jusqu'au moment de l'utilisation.

Au besoin, on peut ajuster la température des échantillons ou des solutions d'essai à la température précisée pour l'essai. Pour chauffer les échantillons ou les solutions d'essai, utiliser un bain-marie. **Ne pas utiliser** de thermoplongeur étant donné que cela peut altérer les constituants chimiques et modifier la toxicité. Pour le refroidissement, utiliser un bain d'eau glacée ou un refroidisseur à immersion fait d'un matériau non toxique (p. ex., acier inoxydable). Chaque essai, que ce soit avec des concentrations multiples ou une concentration unique, doit comprendre une ou plusieurs solutions de contrôle.

6.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les essais de surveillance et de conformité réalisés sur des échantillons d'effluents ou de lixiviats, on devrait utiliser comme eau de contrôle/de dilution l'eau naturelle ou reconstituée dans laquelle les daphnies ont été élevées, ou un échantillon de milieu récepteur^{s,t}. Étant donné que les résultats pourraient s'avérer très différents pour les deux sources d'eau, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce choix. Il faudrait également tenir compte des difficultés et des coûts de transport, puisque l'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution augmente considérablement le volume de liquide à transporter.

L'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution peut être souhaitable dans certains cas, lorsqu'il faut recueillir des renseignements propres au site visé en ce qui

concerne l'effet toxique potentiel d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un éluviat sur un milieu récepteur particulier^{s,t}. Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1.

Si un échantillon de milieu récepteur prélevé en amont doit être utilisé comme eau de contrôle/de dilution, une solution de contrôle distincte devrait être préparée à partir de l'eau du laboratoire à laquelle les daphnies ont été élevées pendant deux ou plusieurs semaines. La survie, l'aspect et le comportement des daphnies (section 4.4) dans l'eau de contrôle du laboratoire devraient être comparés à ceux des poissons dans l'échantillon de milieu récepteur^w.

Les essais nécessitant un degré supérieur de normalisation peuvent faire appel à de l'eau reconstituée d'une dureté particulière (tableau 2) comme eau de contrôle/de dilution^u. Cette eau peut convenir lorsqu'il faut évaluer la toxicité d'un échantillon ou d'une série d'échantillons en comparant les résultats obtenus à un certain nombre de laboratoires ou à un même laboratoire où la qualité de l'eau est variable. L'utilisation d'eau reconstituée permet alors de minimiser toute influence modificatrice attribuable à des différences dans la chimie de l'eau de dilution.

6.4 Observations et mesure

La couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (c.-à-d. la présence de matières flottantes ou de solides de l'échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'éluviat) devraient être observées au moment de la préparation des solutions d'essai. La précipitation, la floculation, le changement de

^w La comparaison du comportement (p. ex., mobilité, rotation et flottaison) et de la survie des daphnies placées dans l'eau de contrôle et de celles placées dans l'échantillon de milieu récepteur prélevé en amont permet de distinguer les effets toxiques manifestes qui pourraient être attribuables à la présence de contaminants dans l'eau d'amont.

couleur, le rejet de matières volatiles 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., le moussage, la décantation, la floculation, l'augmentation ou la diminution de la turbidité et les variations de couleur).

Lorsque les échantillons d'effluent ont une teneur en solides appréciable, il est souhaitable de mesurer leur teneur totale en solides en suspension et décantables (APHA *et al.*, 1989) dès leur réception; ces éléments, qui font partie de la description générale de l'effluent, peuvent influencer sur les résultats de l'essai de toxicité.

6.5 Résultats et calculs

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une ou plusieurs parties non diluées de l'échantillon et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Selon les exigences réglementaires précisées, les essais de conformité peuvent faire appel à une seule concentration (100 % d'eaux usées, sauf indication contraire) ou déterminer la CL50 après 48 h (section 4.5).

Les essais réalisés pour la surveillance de la toxicité des effluents, des lixiviats ou des éluvats peuvent viser à mesurer le pourcentage

de mortalité des organismes après 48 h dans une seule concentration, à établir le TL50 de l'échantillon, dilué ou non, ou encore à mesurer la CL50 après 48 h. Le résultat dépend d'un certain nombre de considérations, notamment les objectifs du programme de surveillance, les exigences de conformité, le coût des essais et les antécédents en matière de survie de daphnies dans des eaux usées non diluées.

Les essais de toxicité réalisés à d'autres fins (p. ex., détermination de sources de toxicité à l'intérieur d'une usine, de l'efficacité d'un traitement ou des effets de modifications d'un procédé sur la toxicité) peuvent, selon les objectifs de l'étude, porter sur une seule concentration (100 % ou une dilution appropriée, ainsi qu'un contrôle) ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence d'une toxicité létale aiguë ou d'évaluer un nombre important d'échantillons afin d'établir leur toxicité relative. Les résultats de ces essais dépendent toujours des objectifs de l'étude; il peut s'agir de cotes arbitraires de réussite ou d'échec, d'un pourcentage de mortalité de daphnies après 48 h ou dans un délai plus rapproché (p. ex., 24 h), ou du temps léthal de chaque daphnie dans chaque solution. Les éléments exposés à la section 4.5 sont pertinents dans ce cas.

Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs

Le lecteur trouvera ci-après des instructions pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs, qui viennent s'ajouter aux méthodes exposées dans la section 4.

7.1 *Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

Les méthodes d'étiquetage, de transport et de stockage des échantillons devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1. Les essais devraient être mis en route le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons; ils devraient débuter dans les trois jours et doivent être entrepris au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements.

7.2 *Préparation des solutions d'essai*

Les contenants devraient être agités avant d'être vidés, afin d'assurer l'homogénéité des échantillons. Les sous-échantillons devraient être composés comme le prévoit la section 6.2.

7.3 *Eau de contrôle/de dilution*

Pour les échantillons de milieux récepteurs recueillis dans le 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 pourrait prélever simultanément de l'eau d'amont et l'utiliser comme eau de contrôle/de dilution pour les échantillons d'aval^{s, t}. Cette eau devrait être prélevée le plus près possible des sources de contamination en cause, mais en amont ou à l'extérieur de leur zone d'influence.

Si l'on utilise de l'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution, on devrait préparer une

solution de contrôle distincte à partir de l'eau du laboratoire à laquelle les daphnies ont été acclimatées pendant deux ou plusieurs semaines. La survie et le comportement des daphnies (section 4.4) dans l'eau de contrôle du laboratoire devraient être comparés à ceux des daphnies détenues dans des conditions analogues dans l'eau de contrôle d'amont^w. Si ces dernières montrent des signes d'épuisement ou de mortalité et si l'on prépare des dilutions de l'eau d'aval pour les essais (parce que l'on s'attend à ce qu'elle soit toxique), on devrait préparer à ce moment un ensemble distinct de dilutions au moyen de l'eau du laboratoire dans laquelle les daphnies ont été élevées. Les expérimentateurs prévoyant cette éventualité devraient recueillir des volumes suffisants d'échantillons pour permettre de préparer ces dilutions supplémentaires.

Des contraintes logistiques, les effets toxiques prévus ou d'autres détails pratiques propres à l'emplacement peuvent empêcher l'utilisation de l'eau d'amont comme eau de contrôle/de dilution. En pareil cas, l'eau du laboratoire utilisée pour l'élevage des daphnies devrait servir à cette fin. On pourrait corriger certaines de ses caractéristiques afin de simuler en partie l'eau d'amont^t.

7.4 *Observations et mesures*

La couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et les autres caractéristiques de l'échantillon et des solutions devraient être observés conformément aux dispositions de la section 6.4, aussi bien pendant la préparation des solutions d'essai que par la suite, pendant les essais eux-mêmes. Ces observations viennent s'ajouter aux observations de base sur les organismes prévues à la section 4.4.

7.5 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux options et aux démarches prévues dans les sections 4.5 et 6.5.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une ou plusieurs parties non diluées d'un échantillon et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Les résultats des essais d'échantillons de milieux récepteurs peuvent être limités à l'établissement d'un pourcentage de mortalité des daphnies après 48 h dans l'échantillon non dilué,

ainsi qu'aux données sur le temps léthal, le cas échéant. Lorsque les échantillons de milieux récepteurs sont probablement toxiques et que l'on souhaite obtenir des renseignements sur le degré de dilution nécessaire pour permettre la survie à court terme des daphnies, on devrait effectuer un essai permettant d'établir la CL50 après 48 h. Une ou plusieurs concentrations non diluées (échantillon à 100 %) et au moins quatre dilutions devraient faire l'objet de cet essai, ainsi qu'une ou de plusieurs solutions de contrôle. En supposant que les données le permettent, la CL50 et ses limites de confiance à 95 % devraient être calculées.

Section 8

Procès-verbal de l'essai

Le procès-verbal de l'essai devrait décrire les matériaux et les méthodes utilisés, ainsi que les résultats de l'essai. À partir de ce document, le lecteur devrait être en mesure de savoir si, compte tenu des conditions et des méthodes utilisées, les résultats sont admissibles pour l'utilisation prévue.

Les méthodes et conditions communes à une série continue d'essais (p. ex., essais de toxicité courants à des fins de surveillance ou de conformité) et conformes aux dispositions du présent document peuvent faire l'objet d'un renvoi à un procès-verbal général définissant le mode opératoire normalisé. Les sections 8.1 à 8.7 inclusivement énumèrent diverses exigences (identifiées dans le présent rapport par des boulets) à consigner dans les procès-verbaux. Les renseignements particuliers à un essai doivent être inclus dans le procès-verbal propre à l'essai. Les renseignements méthodologiques inhérents aux pratiques de laboratoire normalisées utilisées lors de l'application de cette méthode d'essai biologique peuvent figurer dans le procès-verbal général.

Chaque rapport particulier à un essai doit indiquer tout non respect des exigences précisées aux sections 2 à 7 de la présente méthode d'essai biologique et, le cas échéant, en préciser les détails. Des programmes de surveillance particuliers ou des protocoles relatifs aux essais (p. ex., le mode opératoire et les résultats des essais exigeant une correction du pH et (ou) de la dureté) pourraient exiger la mention de certains éléments dans le procès-verbal propre à l'essai ou encore demander à ce que certains renseignements méthodologiques portent la mention «Données à garder en dossier». Les détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés au procès-verbal

devraient être versés aux dossiers du laboratoire d'essai, de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

8.1 Substance à expérimenter

- Type, source et description de l'échantillon (produit chimique, effluent, éluatriat, lixiviat ou milieu récepteur; lieu et méthode de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).
- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.
- Détails sur le modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant, et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).
- Identité des personnes ayant prélevé au fourni l'échantillon.
- Date et heure du prélèvement de l'échantillon, de sa réception à l'installation d'essai et du début de l'essai définitif.

8.2 Organismes soumis à l'essai

- Espèce et source.
- Descriptions des conditions et des méthodes d'élevage ; installations, éclairage, source et qualité de l'eau, prétraitement de l'eau, conditions et appareils d'aération, méthodes d'élevage (y compris la fréquence et le mode d'échange de l'eau), méthodes de

manipulation des organismes, température pendant l'élevage, type de nourriture, ration et fréquence d'alimentation.

- Pourcentage estimatif de mortalité dans l'élevage pendant les sept jours précédant l'essai.
- Données sur l'âge de daphnies au moment de leur première couvée et sur le nombre moyen de néonates par couvée.
- Mode opératoire et méthodes employées pour obtenir des néonates des génitrices.
- Âge des organismes au début de l'essai.

8.3 Installations et appareils

- Nom et adresse du laboratoire d'essai.
- Nom des personnes ayant effectué l'essai.
- Description des systèmes de réglage de l'éclairage et de la température dans l'installation d'essai.
- Description des récipients d'essai (taille, forme et type de matériau).

8.4 Eau de contrôle/de dilution

- Type et source(s) de l'eau utilisées comme eau de contrôle/de dilution.
- Type et quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau de contrôle/de dilution.
- Détails sur l'échantillonnage et le stockage, si l'eau de contrôle/de dilution provient du milieu récepteur en amont.
- Prétraitement de l'eau (correction de la température, de la dureté ou du pH, dégazage, débit et durée d'aération, etc.)

- Variables de la qualité de l'eau mesurées avant l'essai et au début de l'essai.

8.5 Méthode d'essai

- Brève mention de la méthode utilisée, s'il s'agit d'une méthode normalisée (p. ex., conforme au présent document).
- Conception et description de la méthode, si elle spécialisée (p. ex., renouvellement périodique ou continu des solutions d'essai), ou des modifications apportées à la méthodes normalisée.
- Méthode utilisée pour la préparation des solution mères et des solutions d'essai de produits chimiques.
- Résultats de toute analyse chimique des solutions d'essai et mention des méthodes analytiques utilisées.
- Utilisation d'un essai préalable ou de détermination de l'ordre de grandeur.
- Fréquence et nature des observations effectuées pendant l'essai.

8.6 Conditions de l'essai

- Nombre, concentration, volume et profondeur des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle.
- Nombre d'organismes par solution d'essai et par volume de 10 mL.
- Photopériode, source lumineuse et éclairage à la surface des solutions d'essai.
- Renseignements sur l'aération des échantillons ou des solutions d'essai (débit, durée et mode d'application) avant l'exposition des daphnies.

- Description de toute correction du pH ou de la dureté des solutions d'essai, y compris la méthode employée et le moment de la correction.
- Résultats de toute mesure chimique des solutions d'essai (p. ex., concentration du produit chimique et teneur en solides en suspension).
- Température, pH, oxygène dissous (mg/L et pourcentage de saturation) et conductivité, d'après les mesures et les observations faites dans chaque solution d'essai.
- Conditions et méthodes de mesure de la CL50 après 48 h ou des produits toxiques de référence.
- Comportement des daphnies, et nombre et pourcentage des daphnies mortes ou immobiles dans chaque solution d'essai (y compris la solution de contrôle), selon les données consignées au cours de chaque période d'observation. Nombre et pourcentage des organismes témoins ayant un comportement atypique ou stressé.
- Résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (s'il y en a eu un).
- Toute valeur CL50 ou TL50 après 48 h (y compris les limites de confiance à 95 %) ayant été établie, y compris une mention de la méthode statistique utilisée pour les calculs.
- CL50 après 48 h et limites de confiance à 95 % établies pour le ou les produits toxiques de référence, à 14 jours ou moins de l'essai, au moyen de l'élevage dont proviennent les daphnies utilisées pour l'essai; valeur moyenne (± 2 fois l'écart type) obtenue pour le ou les mêmes produits à l'installation d'essai au cours d'essais antérieurs.

8.7 Résultats de l'essai

- Aspect des solutions d'essai et modifications constatées pendant l'essai.

Références

- Abernethy, S.G. et G.F. Westlake. «Guidelines for pH adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing». Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, septembre 1989. 11 p.
- AFNOR (Association française de normalisation). «Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*», forme française homologuée, NF 90301. *Recueil des normes françaises des essais toxicologiques et écotoxicologiques des produits chimiques*, 1^{re} éd. Paris, AFNOR, 1984, p. 375-385.
- APHA (American Public Health Association) et al., «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17^e éd., American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, DC, Part 8000, p. 8-1-8-143 (1989).
- Armstrong, F.A.J. et D.P. Scott. «Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, vol. 31, 1974, p. 1881-1885.
- ASTM. (American Society for Testing and Materials) «Standard Guide for the Use of Lighting in Laboratory Testing». E 1733-95, sous presse pour publication dans le *Annual Book of ASTM Standards*, Committee E-47, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1995).
- ASTM. (American Society for Testing and Materials) «Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests on Wastewaters with *Daphnia*». *Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.01, 1984, p. 27-39 (Designation D 4229).
- ASTM (American Society for Testing and Materials). «Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians», *Report E729-80*. Philadelphie, PA, ASTM, 1980. 25 p.
- BHSC (British Health and Safety Commission). «Testing for Acute Toxicity to *Daphnia*», *Methods for the Determination of Ecotoxicity*, Londres, BHSC. 1982. p. 14-18.
- 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». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1988, p. 117-128.
- BNQ (Bureau de normalisation du Québec). «Eaux - Détermination de la toxicité. Méthode avec le microcrustacé *Daphnia magna*». Québec, BNQ, ministère de l'Industrie et du Commerce, 1990.
- Bouck, G.R. «Gasometer: An Inexpensive Device for Continuous monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation». *Transactions of the American Fisheries Society*, vol. 111, 1982, p. 505-516.
- Buikema, A.L. Jr. «Some Effects of Light on the Growth, Molting, Reproduction and Survival of the Cladoceran, *Daphnia pulex*». *Hydrobiologia*, vol. 41, 1973, p. 391-418.
- Buikema, A.L. Jr., J.G. Geiger et D.R. Lee. «*Daphnia* Toxicity Tests». *Aquatic Invertebrate Bioassays*. A.L. Buikema Jr. et J. Cairns (éd.). Philadelphie, ASTM, 1980.

- CCMRE (Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement). «Recommandations pour la qualité des eaux au Canada». Ottawa, Environnement Canada, mars 1987.
- Colombie-Britannique. «Daphnia 48-h Acute Mortality Bioassay Procedure», version préliminaire. Vancouver, ministère de l'Environnement et des Parcs, Laboratoire environnemental, 1988.
- Cowgill, U.M. «Nutritional Considerations in Toxicity Testing: Invertebrate Nutrition (*Daphnia*, *Ceriodaphnia*)». Nutritional Considerations in Toxicity Testing. R.P. Lanno (éd.) Compte rendu du cours agréé offert à la 10e assemblée annuelle de la *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Toronto, 29 Octobre 1989.
- Cowgill, U.M., D.L. Hopkins, S.L. Applegath, I.T. Takahashi, S.D. Brooks et D.P. Milazzo. «Brood Size and Neonate Weight of *Daphnia magna* Produced by the Nine Diets». *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eight Symposium*. ASTM STP 891. R.C. Bahner et D.J. Hansen (éd.). Philadelphie, ASTM, 1985, p. 233-244.
- Environnement Canada, Conservation and Protection, *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. Ottawa, 1990.
- EPA (*Environmental Protection Agency*). «Daphnid Acute Toxicity Test» Document EG-1/ES-1. Washington, EPA, Office of Toxic Substances, 1982.
- EPA (*Environmental Protection Agency*). «Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms», EPA/600/4-85-013. W.H. Peltier and C.I. Weber (éd.), Cincinnati, EPA, 1985. 215 p. (1985a).
- EPA, «Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates». EPA-540/9-85-005, Washington, EPA, Hazard Evaluation Division, Office of Pesticide Programs, 1985 (1985b).
- EPA (*Environmental Protection Agency*). «Procedures for Conducting *Daphnia magna* Toxicity Bioassays». Rapport EPA/600/8-87/011, préparé par K.E. Biesinger, L.R. Williams et W.H. van der Scahlie. Cincinnati, EPA, Environmental Monitoring Systems Laboratory, 1987.
- EPA. *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, 2^e éd. Rapport EPA/600/4-89/001, préparé par C.I. Weber, W.H. Peltier, R.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neisheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, W.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer et R.W. Freyberg. Cincinnati, EPA, 1989. 248 p.
- 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. Edmonton, Environnement Canada 1987 (1986).
- Goulden, C.E., R.M. Comotto, J.A. Hendrickson Jr., L.L. Hornig et K.L. Johnson. «Procedures and Recommendations for Culture and Use of *Daphnia* in Bioassay Studies». *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*. J.G. Pearson,

- R.B. Foster et W.E. Bishop (éd.). ASTM STP 766. Philadelphie, ASTM, 1982, p. 139-160.
- 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». Corvallis, OR, EPA, 1988.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo et R.V. Thurston. «Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays». *Environmental Science and Technology*, vol. 11, 1977, p. 714-719.
- Herbert, P.D.N. «The Population Biology of *Daphnia*». *Biology Review*, vol. 53, 1978, p. 387-426.
- Hubert, J.J. «PROBIT2: A Microcomputer Program for Probit Analysis». Guelph, University of Guelph, Department of Mathematics and Statistics, 1987.
- ISO (Organisation internationale de normalization). «Qualité de l'eau- Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera*, *Crustacea*)», 1^{re} éd. Rapport n° ISO 6341-1982(F). Genève, ISO, 1982.
- Keating, K.I. «The Influence of Vitamin B12 Deficiency on the Reproduction of *Daphnia pulex* Leydig (*Cladocera*)». *Journal of Crustacean Biology*, vol. 5, 1985, p. 130-136.
- Keating, K.I. et B.C. Dagbuson. «Effect of Selenium Deficiency on Cuticle Integrity in the *Cladocera* (*Crustacea*)». *Proceedings of the [U.S.] National Academy of Sciences*, vol. 81, 1984, p. 3433-3437.
- Litchfield, J.T. «A Method for Rapid Graphic Solution of Time-percent Effect Curves». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 97, 1949, p. 399-408.
- 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*». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton, Ontario, 7-9 novembre, 1978*. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer no 862. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 15-22.
- Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan, «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034, Duluth, MN, EPA, 1988.
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). «*Daphnia* sp., 14-day Reproduction Test (Including an Acute Immobilization Test)» Document n° 202. Paris, OCDE, 1981.
- Pays-Bas. «Determination of Toxicity», Chap. 5. *Degradability, Ecotoxicity and Bio-accumulation. The Determination of the Possible Effects of Chemicals and Wastes on the Aquatic Environment*. La Haye, Bureau des publications officielles, 1980.
- Pennak, R.W. *Freshwater Invertebrates of the United States*, 2e éd. New York, John Wiley & Sons, 1978.
- 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. Amherst, University of Massachusetts, Department of Civil Engineering, 1983.
- Poirier, D.G., G.F. Westlake et S.G. Abernethy. «*Daphnia magna* Acute Lethality Toxicity

Test Protocol». Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, 1988.

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, and R.H. Young, «Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish», Victoria, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, 1982. 18 p.

Sergy, G. «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection». Edmonton, Environment Canada, juillet 1987.

Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions: II, Multicomponent Systems - hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products». *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 7, 1980, p. 125-137.

Sprague, J.B. «The ABCs of Pollutant Bioassay Using Fish». *Biological Methods for the Measurement of Water Quality*. ASTM STP 528, Philadelphie, ASTM, 1973, p. 6-30.

Stephan, C.E., «Methods for Calculating an LC50», *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer and J.L. Hamelink (éd.), ASTM STP 634, Philadelphie, ASTM 1977. P. 65-84.

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique et adresses de l'administration centrale et des bureaux Régionaux d'Environnement Canada

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (au mois de juillet 1990) ***Gouvernement fédéral*** (Environnement Canada)

P. Wells (président actuel)
PE, Dartmouth (N.-É.)

B. Moores
St. John's (T.-N.)

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

G. Elliot
Edmonton (Alberta)

R. Watts
North Vancouver (C.-B.)

K. Day
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

B. Dutka
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

C. Kriz
Direction des programmes fédéraux
Ottawa (Ontario)

D. MacGregor
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

P. MacQuarrie
Direction des produits chimiques commerciaux
Ottawa (Ontario)

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

P. Farrington
Direction de la qualité des eaux
Ottawa (Ontario)

Gouvernements provinciaux

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

G. Westlake
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

W. Young
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité
publique du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

K. Lauten
Ministère de l'Environnement et de la Sécurité
publique de la Saskatchewan
Regina (Saskatchewan)

J. Somers
Ministère de l'Environnement de l'Alberta
Vegreville (Alberta)

S. Horvath
Ministère de l'Environnement et de la Colombie-
Britannique
Vancouver (C.-B.)

G. van Aggelen
Ministère de l'Environnement et de la Colombie-
Britannique
Vancouver (C.-B.)

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^e étage
Downsview (Ontario)
M3H 5T4

Région de l'Atlantique

15^e 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^e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Québec

105 rue McGill
8^e étage
Montréal (Québec)
H2Y 2E7

Région du Pacifique et du Yukon*

224, rue Esplanade ouest
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3H7

* Un programme informatique en BASIC pour le calcul de la CL50 existe et peut être reproduit sur une disquette formatée de 13 cm compatible IBM, fournie par l'utilisateur. Pour se procurer ce programme, communiquer avec le Laboratoire de toxicité aquatique à cette adresse.

Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.*

1. Type de substance à expérimenter

Document	Type de Substance
APHA <i>et al.</i> , 1985	effluent
ISO, 1982	effluent ou autre substance soluble
ASTM, 1984	effluent
OCDE, 1981	produit chimique
EPA, 1982	produit chimique
Plotkin et Ram, 1983	produit chimique ou effluent
Pays-Bas, 1980	produit chimique ou effluent
BHSC, 1982	produit chimique
EPA, 1985b	produit chimique
Greene <i>et al.</i> , 1988	élutriat ou milieu récepteur
C.-B., 1988	effluent
Poirier <i>et al.</i> , 1988	effluent

2. Organisme, type d'essai et durée

Document	Organisme	Cycle biologique (h)	Type d'essai	Durée
APHA <i>et al.</i> , 1985	<i>D. magna</i>	néonate (<24)	S ^a	120
ISO, 1982	<i>D. magna</i>	néonate (6-24)	S	24
ASTM, 1984	<i>D. magna/D. pulex</i>	néonate (<24)	S	48
OCDE, 1981	<i>Daphnia</i> sp.	néonate (<24)	S	24
EPA, 1982	<i>D. magna/pulex</i>	néonate (≤24)	S, RC ^b	48
Plotkin et Ram, 1983	<i>D. magna/pulex</i>	néonate (<24)	S	48
Pays-Bas, 1980	<i>D. magna</i>	néonate (<24)	S	48
BHSC, 1982	<i>D. magna/pulex</i>	néonate (6-24)	S	48
EPA, 1985b	<i>D. magna/pulex</i>	néonate (<24)	S, RC	48
Greene <i>et al.</i> , 1988	<i>D. magna/pulex</i>	néonate (2-24)	S	48
C.-B., 1988	<i>D. magna/pulex</i>	néonate (<48)	S	48
Poirier <i>et al.</i> , 1988	<i>D. magna</i>	néonate (≤24)	S	48

^a S = Essai statique, ^b RC = Essai à renouvellement continu

* D'après les prescriptions des documents de méthodologie canadiens, américains et internationaux dont disposaient les auteurs en date d'août 1988.

3. Conditions d'élevage et d'acclimatation

Document	Source d'eau			Température (° C)	Dureté	Aération
APHA <i>et al.</i> , 1985	ER ^a	EN ^b	MR ^c	20	NI ^e	aucune
ISO, 1982		EN	ED ^d	20 ± 2	NI	aucune
ASTM, 1984			MR	20 ± 4	NI	au besoin, si OD ≥ 40%
OCDE, 1981	ER	EN		19 ± 1	NI	pendant l'élevage au
EPA, 1982	ER	EN	ED	MR 20 ± 1	NI	besoin, si OD ≥ 60%
Plotkin et Ram, 1983	ER	EN		21 ± 2	NI	aération légère
Pays-Bas, 1980	ER			19 ± 1	NI	pendant l'élevage
BHSC, 1982	ER	EN		NI	NI	NI
EPA, 1985b	NI			NI	NI	NI
Greene <i>et al.</i> , 1988	ER			22 ± 4	<i>D. magna</i> : 80–100 <i>D. pulex</i> : 40–48	aération légère au besoin, si OD ≥ 6 mg/L
C.-B., 1988	ER	EN		NI	<i>D. magna</i> : 110 <i>D. pulex</i> : 50	NI
Poirier <i>et al.</i> , 1988	ED ou autre			20 ± 1	120–250	aération légère

^a ER = Eau reconstituée^b EN = Eau naturelle, souterraine ou de surface, provenant d'une source non contaminée^c MR = Milieu récepteur^d ED = Eau municipale déchlorée^e NI = Non indiqué

4. Conditions d'éclairage pendant l'élevage

Document	Photopériode (lumière :obscurité)	Intensité (lux)	Type d'éclairage	Aube/ crépuscule (min)
APHA <i>et al.</i> , 1985	NI	NI	NI	NI
ISO, 1982	NI	NI	NI	NI
ASTM, 1984	16 h : 8 h	≤ 800	fluorescent à spectre continu	NI
OCDE, 1981	8 h : 16 h	NI	NI	NI
EPA, 1982	16 h : 8 h	NI	NI	15 - 30
Plotkin et Ram, 1983	12 h : 12 h	lumière ambiante du laboratoire	NI	NI
Pays-Bas, 1980	8 h : 16 h	NI	NI	NI
BHSC, 1982	NI	NI	NI	NI
EPA, 1985b	NI	NI	NI	NI
Greene <i>et al.</i> , 1988	16 h : 8 h	540–1080	NI	NI
C.-B., 1988	14 h : 10 h ou éclairage naturel	NI	NI	NI
Poirier <i>et al.</i> , 1988	16 h : 8 h	≤ 800	fluorescent Blanc froid	NI

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

Document	Alimentation pendant l'élevage	Alimentation pendant l'essai
APHA <i>et al.</i> , 1985	fumier + levure, algues ou herbe	non
ISO, 1982	extrait de viande + glucose ou algues	NI
ASTM, 1984	aliments naturels ou artificiels	non
OCDE, 1981	algues (<i>Chlorella</i> spp.)	non
EPA, 1982	algues ou autre aliments	non
Plotkin et Ram, 1983	moulée de truite + levure	oui (ajoutée à la solution)
Pays-Bas, 1980	algues (<i>Chlorella</i> spp.)	non
BHSC, 1982	NI	non
EPA, 1985b	NI	NI
Greene <i>et al.</i> , 1988	moulée de truite, luzerne, levure + algues	non
C.-B., 1988	moulée de truite, levure + algues	non
Poirier <i>et al.</i> , 1988	culture d'algues mélanges	non

6. Conditions de l'essai

Document	Récipient	Volume d'essai (mL)	Nombre de daphnies par récipient	mL de solution par daphnie	Nombre de répétitions
APHA <i>et al.</i> , 1985	bécher ^a de 125 mL	100	10	10	3
ISO, 1982	bécher/éprouvette	NI	≤20	≥2	NI
ASTM, 1984	bécher de 250 mL	200	5	40	4
OCDE, 1981	NI	NI	5	2	4
EPA, 1982	bécher de 250 mL	200	10	≥25	≥2
Plotkin et Ram, 1983	bécher de 1 L	200–400	10	20–40	2
Pays-Bas, 1980	bécher de 0,25 ou 1L	250–1000	25	10–40	2
BHSC, 1982	NI	NI	5	2	4
EPA, 1985b	bécher de 250 mL	200	10	20	2
Greene <i>et al.</i> , 1988	bécher de 100 mL	50	10	5	3
C.-B., 1988	sacs Whirl-Pak ^{MC} jetables	NI	10	10	2
Poirier <i>et al.</i> , 1988	éprouvettes de 25 mm sur 100 mm	50	3	15	1

7. Caractéristique de l'eau de contrôle/de dilution

Document	Type d'eau	Dureté (mg/L)	pH	OD minimum
APHA <i>et al.</i> , 1985	ER ^a EN ^b MR ^d	NI	NI	NI
ISO, 1982	ER	250 ± 25	7,8 ± 0,2	>80 %
ASTM, 1984	ER EN MR	NI	NI	NI
OCDE, 1981	ER EN	NI	NI	>80 %
EPA, 1982	ER EN ED ^c MR	NI	NI	≥90 %
Plotkin et Ram, 1983	ER EN	170 ± 10	NI	NI (aérée)
Pays-Bas, 1980	ER	NI	NI	100 %
BHSC, 1982	ER EN	NI	NI	NI
EPA, 1985b	ER EN	40–48	NI	NI
Greene <i>et al.</i> , 1988	ER	<i>D. magna</i> : 80–100 <i>D. pulex</i> : 40–48	NI	≥60 %
C.-B., 1988	ER EN	<i>D. magna</i> : 100 <i>D. pulex</i> : 50	NI	≥90 %
Poirier <i>et al.</i> , 1988	ED ou autre	120–150	6,5–8,5	NI

^a ER = Eau reconstituée

^b EN = Eau naturelle, souterraine ou de surface provenant d'une source non contaminée

^c ED = Eau municipale déchlorée

^d MR = Milieu récepteur

8. Conditions d'éclairement pendant l'essai

Document	Photopériode (lumière:obscurité)	Intensité (lux)	Type d'éclairage	Aube/ crépuscule (min)
APHA <i>et al.</i> , 1985	NI	NI	NI	NI
ISO, 1982	24 h d'obscurité	-	-	-
ASTM, 1984	16 h : 8 h	≤800	fluorescent à spectre continu	NI
OCDE, 1981	24 h d'obscurité	-	-	-
EPA, 1982	16 h : 8 h	NI	NI	15–30
Plotkin et Ram, 1983	12 h : 12 h	540–1080	NI	NI
Pays-Bas, 1980	10 h : 14 h	NI	NI	NI
BHSC, 1982	au choix	NI	NI	NI
EPA, 1985b	16 h : 8 h	NI	NI	15–30
Greene <i>et al.</i> , 1988	16 h : 8 h	540–1080	NI	NI
C.-B., 1988	14 h : 10 h	NI	NI	NI
Poirier <i>et al.</i> , 1988	16 h : 8 h	≤800	fluorescent blanc froid	NI

9. Température, aération, et oxygène dissous pendant l'essai

Document	Température de l'eau (°C)	Aération	OD minimum
APHA <i>et al.</i> , 1985	20	aucune	NI
ISO, 1982	20 ± 2	NI	≥ 2 mg/L
ASTM, 1984	20 ± 2	aucune	NI
OCDE, 1981	18 - 22 (± 5)	aucune	> 70%
EPA, 1982	20 ± 1	aucune	≥ 60 %
Plotkin et Ram, 1983	16 - 25	légère si OD < 40 %	≥ 40 %
Pays-Bas, 1980	19 ± 1	aucune	≥ 80 %
BHSC, 1982	18–22 (± 1,0)	aucune	≥ 2 mg/L
EPA, 1985b	20	NI	≥ 60 %
Greene <i>et al.</i> , 1988	20 ± 2	aucune	NI
C.-B., 1988	20 ± 2	aucune	NI
Poirier <i>et al.</i> , 1988	20 ± 1	NI	NI

10. Correction du pH avant l'essai

Document	Traitement précisé pour le pH
APHA <i>et al.</i> , 1985	NI
ISO, 1982	NI
ASTM, 1984	NI
OCDE, 1981	ne pas corriger
EPA, 1982	NI
Plotkin et Ram, 1983	ramener le pH à 7,0 s'il est inférieur à 6,0 ou supérieur à 8,0
Pays-Bas, 1980	ramener le pH à la valeur de l'eau de contrôle si on le souhaite
BHSC, 1982	ne pas corriger le pH; reprendre l'essai au pH de l'eau de dilution
EPA, 1985b	NI
Greene <i>et al.</i> , 1988	effectuer un essai parallèle avec correction si le pH est inférieur à ou supérieur à 10
C.-B., 1988	NI
Poirier <i>et al.</i> , 1988	si on le souhaite, effectuer un essai supplémentaire avec correction

11. Observations biologiques pendant l'essai

Document	Variable	Temps (h)						
APHA <i>et al.</i> , 1985	mobilité	1	2	4	8	16	chaque jour	
ISO, 1982	mobilité						24	
ASTM, 1984	mort ou mobilité						24	48
OCDE, 1981	mobilité						24	
EPA, 1982	mobilité			3	6	12	24	48
Plotkin et Ram, 1983	mort	1	2	4	8	12	24	48
Pays-Bas, 1980	mort			3	6		24	48
BHSC, 1982	mobilité						24	
EPA, 1985b	mort ou mobilité							48
Greene <i>et al.</i> , 1988	mort, léthargie, flottaison						24	48
C.-B., 1988	mort						24	48
Poirier <i>et al.</i> , 1988	mort, mobilité, rotation, flottaison	1	2	4			24	48

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

Document	Variable*								Fréquence			
APHA <i>et al.</i> , 1985	NI								NI			
ISO, 1982	OD								0		24	
ASTM, 1984	OD	pH	T	C	DT	SS	AT		0	4	8	24 48
OCDE, 1981	OD	pH	T						0			24
EPA, 1982	OD	pH	T						0			24 48
Plotkin et Ram, 1983	OD								1	2	4	8 12 24 48
Pays-Bas, 1980	OD	pH							0			48
BHSC, 1982	OD	pH							0			24
EPA, 1985b	OD	pH	T									48
Greene <i>et al.</i> , 1988	OD	pH	T	C	DT		AT		0			24 48
C.-B., 1988	OD	pH							0			48
Poirier <i>et al.</i> , 1988	OD	pH		C	DT				0			48

- * OD = oxygène dissous
T = température
CS = conductivité
DT = dureté totale
SS = solides en suspension
AT = alcalinité totale

13. Résultat de l'essai

Document	Résultat			Durée d'exposition (h)		
APHA <i>et al.</i> , 1985	CE50			NI		
ISO, 1982	CE50			24		
ASTM, 1984	CE50	ou	CL50	24 et 48		
OCDE, 1981	CE50			24		
EPA, 1982	CE50			24 et 48		
Plotkin et Ram, 1983			CL50		48	
Pays-Bas, 1980			CL50		48	
BHSC, 1982	CE50	ou	CL50	24		
EPA, 1985b	CE50	ou	CL50		48	
Greene <i>et al.</i> , 1988			CL50		48	
C.-B., 1988			CL50	ou TL50	≤48	
Poirier <i>et al.</i> , 1988	CE50	et	CL50		48	

Méthode de préparation de l'YCT et de la nourriture à base d'algues pour les élevages de daphnies*

Préparation de moulée de truite digérée

1. La préparation de la moulée de truite nécessite une semaine. Utiliser des roulettes de purée de truite «de première» (*starter*) ou de catégorie n° 1.
2. Ajouter 5,0 g de boulettes de purée de truite 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 2L. Faire digérer avant l'utilisation en assurant une aération continue à parti du fond du contenant pendant une semaine, à la température ambiante du laboratoire. 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 réservoir devrait être déposé dans une hotte ou un autre endroit isolé et bien aéré.
3. À la fin de la période de digestion, déposer la moulée dans un réfrigérateur et la laisser décanter pendant au moins 1 h. Filtrer le surnageant grâce à un tamis à mailles fines (p. ex., Nitex^{MC}, 110 mesh). Combiner des volumes égaux de surnageant des préparations de Cerophyll^{MC} et de

surnageant à l'état frais ou le congeler jusqu'au moment de son utilisation. Jeter les sédiments.

Préparation de 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 levure en suspension (ne pas la laisser décanter) avec des volumes égaux de surnageant de préparations de moulée de truite (voir ci-dessous) et de Cerophyll (voir ci-dessous). Jeter les quantités inutilisées.

Préparation de Cerophyll (feuilles de céréales séchées en poudre)

1. Déposer dans un mélangeur 5,0 g de feuilles de céréales séchées en poudre**. Les feuilles de luzerne séchées en poudre qu'on peut se procurer dans les magasins d'aliments naturels représentent, d'après l'expérience, un substitut satisfaisant.
2. Ajouter 1 L d'eau désionisée.
3. Mélanger à grande vitesse pendant 5 minutes ou agiter pendant la nuit à vitesse moyenne sur une plaque à agitateur magnétique.
4. Si l'on utilise un mélangeur pour suspendre la substance, déposer le mélange dans un réfrigérateur pendant la nuit pour le laissez

* Extrait de EPA, 1989

** Offertes sous l'appellation «Cereal Leaves» par Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, Missouri 63178, (800) 325-3010, et sous la marque Cerophyll^{MC} par Ward's Natural Science Establishment Inc., P.O. Box 92912, Rochester, New York 14692-9012, (716) 359-2502.

levure (voir ci-dessous). On peut utiliser le

décanner. 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 moulée de truite et de levure. Jeter les quantités inutilisées.

Préparation de l'YCT combinée

1. Mélanger des volumes égaux (environ 300 mL) des trois aliments décrits ci-dessus.
2. Placer des aliquotes du mélange dans de petites bouteilles de plastique à bouchon vissé (de 50 à 100 mL) et faire congeler jusqu'à utilisation.
3. On peut utiliser immédiatement les aliments fraîchement préparés; on peut aussi les congeler jusqu'à ce qu'on en ait besoin. Les aliments dégelés doivent être conservés au réfrigérateur entre les utilisations, pendant une durée maximal de deux semaines.

Préparation de la nourriture à base d'algues (Selenastrum)

A. Milieu de culture des algues

1. Préparer cinq solutions nutritives mères à partir des produits chimiques de qualité «réactif» énumérés au tableau C1.
2. Ajouter 1 mL de chaque solution mère, selon l'ordre indiqué au tableau C1, à environ 900 mL d'eau désionisée. Bien mélanger après chaque addition. Compléter à 1 L, bien mélanger et corriger le pH pour qu'il s'établisse à $7,5 \pm 0,1$, au moyen d'une solution décimale de NaOH ou de HCl, selon le cas. La concentration définitive de macronutriments et de micronutriments dans le milieu de culture est indiquée au tableau C2.

3. Filtrer immédiatement le milieu à pH corrigé à l'aide d'une membrane dont le diamètre des pores est égal à $0,45 \mu\text{m}$, 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 déposé dans les réservoirs de culture.
5. Le milieu stérile inutilisé ne doit pas être stocké pendant plus d'une semaine avant d'être utilisé, en raison de la possibilité de pertes d'eau considérables par évaporation.

B. Création et maintien de cultures mères d'algues

1. Sur réception de la culture «de lancement» (généralement, environ 10 mL), on crée une culture mère en transférant aseptiquement 1 mL dans chacun de plusieurs flacons de culture de 250 mL renfermant 100 mL de milieu de culture d'algues (préparé selon la description ci-dessous). Le reste de la culture de lancement peut être mis en réserve pour une durée pouvant atteindre six mois dans un réfrigérateur (dans l'obscurité) à 4°C .
2. Les cultures mères sont utilisées comme sources d'algues pour lancer des cultures «alimentaires» (voir la section suivante). Le volume des cultures mères maintenues à tout moment dépend de la quantité d'algues nécessaire pour l'élevage des daphnies. Il peut rapidement être porté à plusieurs litres, au besoin, à l'aide de bouteilles à serum de 4 L ou de récipients analogues renfermant chacun 3 L de milieu de croissance.

Tableau C1 Solutions nutritives mères pour le maintien de cultures mères d'algues

Solution nutritive mère	Composé	Quantité dissoute dans 500 mL d'eau désionisée
1	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6,08 g
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,20 g
	H_3BO_3	92,8 mg
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	208,0 mg
	ZnCl_2	1,64 mg*
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	79,9 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,714 mg**
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,63 mg***
	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,006 mg****
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,0 mg
2	NaNO_3	12,75 g
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,35 g
4	K_2HPO_4	0,522 g
5	NaHCO_3	7,50 g

* ZnCl_2 - Peser 164 mg et diluer à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

** $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - Peser 71,4 mg et diluer à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

*** $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Peser 36,6 mg et diluer à 10 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 1.

**** $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Peser 60,0 mg et diluer à 1000 mL. Prendre 1 mL de cette solution et compléter à 10 mL. Prendre 1 mL de la deuxième solution et l'ajouter à la solution mère n° 1.

Tableau C2 **Concentration définitive 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	-	-

- La température de culture n'est pas critique. Les cultures mères peuvent être maintenues à une température variant entre 20 et 25° C dans des simulateurs d'environnement avec des cultures d'autres organismes si l'éclairement est suffisant (éclairage continu d'environ 4 300 lux, ou 400 pieds-bougies, à l'aide d'un fluorescent «blanc froid»).
- Les cultures sont mélangées deux fois par jour, à la main.
- Les cultures mères peuvent être conservées au réfrigérateur jusqu'à ce qu'elles soient utilisées pour lancer des cultures
- «alimentaires» ou peuvent être transférées dans un nouveau milieu à raison d'une fois par semaine. On transfère la culture mère d'algues âgée de sept jours, renfermant environ $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre, à raison de 1 à 3 mL par volume de 100 mL de milieu de culture frais. L'inoculum doit assurer une densité cellulaire initiale de l'ordre de 10 000 à 30 000 cellules par millilitre dans les nouvelles cultures mères; il faut prendre soin d'éviter la contamination par d'autres microorganismes.
- On doit 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 pour une durée de 6 à 12 mois si elles sont gardées dans l'obscurité à 4° C. Il est recommandé de préparer, tous les quatre à six mois, de nouvelles cultures mères à partir de cultures «de lancement» obtenues auprès de sources extérieures reconnues.

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

1. Les cultures «alimentaires» sont mises en route sept jours avant d'être utilisées dans les élevages de daphnies. On ajoute environ 20 mL d'une culture mère d'algues âgée de sept jours (décrite au paragraphe précédent), renfermant $1,5 \times 10^6$ cellules par millilitre, à chaque litre de milieu de culture d'algues frais (soit 3 L de milieu dans une bouteille de 20 L). L'inoculum doit assurer 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 microorganismes.
2. Les cultures alimentaires peuvent être conservées à une température de 20 à 25° C dans des simulateurs d'environnement avec les cultures mères d'algues ou des cultures d'autres organismes si l'éclairage est suffisant (éclairage continu d'environ 4 300 lux à l'aide d'un fluorescent «blanc froid»).
3. Les cultures sont mélangées en continu sur une plaque d'agitation magnétique (avec une barre 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 à 3° C*.

D. *Préparation d'un concentré d'algues pour l'alimentation des daphnies*

1. On prépare un concentré d'algues renfermant de $3,0$ à $3,5 \times 10^7$ cellules par millilitre à partir des cultures alimentaires en centrifugeant les algues avec une centrifugeuse à plancton ou à godets ou en laissant les cultures décanter dans un réfrigérateur pendant deux à trois semaines environ et en siphonnant le surnageant.
2. La densité cellulaire (cellules par millilitre) du concentré se mesure à l'aide d'un compte-particules électronique, d'un microscope et d'un hémacymètre, d'un fluoromètre ou d'un spectrophotomètre. On s'en sert pour établir la dilution (ou la concentration supplémentaire) nécessaire pour atteindre une densité cellulaire définitive de $3,0$ à $3,5 \times 10^7$ 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 sept jours et une récupération à 100 % au cours du processus de concentration, une culture de 3 L de sept à dix jours assure 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 daphnies (section 2.4.10).
4. Le concentré d'algues peut être conservé au réfrigérateur pendant un mois.

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

Annexe D

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité*

Colonne (nombre de concentrations comprises entre 100 et 10, ou entre 10 et 1)**

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	4,2	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

* Adapté de Rocchini *et al.*, 1982.

** Une série de cinq concentrations ou plus peut être choisie dans une même colonne. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se retrouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées en pourcentage (volume ou poids), en mg/L ou en g/L. Au besoin, elles peuvent être multipliées ou divisées par n'importe quelle puissance de 10. On peut se servir de la colonne 1 lorsqu'on est très incertain quant au degré de toxicité. On ne devrait pas employer de concentrations plus espacées (c.-à-d. séparées par un facteur inférieur à 0,3). Pour les essais d'effluents, on gagne rarement beaucoup en précision en choisissant des concentrations dans une colonne à droite de la colonne 3; les écarts moins larges des colonnes 4 à 7 peuvent être utiles à l'occasion pour l'essai de produits chimiques ayant un seuil d'effet abrupte.