Environnement et Changement climatique Canada
Environment and Climate Change Canada
Canada

Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë à l'aide de l'épinoche à trois épines

SPE 1/RM/10
Deuxième édition Décembre 2017

PDF :
Nº de cat. : En49-7/1-10-2017F-PDF
ISBN : 978-0-660-24314-6

Paper :
No de cat. : En49-7/1-10-2017F
ISBN : 978-0-660-24315-3

À moins d'avis contraire, il est interdit de reproduire le contenu de cette publication, en totalité ou en partie, à des fins de diffusion commerciale sans avoir obtenu au préalable la permission écrite de l'administrateur du droit d'auteur d'Environnement et Changement climatique Canada. Si vous souhaitez obtenir du gouvernement du Canada les droits de reproduction du contenu à des fins commerciales, veuillez demander l'affranchissement du droit d'auteur de la Couronne en communiquant avec :

Environnement et Changement climatique Canada
Centre de renseignements public
12e étage, édifice Fontaine
200, boulevard Sacré-Cœur
Gatineau (Québec) K1A 0H3
Téléphone : 819-938-3860
Sans frais : 1-800-668-6767 (au Canada seulement)
Courriel : ec.enviroinfo.ec@canada.ca

Photos de la page couverture : © Getty Images, Inc.

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par la ministre de l'Environnement et du Changement climatique, 2018

Also available in English

Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë à l'aide de l'épinoche à trois épines

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
Ottawa (Ontario)

Méthode de référence
SPE 1/RM/10
Deuxième édition Décembre 2017

Commentaires

Prière d'adresser vos commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins, chef
Section de l'évaluation biologique et normalisation
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Les demandes de renseignements généraux concernant cette méthode peuvent être adressées à :
ec.methodes-methods.ec@canada.ca

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale des sciences et de la technologie d'Environnement et Changement climatique Canada, et approuvé aux fins de publication. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation quant à l'emploi de ces produits de la part d'Environnement et Changement climatique Canada. D'autres produits de valeur comparable peuvent être utilisés.

Résumé

Le présent document décrit des méthodes normalisées ou de référence explicites pour mesurer la toxicité létale aiguë d'effluents chez l'épinoche à trois épines vivant en milieu marin ou estuarien (*Gasterosteus aculeatus*). Des instructions précises sont fournies pour effectuer des analyses de la létalité aiguë avec des échantillons d'effluents dont la salinité est supérieure à 10 g/kg et qui se déversent directement dans des eaux réceptrices marines ou estuariennes.

Cette deuxième édition du document remplace la première édition de la méthode d'essai biologique SPE 1/RM/10 (EC, 1990a) qui a été publiée en juillet 1990 puis modifiée en mars 2000. Elle remplace cette version antérieure et constitue la méthode de référence d'Environnement et Changement climatique Canada (auparavant Environnement Canada) à utiliser pour déterminer la létalité aiguë des effluents chez l'épinoche à trois épines. Cette version révisée du document SPE 1/RM/10 comprend de nombreuses mises à jour, notamment : la conversion de la méthode « générique » à la méthode de « référence »; la révision de méthodes concernant l'ajustement de la salinité et la préparation de l'eau de mer artificielle; l'obligation d'obtenir des organismes d'essai à partir d'eaux marines ou de cultures estuariennes ou marines; la réduction de la gamme de tailles des poissons devant servir comme organismes d'essai, la révision des conseils sur le maintien et l'acclimatation pour tenir compte des pratiques de laboratoire actuelles et variées; enfin, l'examen et la révision des recommandations et exigences de la méthode d'essai.

Trois méthodes différentes sont présentées :

i) une méthode d'essai à concentration unique portant sur l'effluent non dilué, sauf indication contraire;

ii) une méthode d'essai à concentrations multiples visant à déterminer la concentration létale médiane (CL50) de l'effluent;

iii) une méthode d'essai portant sur un toxique de référence.

Le lecteur trouvera des instructions concernant le maintien des épinoches en laboratoire, les installations et l'approvisionnement en eau, la manipulation et le stockage des échantillons, la préparation des solutions, les conditions d'essai, les observations à faire, les paramètres d'essai et les méthodes de calcul connexes ainsi que l'utilisation de toxiques de référence. Des procédures particulières sont également présentées pour la mise à l'essai de produits chimiques, de préparations ou de mélanges chimiques.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une collection de **méthodes de référence** pour mesurer et évaluer l'effet ou les effets toxiques de l'exposition d'une seule espèce d'organismes aquatiques ou terrestres à des échantillons d'effluents et de produits chimiques, dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies.

Par **méthode de référence**, on entend une méthode biologique particulière d'essai de la toxicité, c'est-à-dire une méthode écrite comportant un ensemble explicite de directives et de conditions expérimentales décrites avec précision. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement et Changement climatique Canada (auparavant Environnement Canada), la **méthode de référence** est souvent limitée, dans son emploi, aux essais exigés par certains règlements (p. ex. le *Règlement sur les effluents des mines de métaux* promulgué en vertu de la *Loi sur les pêches* fédérale).

Les **méthodes de référence** sont celles qui ont été développées et publiées par Environnement et Changement climatique Canada et qui sont préférées dans les cas suivants :

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

Dans l'annexe A, on trouve une liste des **méthodes de référence** préparées pour publication par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement et Changement climatique Canada, à Ottawa (Ontario), de méthodes génériques (aux applications plus larges) d'essai biologique et de guides à l'appui.

Les termes définis dans la section « Terminologie » se détachent en italiques, dans le corps du document, quand ils sont employés conformément à leur définition. Les italiques feront aussi ressortir d'autres termes.

Table des matières

Résumé ..... **ii**
Avant-propos ..... **iii**
Table des matières ..... **iv**
Liste des abréviations et des formules chimiques ..... **vi**
Terminologie ..... **vii**
Remerciements ..... **xiii**

Section 1

Introduction **1**

Section 2

Organismes d'essai **3**
2.1 Espèce et source 3
2.2 Maintien et acclimatation 4
2.3 Eau 5
2.4 Conditions physico-chimiques 7
2.4.1 Température 7
2.4.2 Salinité 7
2.4.3 Oxygène dissous et pH 7
2.4.4 Éclairage 7
2.4.5 Surveillance 8

Section 3

Installations **9**

Section 4

Modes opératoires généraux pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents **10**
4.1 Étiquetage, transport et entreposage des échantillons 10
4.2 Conditions d'essai 11
4.3 Préparation des solutions d'essai 13
4.4 Début de l'essai 14
4.5 Observations et mesures 14
4.6 Critère de validité de l'essai 16

Section 5

Modes opératoires pour un essai à concentration unique afin de déterminer le taux de mortalité après 96 heures **17**

Section 6

Modes opératoires pour un essai à concentrations multiples afin de déterminer la CL50 de 96 heures **18**

Section 7

Modes opératoires pour les essais sur un toxique de référence **19**

Section 8

Modes opératoires pour les essais sur des produits chimiques **21**
8.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons 21
8.2 Préparation des solutions d'essai 21
8.3 Eau témoin/de dilution 23

8.4 Observations et mesures 24
8.5 Paramètres d'essai et calculs 24

Section 9

Rapports à produire 26
9.1 Données à déclarer 26
9.1.1 Effluent ou produit chimique 26
9.1.2 Installations et conditions de l'essai 26
9.1.3 Résultats 27
9.2 Données à verser au dossier 28
9.2.1 Effluent ou produit chimique 28
9.2.2 Installations et conditions de l'essai 28
9.2.3 Résultats 30
Références 31

Annexe A

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement et Changement climatique Canada 34

Annexe B

Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en juin 2017) 37

Annexe C

Environnement et Changement climatique Canada, laboratoires d'essai environnemental régionaux 40

Annexe D

Caractéristiques distinctives de l'épinoche à trois épines 41

Liste des abréviations et des formules chimiques

°C	degré(s) Celsius
cm	centimètre
CV	coefficient de variation
OD	oxygène dissous (concentration)
g	gramme
g/kg	gramme par kilogramme
h	heure
L	litre
CL50	concentration létale médiane
m	mètre
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mS	millisiemens
nm	nanomètre
MD(MD)	marque de commerce déposée
s	seconde
ET	écart type
SI	système international d'unités
MC (MC)	marque de commerce
µg	microgramme
µmhos	micromhos
µmol	micromole
×	fois
÷	divisé par
>	plus de
<	moins de
≥	plus de ou égal à
≤	moins de ou égal à
/	par; peut aussi signifier « ou » (p. ex. eau témoin/de dilution)
±	plus ou moins
%	pourcentage ou pour cent
‰	parties par millier (salinité)

Terminologie

Nota : Les définitions suivantes s'inscrivent dans le contexte du présent document et pourraient ne pas convenir à un autre contexte.

Verbes auxiliaires

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

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

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

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

Termes techniques

Acclimatation – Adaptation physiologique à une valeur précise d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux, comme la température ou la salinité. Ce terme s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

Anadrome – Les poissons anadromes naissent en eau douce, passent la plus grande partie de leur vie dans la mer et retournent en eau douce pour frayer.

Conductivité – Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de conduire 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. Les relevés de conductivité de l'eau sont généralement ajustés en fonction de la température de référence de 25 °C et exprimés normalement en millisiemens par mètre (mS/m) ou en micromhos par centimètre (µmhos/cm) (1 mS/m = 10 µmhos/cm). La conductivité est une méthode indirecte de mesure de la *salinité*, le résultat étant normalement converti en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (salinité) (‰).

Conformité – Respect des exigences du gouvernement en matière de réglementation ou de délivrance de permis.

Étalonnage – Comparaison des mesures fournies par un dispositif mis à l'essai avec les mesures d'une norme d'étalonnage dont l'*exactitude* est connue. Une telle norme pourrait être un autre dispositif de mesure dont l'exactitude est connue, un dispositif générant la quantité à mesurer, comme la tension, ou un objet matériel, comme un mètre.

Euryhalin – Se dit d'un organisme capable de supporter sans stress de grandes variations de salinité.

Exactitude – Qualité de l'accord entre la valeur mesurée (ou estimée) et la valeur réelle. La détermination de l'exactitude d'une mesure exige généralement l'*étalonnage* de la méthode analytique avec une norme connue.

Longueur à la fourche – Longueur d'un poisson, mesurée à partir de l'extrémité du museau jusqu'à l'extrémité du rayon de la nageoire caudale médiane (c.-à-d. du milieu).

Lot – Groupe d'épinoches à trois épines reçues en une seule fois d'un fournisseur, qui permettent de recueillir tous les organismes d'essai destinés à être utilisés dans un *essai toxicologique* discret (y compris tout *essai de toxicité de référence* connexe). Ce terme *peut* aussi désigner un volume d'eau de mer (artificielle ou naturelle) destiné à être utilisé pour le maintien ou l'*acclimatation* ou dans le cadre d'un essai toxicologique discret (y compris tout essai de toxicité de référence connexe).

Lux – Unité d'éclairement fondée sur des unités par mètre carré. 1 lux = 0,0929 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 lux. Pour convertir des lux en flux quantique [µmol/(m^2 · s)], il faut connaître la qualité spectrale de la source lumineuse. Les conditions de luminosité ou l'irradiance sont exprimées sous forme de flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'onde photosynthétiquement efficaces d'environ 400 à 700 nm. Le lien entre flux quantique et lux (ou pied-bougie) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles (voir ASTM, 2014a). Néanmoins, le facteur de conversion entre flux quantique et lux pour une lumière fluorescente en spectre continu est donné par la relation 1 lux est approximativement égal à 0,016 µmol/(m^2 · s) (Deitzer, 1994; Sager et McFarlane, 1997).

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

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

Pourcentage (%) – Concentration exprimée en parties par centaine. Dans le cas des effluents ou des *produits chimiques*, dix pour cent (10 %) représente 10 unités d'un effluent (ou d'un produit chimique) dilué dans l'eau pour constituer en tout 100 parties. Les concentrations *peuvent* être préparées en fonction d'un rapport de masse à masse, de masse à volume ou de volume à volume et elles sont exprimées sous forme de pourcentage de l'échantillon d'effluent ou de produit chimique dans la solution définitive.

Précision – Concordance entre des mesures répétées (c.-à-d. le degré par lequel les données produites à partir de mesures répétées diffèrent). Elle est souvent évaluée en fonction de la variance ou de l'écart type. Elle permet de mesurer les contributions aléatoires à l'incertitude.

Prétraitement – Traitement d'un échantillon ou d'une dilution de cet échantillon avant d'y exposer les poissons.

Réfractométrie – Technique qui indique dans quelle mesure la lumière est déviée (c.-à-d. réfractée) lorsqu'elle se déplace de l'air à un échantillon et qui sert généralement à déterminer l'indice de réfraction d'un échantillon liquide. L'indice de réfraction, qui dépend grandement de la température, est alors utilisé pour déterminer la *salinité* d'un échantillon. Un réfractomètre est un instrument utilisé pour mesurer l'indice de réfraction.

Salinité – Quantité totale de sels dissous dans une quantité de solution donnée. Pour les besoins de la présente méthode, la salinité doit être mesurée à l'aide d'un *conductimètre* ou d'un *réfractomètre* (voir la section 4.2). La salinité est habituellement exprimée en grammes par kilogramme (g/kg). La salinité est habituellement exprimée en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (salinité) (‰).

Surveillance – Vérification périodique (p. ex. quotidienne, hebdomadaire, mensuelle, trimestrielle) de la qualité, ou collecte et communication de l'information. Dans le présent document, ce terme désigne

soit l'observation périodique (de routine) et la mesure de certaines variables biologiques ou certaines variables relatives à la qualité de l'eau, soit le prélèvement et la mise à l'essai d'échantillons (p. ex. des échantillons d'un *effluent*) afin d'en mesurer la toxicité.

Vérification – Procédure utilisée pour confirmer si un instrument ou un système analytique satisfait à un ensemble d'exigences ou de spécifications et si le rendement de l'instrument n'a pas changé de manière significative par rapport à l'*étalonnage* initial.

Termes relatifs aux effluents ou aux produits chimiques

Agent dispersant – Substance chimique qui réduit la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex. de l'huile), ce qui facilite la dispersion de cette substance dans l'eau sous forme d'émulsion.

Eau de dilution – Eau utilisée pour diluer un échantillon d'effluent ou de produit chimique à différentes concentrations aux fins des divers traitements associés aux essais de toxicité.

Eau de mer artificielle – voir *Eau de mer reconstituée*.

Eau de mer (naturelle) – Eau de mer du large ou provenant du large et n'ayant pas subi de dilution appréciable par l'eau douce naturelle provenant d'un assèchement de terrain. Voir *Eau de mer artificielle*.

Eau de mer reconstituée – Eau douce à laquelle on a ajouté des sels de mer secs du commerce, en une quantité suffisante pour obtenir une salinité (et un pH) convenant au maintien et à l'acclimatation des organismes et aux essais (*eau témoin/de dilution*). Voir *Eau de mer (naturelle)*.

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

Eau désionisée – Eau que l'on a purifiée en la faisant passer dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée – Eau que l'on a fait passer dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre matériau pour la débarrasser de ses impuretés.

Eau estuarienne – Eau de mer saumâtre des parties côtières des océans résultant de la dilution mesurable de l'eau océanique par l'eau douce provenant d'un assèchement de terrain.

Eau marine – Eau de mer du large ou provenant du large et n'ayant pas subi de dilution appréciable par l'eau douce naturelle provenant d'un assèchement de terrain.

Eau réceptrice – Eau de surface (p. ex. étendues d'eau *marine* ou *estuarienne*, cours d'eau, rivière ou lac) où des déchets ont été, ou sont sur le point d'être, déversés. D'autres termes doivent être employés afin de préciser le sens de ce terme dans son contexte.

Eau témoin/de dilution – Eau servant à la dilution de l'échantillon d'effluent (ou de produit chimique) et utilisée comme eau *témoin* dans un essai. L'eau témoin ou de dilution est souvent identique à l'eau de maintien et d'acclimatation.

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

Émulsifiant – Substance chimique facilitant le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une substance autrement hydrophobe.

Essai de toxicité de référence – Essai effectué à l'aide d'un *toxique de référence* parallèlement à un essai de toxicité pour évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'évaluation de l'échantillon d'effluent ou de produit chimique ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de ce toxique de référence. Tout écart par rapport à une plage normale préétablie indique que la sensibilité des organismes d'essai ainsi que le rendement et la précision de l'essai sont suspects.

Floculation – Formation d'un précipité léger non consolidé (c.-à-d. d'un floc) dans une solution.

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

Solution mère – Solution concentrée de l'échantillon de produit chimique à mettre à l'essai. Des volumes mesurés d'une solution mère sont ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer des solutions d'essai aux concentrations requises.

Substance chimique – Dans ce document, tout élément, composé, préparation ou mélange d'une substance qui pourrait se retrouver associés à de l'eau ou entrer dans le milieu aquatique par l'intermédiaire d'un déversement, d'une application ou d'un rejet.

Témoin – Dans une enquête ou une étude, *traitement* reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Dans un essai toxicologique, le témoin doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais il ne doit pas renfermer un échantillon d'effluent ou de *produit chimique*. Le *témoin* sert à vérifier l'absence de toxicité mesurable attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex. la qualité de l'*eau de dilution*, la santé des organismes d'essai ou les effets dus à la manipulation de ces derniers). Dans le cadre de la présente méthode, le terme « témoin de l'eau de dilution » est synonyme de *témoin* et correspond à l'*eau témoin*.

Témoin de la salinité – Pour les besoins de la présente méthode, échantillon d'une eau témoin/de dilution dont la *salinité* est ajustée pour correspondre à 1 ‰ de l'échantillon d'effluent ou, pour les essais de produits chimiques, pour correspondre à la concentration la plus élevée de l'échantillon d'essai. Outre le témoin de l'eau de dilution, un témoin de la salinité doit être inclus dans un essai si la salinité de l'échantillon est > 5 g/kg supérieure ou inférieure à la salinité à laquelle les poissons sont acclimatés. Le témoin de la salinité sert à vérifier l'absence d'effets dus uniquement à un brusque changement de la salinité (c.-à-d. choc de salinité). Le témoin de la salinité doit être > 10 g/kg et ≤ 35 g/kg et l'ajustement de la salinité est effectué à l'aide de sels de mer secs du commerce (voir la section 2.3).

Toxique de référence – Étalon *chimique* permettant d'établir la fiabilité des données sur la toxicité d'un échantillon d'effluent ou de produit chimique. Dans la plupart des cas, on procède à un essai toxicologique au moyen d'un toxique de référence afin de mesurer la sensibilité des organismes au moment de l'évaluation de l'échantillon d'effluent ou de produit chimique ainsi que la *précision* des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de ce toxique de référence.

Turbidité – Degré de réduction de la limpidité 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 relatifs aux statistiques et à la toxicologie

Aigu – Qui se manifeste à l'intérieur d'une période d'exposition relativement courte par rapport à la durée de la vie de l'organisme d'essai, généralement ≤ 96 heures pour les poissons. Un effet toxique aigu serait provoqué et observable au cours de cette période.

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

CL50 – Concentration létale médiane, soit la concentration dans l'eau d'un effluent ou d'un produit chimique (% ou mg/L) qui est estimée être *létale* pour 50 % des organismes d'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % s'obtiennent généralement par analyse statistique du taux de mortalité dans plusieurs concentrations d'essai, après une durée fixe d'exposition. La durée d'exposition doit être précisée (p. ex. CL50 96 h).

Coefficient de variation (CV) – Écart type (ET) d'un ensemble de données divisé par la moyenne de l'ensemble de données, exprimé sous forme de *pourcentage*. Il est calculé selon la formule suivante : CV (%) = 100 x (ET ÷ moyenne).

Essai à renouvellement continu – Conditions d'essai ou de maintien pendant lesquelles les solutions sont renouvelées en continu par l'apport constant d'une solution fraîche ou par un apport intermittent fréquent.

Essai à renouvellement périodique – Conditions d'essai ou de maintien pendant lesquelles les solutions sont renouvelées (remplacées) périodiquement, généralement aux 24 heures. Syn, « renouvellement périodique », « renouvellement », « à renouvellement séquentiel » et « semi-statique ».

Essai statique – Essai de toxicité au cours duquel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées pendant la durée de l'essai.

Essai toxicologique ou *essai de toxicité* – Détermination de l'effet d'un effluent ou d'un produit chimique sur un groupe choisi d'organismes, dans des conditions définies. Un essai de toxicité en milieu aquatique permet habituellement de mesurer la proportion des organismes atteints par leur exposition à des concentrations précises d'un effluent ou d'un produit chimique d'essai.

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 les agents qui sont les principaux responsables de la létalité aiguë dans un mélange complexe.

Évident – Clairement discernable dans les conditions d'essai ou de maintien utilisées.

Létal – Qui entraîne la mort par action directe. Dans le cas d'un poisson, on entend par « mort » la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité.

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

Moyenne géométrique – Moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. Elle a pour avantage d'atténuer l'influence qu'exercent les valeurs extrêmes sur la moyenne, comme lorsqu'une moyenne arithmétique est établie. On peut calculer la moyenne géométrique comme étant la racine

énième du produit de « n » valeurs ou comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes des « n » valeurs.

Paramètre – Mesure(s) ou valeur(s) dérivée(s) caractérisant les résultats de l'essai (p. ex. CL50, le taux de mortalité). La réaction des organismes d'essai (p. ex. décès) constitue également un paramètre.

Répétition (*récipient d'essai*) – Récipient d'essai individuel renfermant un nombre prescrit d'organismes exposés à une concentration de l'effluent ou du produit chimique d'essai, ou encore, à un ou plusieurs traitements témoins. Comme il s'agit d'une unité expérimentale indépendante, tout transfert d'organismes, d'effluent ou de produit chimique d'essai d'un récipient d'essai à un autre invaliderait l'analyse statistique fondée sur la répétition.

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

Toxicité – Capacité propre d'un effluent ou d'un produit chimique de provoquer des effets nocifs chez les poissons ou d'autres organismes vivants. Ces effets pourraient être *létaux* ou *sublétaux*.

Toxique – Synonyme d'effluent ou de produit chimique toxique.

Traitement – En règle générale, intervention ou procédure dont l'effet doit être mesuré. Plus précisément, dans un essai toxicologique, un traitement est une condition ou une procédure que le responsable de l'essai applique aux organismes d'essai afin d'en mesurer les effets sur les organismes. Le traitement peut consister en un échantillon non dilué d'effluent, en une concentration donnée d'un effluent ou d'un produit chimique ou d'une eau témoin.

Remerciements

La première édition du présent document, préparée sous la forme d'une méthode d'essai biologique générique, a été publiée en juillet 1990, puis modifiée en mars 2000. Elle a été rédigée en collaboration avec Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et John B. Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ont.). Messrs. G. Sergy et R. Scroggins (Protection de l'environnement, Environnement et Changement climatique Canada), en leur qualité d'autorités scientifiques, ont apporté une aide technique et orienté les travaux tout au long de l'élaboration de la première édition de cette méthode. Les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) ont participé activement à l'élaboration et à l'examen de la première édition du présent document et nous les remercions en conséquence. Nous tenons à souligner en particulier l'apport technique des membres du sous-comité du GITA composé de : K. Doe, R. Parker, R. Scroggins, G. Sergy et R. Watts, qui ont assumé la responsabilité des première et dernière révisions de la première édition du présent document de méthode d'essai. Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement et Changement climatique Canada. Les personnes suivantes, qui ont passé en revue la version définitive de la première édition du présent document, ont apporté des observations et des conseils à la fois nombreux et utiles : D. Vaughan (PE, Dartmouth, N.-É.); S. Wade (PE, Dartmouth, N.-É.); D. Moul (PE, North Vancouver, C.-B.); S. Yee (PE, North Vancouver, C.-B.); B. Hobden (MPO, Winnipeg, MB); M. Nassichuk (MPO, Vancouver, C.-B.); I. Birtwell (MPO, West Vancouver, C.-B.); G. van Aggelen (Ministère de l'Environnement et des Parcs de la C.-B., North Vancouver, C.-B.); G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton, ON) et P. Chapman (E.V.S. Consultants Ltd., North Vancouver, C.-B.).

La présente édition (la deuxième), préparée par Jennifer Miller (Miller Environmental Sciences) à titre de méthode de référence, remplace la première édition de cette méthode d'essai biologique. Leana Van der Vliet (Section de l'évaluation biologique et normalisation, Environnement et Changement climatique Canada), en sa qualité d'autorité scientifique du projet, a orienté les travaux, apporté une aide technique et offert un examen approfondi tout au long de sa réalisation. Les personnes suivantes ont apporté de nombreuses contributions à diverses sections du document : Leana Van der Vliet, Rick Scroggins et Lisa Taylor (Section de l'évaluation biologique et normalisation, Environnement et Changement climatique Canada). Les améliorations apportées à la deuxième édition de cette méthode ont été fondées sur les recherches menées par le Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique (LEEA) d'Environnement et Changement climatique Canada et Harris Industrial Testing Service Ltd. (HITS). Nous remercions sincèrement Paula Jackman (LEEA), Gary Harris (HITS) et Karen Marks (HITS) pour les efforts considérables qu'ils ont déployés lors de l'élaboration de la méthode et de l'examen du présent document relatif à une méthode d'essai.

Les études interlaboratoires visant à valider la méthode d'essai décrite dans le présent document ont été coordonnées par Paula Antunes (AquaTox Testing & Consulting Inc.) et réalisées par les laboratoires participants suivants : le Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique (LEEA) et le Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon (LEEPY) d'Environnement et Changement climatique Canada, AquaTox Testing & Consulting Inc. (AquaTox); Harris Industrial Testing Service Ltd. (HITS); Integrated Resource Consultants Inc. (IRC), Maxxam Analytics (Maxxam); Nautilus Environmental Company Inc. (Nautilus), CanmetMINES à Ressources naturelles Canada (CanmetMINES) et Petroforma Laboratories (Petroforma). Nous remercions sincèrement les participants aux études interlaboratoires suivants pour leurs contributions : Megan Bauer et Paula Jackman du LEEA, Craig Buday, Christie Laing et Grant Schroeder du LEEPY, Paula Antunes, Kim Dube, Shawna Kirkpatrick, Derek Kozakiewicz, Nancy Kreager, Jasmine Lauinger, Tim Lauinger, Lesley Novak, Martina Rendas, Frank Saliani et Adam Wartman d'AquaTox; Gary Harris, Amanda Huybers et Karen Marks de HITS, Wade Britz, Richard Chea, Melissa Hebert, Ditty Kakkassery et Catherine Wong d'IRC, Michael Brassil, Marriah Grey, Pam Howes et Donald Lai de Maxxam; Eric Cheung, Yvonne Lam et

Armando Tang de Nautilus, Morgan King, Carrie Rickwood et Emily Suominen de CanmetMINES et Jennifer Mews, Stephen Rossiter, Suzette Winter et Amanda Woodrow de Petroforma. Nous remercions également les membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (annexe B) pour leur soutien continu.

Nous tenons particulièrement à remercier Envirosphere Consultants Ltd. pour les précisions apportées sur les différences morphologiques entre les diverses formes d'épinoches et Patrick L. Stewart (Envirosphere Consultants Ltd.) ainsi que Christopher Kidd pour les photographies fournies, lesquelles sont toutes jointes à l'annexe D.

Ce projet a été cofinancé par la Division des mines et du traitement et la Section de l'évaluation biologique et normalisation d'Environnement et Changement climatique Canada.

Section 1

Introduction

La présente méthode de référence précise les modes opératoires et les conditions relatifs à un essai de létalité *aiguë* sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), tels qu'ils sont décrits par les gouvernements canadiens qui participent à la *surveillance* de la pollution et au contrôle des effluents industriels ou municipaux. Cette méthode d'essai est destinée à être utilisée avec des échantillons d'*effluents* dont la *salinité* est > 10 ‰ et qui sont rejetés directement dans des *eaux réceptrices estuariennes* ou *marines*. Le présent document remplace la première édition de la méthode d'essai biologique SPE 1/RM/10 (EC, 1990a) qui a été publiée en juillet 1990 puis modifiée en mars 2000. Cette méthode de référence est l'une des méthodes d'essai biologique à utiliser dans le cadre d'évaluations d'effluents aux fins de surveillance et de *conformité* en vertu du *Règlement sur les effluents des mines de métaux* promulgué aux termes de la *Loi sur les pêches* fédérale. Deux autres méthodes de référence, publiées par Environnement et Changement climatique Canada (2000a, 2000b et annexe A), sont utilisées pour évaluer les effluents contenant de l'eau douce ou dont la salinité est ≤ 10 ‰ et les effluents dont la salinité est > 10 ‰ et qui sont rejetés dans l'eau douce.

Des modes opératoires sont également fournis dans le présent document pour évaluer différents types de substances, comme les *produits chimiques*, les préparations ou les mélanges chimiques (voir la section 8) et ils pourraient être utilisés pour fournir des données concernant la gestion et la réglementation des pesticides ainsi qu'au sujet des produits chimiques préoccupants dans les sites contaminés. En outre, les résultats provenant d'essais portant sur les produits chimiques peuvent être intégrés aux lignes directrices nationales ou provinciales pour la qualité de l'environnement.

La présente méthode de référence s'appuie sur la méthode générique publiée par Environnement et Changement climatique Canada en 1990 et qui est constituée à partir des travaux de recherche en matière d'élaboration de méthodes menés par le Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique d'Environnement et Changement climatique Canada (données non publiées) et Harris Industrial Testing Services Ltd (HITS, 2017). Les modes opératoires et conditions précisés dans la présente méthode de référence doivent être considérés comme définitifs à des fins réglementaires.

Avant de compléter la présente méthode de référence, deux études interlaboratoires ont été effectuées pour évaluer la *précision* obtenue entre les laboratoires et valider la méthode d'essai (AquaTox, 2017). Le phénol (un *toxique de référence* courant) et le cadmium étaient les deux *toxiques* évalués. Les résultats de la première série d'essais de toxiques de référence ont produit un *coefficient de variation* (CV) de 19,6 %, une valeur se situant dans une plage de variabilité acceptable pour des essais interlaboratoires. La deuxième série d'essais, au cours de laquelle le cadmium a été mis à l'essai en tant que toxique de référence, a produit des résultats plus variables (AquaTox, 2017). Environnement et Changement climatique Canada (EC, 2005) suggère qu'un CV ≤ 30 % serait une plage de variabilité raisonnablement prévue dans le cadre d'essais de toxicité répétés avec un toxique de référence. Au titre du suivi des études interlaboratoires, un échantillon d'effluent a été divisé et mis à l'essai simultanément dans deux laboratoires, et les résultats concordaient (données non publiées).

L'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), un poisson *anadrome* et d'eau douce commun, est *euryhaline*, occupant principalement les zones peu profondes de milieux marins, estuariens et d'eau douce. Sa distribution étant presque circumpolaire dans les habitats côtiers, elle préfère les régions

tempérées et subarctiques de l'hémisphère nord. Elle est largement répandue dans l'hémisphère nord sur toutes les côtes, à l'exception du littoral le plus au nord des mers froides de l'Arctique.

L'épinoche à trois épines est présente sur la côte du Pacifique, de la Californie jusqu'au nord-ouest de l'Alaska et sur la côte de l'Atlantique, de la Nouvelle-Écosse jusqu'au Nordlabrador (Hart, 1973; Wootton, 1976; Scott et Scott, 1988). Depuis de nombreuses années, les chercheurs des laboratoires du gouvernement et du secteur privé au Canada utilisent l'espèce *G. aculeatus* pour évaluer les effets toxiques *aigus* des effluents déversés dans le milieu marin ou estuarien. Cette espèce de poisson est également recommandée l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA, 2002) et l'American Society for Testing and Materials (ASTM, 2014b) en tant qu'organisme convenant aux essais de toxicité marin ou estuarien. Elle a aussi gagné une popularité internationale en tant qu'espèce utilisée comme modèle pour les études sur l'écologie, l'évolution, la génomique, l'écotoxicologie et la perturbation endocrinienne (Katsiadaki, 2007; Katsiadaki *et al*., 2007; Barber et Nettleship, 2010).

Trois modes opératoires sont décrits dans le présent document relatif à la méthode d'essai. Un premier mode opératoire consiste en un essai à concentration unique d'effluent (non dilué, sauf indication contraire) ou en un produit chimique et une *eau témoin*, selon ce qui convient à un essai réussite-échec. Un deuxième mode opératoire consiste en un essai à concentrations multiples qui permet d'estimer la concentration *létale* médiane (*CL50*) (autrement dit, il permet de déterminer le degré de *toxicité* à l'aide de plusieurs concentrations d'effluent, y compris des concentrations non diluées ou à l'aide d'un produit chimique). Un troisième mode opératoire consiste en un essai à concentrations multiples mené à l'aide d'un *toxique de référence* pour évaluer la sensibilité du poisson d'essai à un *toxique étalon* et la *précision* des données produites par le laboratoire pour ce produit chimique. Des indications supplémentaires pour les essais sur des échantillons de substance chimique sont incluses (voir la section 8).

Cette méthode de référence doit être utilisée avec des effluents salins (> 10‰) déversés directement dans des *eaux de réception* estuariennes ou marines. La *salinité* des effluents doit être mesurée en fonction de la *conductivité* ou de la *réfractométrie* en utilisant une méthode et un instrument étalonné acceptables dont le seuil de tolérance pour l'*exactitude* correspond à ± 1‰, comme cela est décrit à la section 4.2.

Section 2

Organismes d'essai

2.1 Espèce et source

L'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) doit être utilisée comme l'espèce à l'étude dans la présente méthode de référence. Le poids humide moyen du poisson d'essai doit être compris entre 0,20 et 1,2 g, et la *longueur à la fourche* du plus gros poisson ne devrait pas excéder 1,6 fois celle du plus petit poisson au cours du même essai. Les poissons à un stade de vie juvénile ou adulte peuvent servir aux essais. Cependant, les mâles exhibant des couleurs nuptiales (généralement, des yeux bleus et/ou une gorge/un ventre rouge à l'avant) et les femelles gravides (abdomen gonflé) ne doivent pas être utilisés pour les essais.

Tous les poissons utilisés au cours d'un essai doivent provenir de la même population et source et ne doivent pas présenter des signes *évidents* de maladies ou de parasites (voir la note de bas de page 1). Les poissons doivent être élevés ou capturés dans les eaux côtières *marines* ou *estuariennes* et être par la suite acclimatés aux conditions de laboratoire. Les sennes de plage, les éperviers ou les nasses à vairon conviennent à la capture de ces poissons. L'espèce *G. aculeatus* issue de populations vivant dans l'eau douce ne doit pas être utilisée dans le présent essai.

L'entreprise suivante est une source commerciale de l'épinoche à trois épines marine ou estuarienne :

Seacology
3025, chemin Sunnyhurst
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7K 2G4
Tél. : 604-987-4675
Téléc. : 604-987-4675
Site Web : http://www3.telus.net/seacology/
Courriel : seacology@telus.net
Personne-ressource : Douglas Swanston

Pour obtenir des renseignements à jour sur les fournisseurs de l'espèce *G. aculeatus*, communiquez avec :

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario) K1A 0H3
Courriel : ec.methodes-methods.ec@canada.ca

Les autorités régionales, provinciales ou fédérales (comités fédéraux-provinciaux et comité des transferts) pourraient exiger une autorisation pour l'achat, l'expédition ou le transfert d'épinoches à trois épines. Pour obtenir de plus amples renseignements sur les exigences fédérales ou provinciales en matière de permis, communiquez avec les laboratoires d'essai environnemental régionaux d'Environnement et Changement climatique Canada (voir annexe C).

Chaque *lot* d'épinoches capturées dans les eaux de l'Atlantique doit être examiné avec soin pour enlever toute épinoche tachetée (*Gasterosteus wheatlandi*) qui pourrait avoir été capturée avec l'espèce *G. aculeatus* (voir l'annexe D) et pour veiller à ce que seule l'espèce *G. aculeatus* soit utilisée dans le cadre de cet essai. Chaque lot d'épinoches recueilli pour les essais devrait aussi être examiné pour s'assurer que seules les morphes avec une carène caudale (autrement dit, une carène caudale est présente chez les morphes entièrement ou partiellement caparaçonnées de plaques osseuses) sont utilisés dans cet essai et que celles dépourvues d'une carène caudale (autrement dit, une carène caudale est manquante chez les morphes caparaçonnées vers le bas de plaques osseuses) sont retirées du lot. Les descriptions taxonomiques et les illustrations des caractéristiques distinctives de l'épinoche à trois

épines et des diverses morphes se trouvent à l'annexe D.

Un taxonomiste qualifié doit procéder à l'identification taxonomique et à la documentation de l'espèce à laquelle appartiennent les organismes d'essai au moins une fois pour chaque site de collecte ou fournisseur d'épinoche à trois épines, en utilisant soit les caractéristiques taxonomiques distinctives qui sont décrites dans les clés taxonomiques, soit l'identification taxonomique fondée sur l'ADN (c.-à-d. les codes à barres). Lorsque les organismes sont achetés auprès d'un fournisseur commercial, ce dernier peut fournir une attestation de l'identification de l'espèce, de même que la référence taxonomique ou le nom du ou des taxonomistes consultés. Une fois l'identification taxonomique initiale obtenue (c.-à-d. fournie par un fournisseur donné, par un taxonomiste ou au moyen du code à barres), la confirmation de l'espèce à laquelle appartiennent les organismes d'essai de chaque envoi est requise et peut être effectuée par le fournisseur ou par le laboratoire d'essai à l'aide des caractéristiques taxonomiques et morphologiques distinctives décrites et illustrées dans l'annexe D. Les documents relatifs à chaque lot d'organismes d'essai doivent inclure, à tout le moins, le nombre et la provenance des organismes de chaque envoi, le nom du fournisseur ou du préposé au prélèvement, la date d'envoi, la date d'arrivée au laboratoire d'essai et l'état des organismes à l'arrivée (c.-à-d. la mortalité, la température, l'oxygène dissous, le *pH* et la salinité).

2.2 Maintien et acclimatation

Les épinoches à trois épines utilisées dans la présente méthode de référence ont été maintenues en laboratoire avec succès pendant de longues périodes (c.-à-d. de trois mois à un an), et les laboratoires signalent que le maintien et l'*acclimatation* ont entraîné très peu de mortalité (c.-à-d. un taux de mortalité hebdomadaire cumulatif < 2 %) chez ce poisson.

Les poissons devraient être gardés et acclimatés dans des réservoirs ou des bassins. Ceux-ci doivent être composés de matériaux non toxiques (p. ex. verre, acier inoxydable, porcelaine, polyester renforcé par de la fibre de verre, polyéthylène, acrylique ou polypropylène). Les bassins ou les réservoirs destinés au maintien et à l'acclimatation des poissons d'essai devraient être éloignés de toute perturbation physique et se trouver, de préférence, dans un endroit séparé des réservoirs d'essai.

Les réservoirs ou bassins de maintien (ou d'élevage) peuvent être à l'intérieur ou en plein air, tant qu'ils offrent les conditions requises et recommandées dans le présent document. Cependant, les réservoirs d'acclimatation des poissons aux conditions d'essai en laboratoire devraient se trouver à l'intérieur ou, s'ils sont en plein air, on devrait les doter de couvercles munis d'appareils d'éclairage à réglage *photopériodique*.

Après le transport des poissons vers les installations d'élevage ou d'acclimatation du laboratoire d'essai, ils doivent être exposés pendant au moins une semaine aux conditions précisées à la section 2.4. Cette période d'*acclimatation* doit immédiatement précéder leur utilisation dans un essai.

Les réservoirs devraient rester propres et, aussi souvent que nécessaire, il faudrait siphonner la nourriture excédentaire et les excréments. Les réservoirs dotés de colonnes d'alimentation doubles et centrales assurent un autonettoyage partiel et ont été utilisés avec succès dans les laboratoires canadiens. Les réservoirs devraient être désinfectés et rincés à fond avec de l'eau servant au maintien ou à l'acclimatation des poissons avant d'y introduire un nouveau lot de poissons. Les désinfectants renfermant des composés chlorés ou iodophores, ou encore du chlorure de n-alkyl diméthyl benzyl ammonium ou un détergent biodégradable, devraient être utilisés.

On peut suspendre l'alimentation pendant 24 heures immédiatement après la réception de poissons. Il se peut que les poissons ne se nourrissent pas pendant qu'ils se rétablissent du stress causé par le transport, et l'ajout d'aliments

non consommés pourrait entraîner la détérioration de la qualité de l'eau. Ils devraient être nourris une ou plusieurs fois par jour à l'aide de vers de vase ou d'artémies (fraîches ou congelées), une ration quotidienne (en poids de nourriture sèche) correspondant à environ 1 à 5 % du poids frais, en fonction de la température, de la taille du poisson et du taux de consommation. On peut aussi leur donner une ration équivalente à celle décrite ci-dessus, composée de vers de vase et/ou d'artémies lyophilisés ou encore d'aliments pour poissons du commerce (standard) reconnus ou d'aliments pour poissons tropicaux. La taille et le type de granulés devraient être choisis en tenant compte de la taille et de l'âge des poissons, de la température de l'eau et des recommandations du fabricant. La méthode et la durée maximale de stockage de la nourriture devraient aussi être conformes aux recommandations du fabricant.

Les poissons devraient être inspectés chaque jour afin de détecter des signes de maladies ou des parasites.[1] Les individus morts ou moribonds devraient être enlevés immédiatement après l'inspection quotidienne. Les poissons présentant des signes évidents de maladies ou des parasites (p. ex. tumeurs), ainsi que les mâles exhibant des couleurs nuptiales (généralement, des yeux bleus et/ou une gorge/un ventre rouge à l'avant) et les femelles gravides (abdomen gonflé) devraient aussi être enlevés des réservoirs de maintien et d'acclimatation s'ils sont observés. La mortalité dans les réservoirs de maintien et d'acclimatation dont proviennent les poissons d'essai devrait être surveillée et enregistrée chaque jour, à raison d'au moins cinq jours par semaine. Le taux de mortalité cumulé des poissons durant les sept jours précédant le jour où l'*essai de toxicité* débute doit être < 2 %. Si le taux de mortalité cumulé des poissons durant cette période est compris entre 2 et 10 %, l'acclimatation doit être prolongée pendant au moins sept jours supplémentaires, jusqu'à l'atteinte d'un taux de mortalité cumulé sur sept jours < 2 % précédant le jour du début l'essai de toxicité. Un taux de mortalité cumulé > 10 % par semaine, durant une période donnée de sept jours, rend l'utilisation future du lot de poissons inacceptable si des décès sont causés par des maladies ou des contaminants aquatiques. Si des décès résultent d'autres facteurs (p. ex. taux de mortalité initiaux élevés après le transfert de poissons), les poissons pourraient être utilisés pour des essais de toxicité futurs, à condition que les taux de mortalité dans les réservoirs d'acclimatation d'où proviennent les poissons diminuent pour atteindre < 2 % pendant les sept jours précédant le jour du début de l'essai.

Le traitement chimique des poissons malades devrait être évité. Si l'utilisation de poissons ayant subi un traitement chimique ne peut pas être évitée, il faut attendre au moins deux semaines après leur traitement avant de les utiliser à des fins d'essais. L'essai à l'aide d'un *toxique de référence* (voir la section 7) permet de déterminer si l'utilisation des poissons convient à des essais de toxicité.

2.3 Eau

L'eau utilisée pour le maintien et l'acclimatation des poissons peut être une *eau de mer* naturelle ou une *eau de mer* « *reconstituée* » (aussi appelée *eau de mer artificielle*) non contaminée dont la salinité souhaitée est ajustée par l'ajout de sels de mer secs du commerce. Si de l'eau de mer naturelle doit être utilisée pour le maintien ou l'acclimatation, elle peut être filtrée (pour enlever les particules et

[1] Les symptômes de problèmes de santé chez les poissons comprennent la perte d'appétit, une distribution anormale dans le réservoir, la léthargie, un comportement de nage irrégulier ou atypique, une coloration foncée, des branchies pâles, des nageoires rongées ou effilochées et des lésions externes. Les parasites et maladies ne sont pas rares chez les populations d'épinoches recueillies dans leur milieu naturel. L'une des infections les plus évidentes et les plus couramment observées est celle causée par le parasite microsporidien du genre *Glugea*. Les parasites microsporidiens sont transmis aux poissons hôtes lorsque ceux-ci ingèrent des invertébrés aquatiques infectés ou des spores libres dans la colonne d'eau. Une fois ingéré, le parasite *Glugea* envahit les cellules de l'hôte en produisant des tumeurs qui sont visibles à l'extérieur sous la forme de kystes blancs sur la peau, la bouche et les opercules. Les spores sont libérées après la rupture de ces tumeurs. L'hôte subit des coûts métaboliques associés au parasitisme du genre *Glugea* (Ward *et al*., 2005).

les organismes indigènes) et aérée, au besoin. Si de l'eau de mer artificielle doit être utilisée pour maintenir et acclimater les poissons, il faut la maintenir à la salinité souhaitée par l'ajout de sels de mer secs du commerce à une quantité appropriée d'eau douce et en mélangeant soigneusement pendant l'ajout des sels. L'eau de mer artificielle préparée par l'ajout direct de sels secs doit être aérée continuellement et vigoureusement pendant au moins 12 heures avant d'être utilisée, bien que des périodes d'aération plus longues soient recommandées (≥ trois jours). L'eau artificielle peut être filtrée après la période d'aération de 12 heures et/ou avant son utilisation pour enlever tout sel de mer non dissous. Il faudrait s'assurer au préalable que les sels de mer du commerce utilisés pour préparer l'eau de mer artificielle assureront un taux de survie adéquat et le maintien en santé des épinoches à trois épines (p. ex. Instant Ocean®, H2Ocean Pro+, OmegaSea® Premium Marine Salt). Un *lot* donné d'eau de mer naturelle peut être stocké jusqu'à quatre mois, alors que l'eau de mer artificielle peut être conservée jusqu'à deux semaines dans des réservoirs recouverts, à l'abri de la lumière. La qualité de la composition chimique de l'eau de mer artificielle ou naturelle utilisée en laboratoire devrait être surveillée et évaluée aussi souvent que nécessaire afin de documenter la qualité et les variations, notamment en ce qui concerne la salinité, le pH, l'oxygène dissous (OD) et le chlore résiduel total (si l'eau potable municipale est utilisée comme une source d'eau de mer artificielle). Les mesures de la salinité doivent être effectuées à l'aide d'un conductimètre ou d'un réfractomètre, comme cela est décrit à la section 4.2.

En outre, et s'il y a lieu, les matières solides en suspension, le carbone organique total, l'ammoniac, les métaux et les pesticides devraient être surveillés. L'alcalinité et le total des gaz dissous peuvent également être surveillés. Toute sursaturation en gaz devrait être corrigée (voir la section 2.4.3 dans EC, 1990b).

Pour préparer de l'eau de mer artificielle, on peut se servir d'*eau désionisée*, d'*eau distillée*, d'eau de surface ou d'eau souterraine non contaminée ou encore d'eau potable municipale déchlorée. Si de l'*eau déchlorée* est utilisée, elle doit être dépourvue de toute concentration nocive de chlore et de composés chlorés au moment d'y exposer les poissons (voir la section 2.4.3 dans EC, 1990b). Il a été démontré qu'une valeur de chlore résiduel total facilement mesurable de 20 µg/L n'avait pas d'incidence sur la survie des épinoches (données non publiées).[2]

Il faudrait renouveler continuellement (à l'aide d'un système à *renouvellement continu*), périodiquement (à l'aide d'un système à *renouvellement périodique*) ou faire recirculer (à l'aide d'une biofiltration) l'eau contenue dans les réservoirs de maintien des poissons afin de prévenir l'accumulation de déchets métaboliques. Les densités de maintien pour les systèmes à renouvellement périodique, de recirculation ou à faible débit avec une filtration devraient être ≤ 0,5 g poisson/L d'eau et ≤ 0,9 g poisson/L d'eau. Des densités de poisson plus élevées peuvent être maintenues dans des conditions de renouvellement continu. Il faudrait utiliser un filtre bactérien adapté pour l'élimination des déchets métaboliques dans le cas de systèmes de maintien ou d'acclimatation dans lesquels de l'eau est recirculée. L'eau recyclée devrait être filtrée pour en retirer les déchets solides. Il est possible d'ajouter au filtre de l'adsorbant Bio-Beads et du charbon (ou l'équivalent) afin de contrôler les concentrations d'ammoniac et d'enlever d'autres contaminants possibles dans l'eau. L'eau dans les réservoirs de maintien ou d'acclimatation devrait être siphonnée et remplacée par de l'eau propre au

[2] La valeur recommandée pour le chlore résiduel total nécessaire à la protection de la vie marine est ≤ 0,5 µg/L (CCME, 1999). Les valeurs > 0,5 µg/L pourraient entraîner une interaction entre la toxicité du chlore ou des chloramines et les contaminants à l'essai. La limite de détection pour la technique analytique servant à mesurer le chlore ou les chloramines résiduels dans l'eau déchlorée traitée devrait être, dans l'idéal, suffisamment faible pour s'assurer que le chlore résiduel est ≤ 0,5 µg/L. Cependant, cela pourrait s'avérer être irréaliste pour les méthodes utilisées dans le laboratoire effectuant des mesures régulières. L'utilisation d'un équipement qui peut, dans un laboratoire particulier, mesurer jusqu'à la limite de détection de 20 µg/L est acceptable.

besoin pour enlever les excréments et les débris et/ou pour maintenir la qualité de l'eau (p. ex. pour maintenir le pH et gérer les concentrations d'ammoniac). En cas de réutilisation de l'eau, l'ammoniac devrait être mesuré fréquemment pour s'assurer qu'il n'atteint pas des concentrations nocives. Une *surveillance* et un remplacement de l'eau plus fréquents pourraient s'avérer nécessaires lorsque les aquariums sont établis pour la première fois (c.-à-d. le premier mois), avant la stabilisation du système de biofiltration. La valeur cible recommandée dans le présent document pour le maintien et l'élevage des épinoches à trois épines est ≤ 2 mg/L d'ammoniac total. Un remplacement de l'eau plus fréquent pourrait s'avérer nécessaire, à raison de trois fois par semaine, pour éviter des problèmes liés à la qualité de l'eau si le renouvellement périodique est privilégié (c.-à-d. l'absence de filtre et le maintien de la qualité de l'eau par simple remplacement de l'eau). Dans le cas d'un système à renouvellement continu, sans recirculation, l'écoulement de l'eau fraîche (nouvelle) dans les réservoirs utilisés pour le maintien et l'acclimatation des poissons doit être adéquat pour maintenir la santé des poissons (p. ex. ≥ 2 L/min).

Au moins dix poissons devraient être pesés à des intervalles réguliers pour déterminer ou ajuster les rations alimentaires et pour s'assurer que les exigences en matière de densité de maintien (c.-à-d. ≤ 0,9 g poisson/L d'eau pour les systèmes à renouvellement périodique, de recirculation et à faible débit) sont satisfaites. Pour ce faire, il suffit d'enlever au hasard des poissons de chaque réservoir de maintien ou d'acclimatation ou en se servant des mesures de poids des poissons témoins déterminés à la fin de chaque essai. Le poids humide moyen de chaque poisson devrait être déterminé et consigné pour chacun de ces échantillons. Ces mesures peuvent aussi servir de guides au moment de déterminer le volume d'effluent requis pour un essai et pour s'assurer que la taille requise des poissons (0,20 à 1,2 g) et la densité de chargement maximale (0,5 g poisson/L solution dans chaque récipient d'essai) pendant l'essai de toxicité (voir la section 4.2) ne seront pas dépassées.

2.4 Conditions physico-chimiques

2.4.1 Température

Au cours de la période de maintien précédant l'acclimatation aux conditions d'essai, les poissons peuvent être maintenus à l'intérieur de la plage de températures indiquée précédemment comme étant convenable pour l'espèce (c.-à-d. de 8 à 17 °C). Les poissons doivent être acclimatés pendant au moins une semaine à 15 ± 2 °C avant d'être utilisés dans un essai. Le rythme de changement de température recommandé est ≤ 5 °C/jour.

2.4.2 Salinité

Pour être utilisés dans l'essai, les poissons doivent être acclimatés pendant au moins une semaine à une salinité correspondant à 5 g/kg de ce qui est utilisé pour l'*eau témoin/de dilution*. Le rythme de changement de salinité recommandé est ≤ 5 g/kg par jour. Un deuxième témoin (*témoin de la salinité*) doit être inclus dans l'essai si la salinité de l'échantillon d'effluent (ou la concentration d'essai la plus élevée pour les essais de produits chimiques, voir la section 8) est plus de 5 g/kg supérieure ou inférieure à la salinité à laquelle les poissons ont été acclimatés (voir la section 4.2).

2.4.3 Oxygène dissous et pH

La teneur en oxygène dissous de l'eau des réservoirs de maintien devrait être maintenue entre 80 % et 100 % de saturation. Au besoin, il faudrait assurer une aération complémentaire des réservoirs au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile.

Le *pH* de l'eau utilisé pour le maintien des épinoches à trois épines devrait être compris entre 7,0 et 8,5.

2.4.4 Éclairage

L'éclairage devrait être à spectre continu, avec une intensité de 100 à 500 *lux* à la surface de l'eau. Pendant au moins une semaine avant un essai, la *photopériode* doit consister en une séquence constante de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité, de préférence avec une période

de transition de 15 à 30 minutes (voir la note de bas de page à la section 2.4.2 d'EC, 1990b).

2.4.5 Surveillance

La température de l'eau, l'oxygène dissous, la salinité, le pH, le débit de l'eau (le cas échéant), l'ammoniac et la mortalité des poissons doivent être surveillés pour chaque réservoir de maintien et d'acclimatation, à des intervalles réguliers.

Section 3

Installations

Le degré de danger posé par les échantillons qui doivent servir à l'essai et le risque de contamination des échantillons et de l'appareillage commanderaient l'emploi d'installations particulières. L'essai doit être effectué dans une installation qui est isolée des perturbations en laboratoire, dans une pièce séparée ou encore dans une section close ou fermée par des rideaux. La zone devrait être bien ventilée et être exempte des facteurs physiques de dérangement ou des contaminants atmosphériques qui pourraient nuire aux organismes d'essai. La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum. Les installations d'essai devraient également être isolées de l'atelier de préparation des solutions d'essai et être éloignées de la laverie. Le contrôle de la température d'essai (15 ± 1 °C) peut être réalisé au moyen de la climatisation avec régulation thermostatique ou de l'immersion de récipients d'essai dans des bains d'eau régulés.

Les fournitures, l'équipement et les récipients d'essai entrant en contact avec les *solutions mères* ou d'essai ou l'eau témoin/de dilution ne doivent pas renfermer de substances qui peuvent être lixiviées ou dissoutes en quantités nuisibles aux organismes d'essai. On devrait les choisir soigneusement de façon à réduire au minimum la sorption des matières présentes dans l'eau.

Les récipients d'essai doivent être en verre, en Plexiglas^{MC}, en acrylique, en polypropylène, en polyéthylène ou être revêtus de polyéthylène de haute qualité (non toxique). Si des revêtements sont utilisés, ils doivent être jetés à la fin de l'essai. Il est recommandé de recouvrir lâchement les récipients d'essai de tamis propres et non toxiques, de sacs doublures en polyéthylène ou de verre au besoin pour empêcher les poissons de s'échapper. Tous les contenants (c.-à-d. type, taille et forme) servant de récipients d'essai doivent être identiques, et la profondeur minimale de l'eau doit être 15 cm et identique pour chaque solution d'essai. L'équipement doit être soigneusement nettoyé et rincé, conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Le laboratoire doit être doté des instruments nécessaires pour mesurer les variables fondamentales de la qualité de l'eau (température, salinité, oxygène dissous et pH), et doit être prêt à analyser rapidement et précisément d'autres variables, comme la teneur en ammoniac.

L'*eau témoin/de dilution* devrait être du type décrit aux sections 2.3 et 4.3 et elle devrait, de préférence, être identique à celle utilisée pour le maintien et/ou l'acclimatation des poissons.

Section 4

Modes opératoires généraux pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents

4.1 Étiquetage, transport et entreposage des échantillons

Les exigences en matière de volume d'échantillons dépendent de la taille et du nombre de poissons par solution d'essai, des exigences en matière de densité de chargement, des concentrations d'essai et de l'utilisation de *répétitions*. Dans le cas des essais à concentration unique, il faut normalement des volumes d'échantillons de 20 à 40 L ou plus. Dans le cas des essais visant à déterminer une CL50, il faut normalement des volumes d'essai de 40 à 80 L ou plus.

Les contenants utilisés pour le transport et l'entreposage des échantillons doivent être composés de matériaux non toxiques (p. ex. bonbonnes ou seaux en polyéthylène ou polypropylène). Les contenants doivent être neufs ou nettoyés et rincés à fond avec de l'eau propre, puis rincés par la suite avec l'échantillon à prélever. Chaque récipient devrait être rempli entièrement de l'échantillon, afin d'en exclure l'air. Immédiatement après l'avoir rempli, chaque contenant d'échantillons doit être scellé (p. ex. à l'aide d'un couvercle-pression si le contenant d'échantillons est un seau) et étiqueté ou codé. L'étiquetage et les enregistrements connexes qui accompagnent cette opération doivent comprendre au moins un code que l'on peut utiliser pour identifier l'échantillon ou le sous-échantillon. L'étiquetage ou un registre à renvois croisés, qui pourrait ou pourrait ne pas accompagner le ou les échantillons, doit inclure au moins le type d'échantillon, sa source, la méthode d'échantillonnage, la date et l'heure du prélèvement et le nom des préposés au prélèvement.

Les échantillons ne doivent pas geler au cours du transport ou de l'entreposage. Durant le transport, il faut maintenir les échantillons dans l'obscurité, à une température comprise entre 1 et 8 °C si le délai de transport est supérieur à deux jours ou lorsque la température ambiante est extrême (c.-à-d. > 30 °C ou < 1 °C). À l'arrivée au laboratoire, il faut mesurer et enregistrer la date et l'heure de réception ainsi que la température de l'effluent dans chaque contenant d'échantillons. Chaque échantillon à utiliser dans l'*essai de toxicité* doit être ajusté à 15 ± 1 °C avant le début de l'essai de toxicité.

Pour permettre à l'essai de toxicité de commencer le jour où l'échantillon est reçu au laboratoire, l'ajustement de la température des échantillons d'effluent peut être effectué rapidement (voir la section 4.3). Par ailleurs, le laboratoire peut choisir d'entreposer les échantillons dans l'obscurité, à 4 ± 2 °C pendant une courte période (p. ex. durant la fin de semaine, si les échantillons sont arrivés un vendredi après-midi), à condition que l'essai commence dans le délai imparti indiqué à la page suivante. Lorsque cette option est choisie, les échantillons doivent être entreposés dans des contenants pleins et scellés qui sont conservés dans l'obscurité, à l'intérieur d'une installation réfrigérée. Une troisième option consiste à conserver les échantillons durant la nuit dans une installation ajustée à la température d'essai (c.-à-d. 15 ± 1 °C), auquel cas l'essai doit débuter le jour suivant. Si un échantillon est réchauffé ou refroidi à 15 ± 1 °C durant la nuit, il doit être conservé dans un ou plusieurs contenants pleins et scellés au cours de cette période.

La mise à l'essai des échantillons devrait commencer dès que possible après le prélèvement. L'essai devrait commencer dans les trois jours qui suivent et ne doit pas débuter plus de cinq jours après l'achèvement de l'échantillonnage.

Les récipients contenant les échantillons doivent être agités vigoureusement (c.-à-d. pour assurer la remise en suspension des matières solides décantables) juste avant de verser les aliquotes pour préparer les solutions. Les échantillons d'effluent ne doivent pas être filtrés avant d'être mis à l'essai ni agités durant l'essai (outre l'aération requise telle que décrite dans le présent document). S'il existe des préoccupations quant à la contribution des concentrations élevées de

matières solides décantables ou en suspension dans les échantillons d'essai à la toxicité des échantillons, des essais supplémentaires (effectués à l'aide d'une filtration ou par le maintien des solides dans un état de suspension durant l'exposition) sont décrits ailleurs (voir la section 6.4 dans EC, 1990b). Les sous-échantillons (c.-à-d. aliquotes d'un échantillon réparti entre deux contenants ou plus) doivent être combinés avant la préparation de la solution.

4.2 Conditions d'essai

Il s'agit d'un essai *statique* d'une durée de 96 heures (autrement dit, les solutions ne sont pas remplacées durant l'essai). Le chargement de poissons dans chaque récipient d'essai ne doit pas dépasser une densité de 0,5 g poisson/L; le respect de cette exigence est fondé sur le poids humide moyen des poissons témoins à la fin de l'essai (section 4.5). Les poissons ne doivent pas être nourris pendant l'essai, ni durant la période de 16 heures qui le précède. L'essai n'est pas valable si > 10 % des poissons témoins meurent et/ou s'ils ont un comportement atypique ou stressé (section 4.6).

L'essai doit être mené à 15 ± 1 °C (comme cela est mesuré dans la solution d'essai). Toutes les solutions, y compris les solutions témoins, doivent être aérées tout au long de l'essai à un rythme contrôlé de 6,5 ± 1 mL/min · L. L'éclairage doit être le même que celui défini pour l'acclimatation (voir la section 2.4.4). La photopériode (cycle clarté/obscurité de 16 ± 1 h/8 ± 1 h) doit coïncider avec le moment qui prédominait pendant l'acclimatation.

L'essai doit être mené sans ajuster le pH de l'échantillon ou de la solution d'essai. Si, toutefois, on souhaite comprendre dans quelle mesure les valeurs extrêmes du pH de la solution ou de l'échantillon (p. ex. à l'extérieur de la plage de 6,5 à 8,5) [3] pourraient contribuer à une létalité aiguë, un essai parallèle (pH ajusté) pourrait être exécuté. Si des essais avec un pH ajusté et non ajusté sont exécutés, les résultats définitifs doivent être ceux provenant de l'essai avec un pH non ajusté. La justification et les détails sur les procédures d'ajustement du pH sont fournis ailleurs (voir la section 4.3.2 dans EC, 1990b). L'ajustement du pH est aussi l'une des nombreuses techniques d'« *Évaluation d'identification de la toxicité* » permettant de caractériser la cause de la toxicité d'un échantillon (USEPA, 1991, 1996).

Cette méthode de référence convient aux effluents dont les valeurs de salinité sont supérieures à 10 parties par millier (salinité) (‰). La salinité de l'effluent doit être mesurée avant le début des essais. Il existe deux méthodes acceptables pour mesurer la salinité : la *conductivité* et la *réfractométrie*. Une approche fondée sur le rendement est utilisée pour confirmer la pertinence ou l'acceptabilité de la méthode et des instruments.

Si la conductivité est privilégiée, une méthode et un instrument acceptables (p. ex. pH-mètre Fisher Accumet^{MC} AR50, cellule de conductivité Fisher Accumet^{MC} 13-620-162 10,0 cm^{-1} ou modèles équivalents plus récents) doivent :

i) être étalonnés chaque jour lorsqu'ils sont utilisés avec un étalon de conductivité certifié;

ii) être vérifiés pour mesurer de façon précise la salinité de l'eau de mer à l'aide d'un étalon d'eau de mer certifié (p. ex. ceux offerts par Ocean Scientific International Ltd); le seuil de tolérance pour l'exactitude correspond à une partie par millier.

La *vérification* de l'*exactitude* devrait être effectuée après l'*étalonnage*. Un étalon de conductivité proche de la conductivité de l'échantillon d'effluent est recommandé. Une cellule de conductivité avec une constante de cellule convenant à une utilisation dans des solutions à force ionique élevée est recommandée. Les mesures de la conductivité sont sensibles à la température, et la conductivité signalée doit tenir compte de la température. Pour y arriver, on peut utiliser la fonction de compensation automatique de température disponible sur certains instruments. Il existe aussi des instruments qui

[3] Le pH de l'eau de mer naturelle non contaminée se situe normalement entre 7,5 à 8,5. Les solutions à base d'eau de mer dont le pH se situe en dehors de la plage de 6,5 à 8,5 ne sont pas représentatives d'un milieu estuarien ou marin. Dans ce contexte, de telles valeurs de pH sont considérées comme atypiques (sur le plan environnemental).

convertissent automatiquement la conductivité en salinité, alors que d'autres fournissent uniquement des relevés de conductivité, ce qui nécessite l'utilisation d'un tableau de conversion pour déterminer la salinité. Les méthodes de conversion qui utilisent les formules décrites dans les Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA *et al*., 2012) sont recommandées.[4] La conversion automatique à l'aide d'instruments et l'utilisation de tableaux de conversion en ligne sont toutes deux acceptables, pourvu que les critères de rendement soient respectés.

Si l'on a recours à la réfractométrie, une méthode et un instrument acceptables (p. ex. réfractomètre de salinité Reichert® Goldberg) doivent :

i) être étalonnés chaque jour lorsqu'ils sont utilisés avec de l'eau purifiée à 0 %;

ii) être vérifiés pour mesurer de façon précise la salinité de l'eau de mer à l'aide d'un étalon d'eau de mer certifié (p. ex. ceux offerts par Ocean Scientific International Ltd); le seuil de tolérance pour l'exactitude correspond à une partie par millier.

La vérification de l'exactitude devrait être effectuée après l'étalonnage. L'eau désionisée et l'eau obtenue par osmose inverse sont des exemples d'eau purifiée convenable.

Les instruments pour mesurer la salinité, au moyen de la conductivité ou de la réfractométrie, doivent être utilisés (p. ex. la compensation de température est nécessaire avec la conductivité) et entretenus adéquatement, comme l'exigent les programmes d'accréditation. Les instruments doivent être étalonnés et vérifiés régulièrement.

Les méthodes acceptables pour mesurer la salinité reposent sur des propriétés physiques (conductance électrique et capacité à réfracter la lumière) qui sont étroitement liées à la salinité. Ces méthodes ne permettent pas de déterminer les ions qui contribuent à la conductance ou à la réfraction. Par conséquent, ces méthodes ne peuvent pas faire la distinction entre un effluent dominé par des ions sodium et chlorure et un effluent dominé par des niveaux élevés de matières dissoutes totales qui pourrait avoir une composition ionique différente. Une recherche analytique plus poussée de la composition ionique de l'effluent est recommandée si l'on soupçonne que l'échantillon d'effluent comporte des niveaux élevés de matières dissoutes totales.

Les essais de toxicité doivent être effectués sans ajuster la salinité des échantillons d'essai. Si la salinité de l'échantillon est de plus de 5 ‰ supérieure ou inférieure à la salinité à laquelle les poissons sont acclimatés, un deuxième témoin (*témoin de la salinité*) dont la salinité est ajustée à celle de l'échantillon (écart maximal de 1 g/kg) doit être inclus dans l'essai. Ce témoin de la salinité doit être préparé tel qu'il est décrit pour l'eau témoin/de dilution (voir les sections 2.3 et 4.3). Le témoin de la salinité doit être > 10 ‰ (en deçà de cette valeur, cette méthode d'essai n'est pas applicable) et ≤ 35 ‰ (la limite supérieure de la salinité dans l'*eau de mer* naturelle), même si la salinité de l'échantillon n'est pas comprise à l'intérieur de cette plage (c.-à-d. > 35 ‰). Lorsqu'un essai à concentrations multiples est exécuté, l'eau qui sert d'*eau de dilution* (généralement l'eau de maintien et d'acclimatation) doit aussi être utilisée comme le témoin de l'eau de dilution. Lorsqu'une meilleure compréhension de la contribution de la salinité à la *toxicité* de l'échantillon est souhaitée, l'eau utilisée comme témoin de la salinité (c.-à-d. ajustée à la salinité de l'échantillon d'essai) peut servir d'eau de dilution dans un deuxième essai parallèle à concentrations multiples. Les résultats pour chaque série de témoins utilisée dans un essai de toxicité (c.-à-d. témoins de l'eau de dilution et de la salinité) doivent être examinés afin de déterminer s'ils satisfont de manière indépendante aux critères propres aux essais de validité de l'essai (section 4.6). Dans les cas où deux séries de témoins sont utilisées, les résultats relatifs à l'essai de toxicité sont jugés valides et acceptables uniquement si chaque série de solutions témoins satisfait de manière indépendante aux exigences de validité respectives.

[4] Plusieurs calculateurs de conversion en ligne sont disponibles, notamment : www.chemiasoft.com/chemd/salinity_calculator.

4.3 Préparation des solutions d'essai

Les mesures du pH, de la température, de l'oxygène dissous et de la salinité doivent être réalisées dans l'effluent non ajusté et non dilué, juste avant la préparation des solutions d'essai. L'ajustement de l'échantillon d'effluent et de l'eau témoin/de dilution à 15 ± 1 °C doit être effectué si la température se situe en dehors de cette plage. Pour y parvenir, il suffit d'utiliser différentes températures ambiantes, au besoin, pour le refroidissement ou le réchauffement. L'échantillon peut aussi être refroidi en utilisant un bain d'eau froide ou un refroidisseur à immersion fait d'un matériau non toxique (p. ex. acier inoxydable) ou il peut être réchauffé en utilisant un bain d'eau chaude. Les échantillons ou les solutions d'essai ne doivent pas être réchauffés au moyen de thermoplongeurs ou de micro-ondes.

Pour un essai donné, la même eau doit être utilisée pour préparer les témoins et toutes les concentrations d'essai de moins de 100 %. Il s'agit presque toujours de la même eau que celle utilisée pour l'acclimatation. Si la température de cette eau est ajustée à la hausse, une sursaturation en gaz doit être évitée. L'eau doit avoir une teneur en oxygène de 90 à 100 % de saturation en air, obtenue au besoin par une aération vigoureuse au moyen d'air comprimé exempt d'huile passant par des pierres de barbotage propres. Les pierres de barbotage dont l'emploi est acceptable sont les suivantes :

i) Pierres de barbotage Marina®, 2,5 cm de longueur × 1,5 cm de diamètre, cylindriques (usage unique);

ii) AS1, en verre de silice, 3,8 cm de longueur × 1,3 cm de largeur, rectangulaires (réutilisables après un nettoyage adéquat; tel qu'il est décrit à la section 4.3.1 d'EC, 1990b);

iii) autres pierres de barbotage pour lesquelles il a été démontré qu'elles avaient un rendement équivalent à celui des pierres de barbotage Marina® ou AS1.[5]

Si de l'*eau de mer artificielle* doit être utilisée en tant qu'eau témoin/de dilution, elle doit être préparée tel qu'il est décrit à la section 2.3. Les récipients d'essai devraient être rincés avec de l'eau témoin/de dilution juste avant leur utilisation, bien que cela puisse ne pas être nécessaire si des revêtements en polyéthylène sont utilisés. On doit préparer un volume identique de chaque solution d'essai, laquelle doit être bien mélangée avec une baguette de verre, un agitateur en téflon[MC] ou un autre dispositif fait d'un matériau non toxique juste avant son utilisation. Tous les récipients d'essai, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et seaux servant au transfert des poissons doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément aux procédures d'opérations normalisées (PON).

La profondeur de la solution dans chaque récipient d'essai doit être d'au moins 15 cm. Au moment de la préparation des solutions d'essai comprenant les témoins, chacune d'elles doit être aérée pendant 30 minutes à 6,5 ± 1 mL/min · L. Par la suite, la concentration de l'oxygène dissous doit être mesurée dans au moins la concentration d'essai la plus élevée (normalement une concentration de 100 % de l'effluent). Si (et uniquement si) l'oxygène dissous dans la concentration d'essai la plus élevée correspondant à < 70 % ou à > 100 % de la valeur de saturation en air, il faut alors poursuivre la préaération (c.-à-d. avant l'exposition des poissons) de toutes les solutions, y

[5] On peut se procurer les pierres de barbotage Marina® (Hagen®) auprès d'un grand nombre de fournisseurs locaux et de Rolf C. Hagen Inc. (1-800-554-2436). Pour une description complète de ces pierres de barbotage, consulter le site www.hagen.com et rechercher les produits A960, A961 ou A962. Les pierres de barbotage en verre de silice, modèle AS1 (diffuseurs d'air Sweetwater®), sont disponibles directement auprès de Pentair Aquatic Eco-Systems®, Nanaimo (C.-B.) (1-866-714-0141 ou www.pentairaes.com), de Dynamic Aqua Supply, Surrey (C.-B.) (1-604-543-7504 ou www.dynamicaqua.com), de Valox Ltd, Fredericton (N.-B.) (1-800-825-6997 ou www.valoxltd.com) et de Fish Farm Supply, Elmira (ON) (1-877-669-1096 ou www.fishfarmsupply.ca). D'autres marques sont acceptables, à condition qu'elles aient à peu près la même taille que les pierres de barbotage Marina® et AS1, qu'elles produisent une qualité d'aération équivalente et que le laboratoire se soit assuré qu'elles conviennent pour remplacer les pierres de barbotage Marina® et AS1.

compris les solutions témoins, à 6,5 ± 1 mL/min · L. Cette période de préaréation doit être limitée à 90 minutes supplémentaires et cesser dès que l'on a obtenu 70 % de saturation dans la concentration d'essai la plus élevée (ou 100 % de saturation si une sursaturation est évidente). Immédiatement après, les poissons doivent être placés dans chaque solution d'essai, et l'essai doit être mis en route, peu importe si l'on a obtenu 70 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai. L'aération des solutions d'essai doit être assurée par des bulles d'air comprimé passant par des pierres de barbotage propres, comme cela a été décrit précédemment. L'aération de chaque solution d'essai à un rythme de 6,5 ± 1 mL/min · L doit être poursuivie tout au long de l'essai. La justification du recours à la préaréation et à l'aération dans les essais sur les poissons est fournie ailleurs (voir la section 4.3.1 et la note de bas de page « n » dans EC, 1990b).

4.4 Début de l'essai

Une ou plusieurs solutions *témoins* de l'eau de dilution doivent être préparées et incluses pour chaque essai mené sur chaque échantillon. L'utilisation répétée d'une solution témoin et de ses poissons pour plus d'un essai de toxicité et/ou plus d'un échantillon d'effluent est inacceptable.

Chaque récipient d'essai doit être clairement codé ou étiqueté pour indiquer la concentration, la date et l'heure de mise en route de l'essai. Les récipients devraient être placés de sorte qu'il soit facile d'observer les poissons. Si un essai à concentrations multiples est effectué (section 6), les concentrations doivent être disposées de façon aléatoire.

Les poissons sains, qui ont été acclimatés pendant au moins une semaine à la température, à la salinité et aux conditions d'éclairage utilisées pour l'essai (voir la section 2), doivent être prélevés de façon aléatoire dans les réservoirs d'acclimatation aux fins d'utilisation dans l'essai. Les procédures de manipulation et de transfert devraient réduire au minimum le stress. Tout poisson blessé ou lâché par mégarde pendant le transfert doit être éliminé. Si les épuisettes entrent en contact avec une solution d'essai, elles devraient être rincées (avec de l'eau de dilution) entre les transferts. L'eau de mer des seaux de transfert des poissons devrait être aérée au besoin afin de maintenir sa teneur en oxygène dissous entre 80 et 100 % de saturation en air pendant la période nécessaire au dépôt des poissons dans les réservoirs d'essai. Au moins dix poissons doivent être déposés dans chaque concentration d'essai, y compris chaque solution témoin. Ils peuvent être répartis entre deux récipients ou plus, à la même concentration, pour respecter la limite requise sur le chargement (voir la section 4.2).

En plus de disposer de façon aléatoire les concentrations d'essai dans l'installation d'essai, l'ordre d'ajout des poissons dans chaque solution témoin doit également être aléatoire. Pour ce faire, il suffit de déposer un ou deux poissons de façon séquentielle dans chaque solution d'essai, y compris les solutions témoins, jusqu'à ce que dix poissons aient été placés dans chacune d'elles. Chaque poisson doit être utilisé seulement une fois comme organisme témoin ou d'essai.

Si une ou plusieurs solutions d'essai sont fortement colorées, opaques ou mousseuses, des paniers construits d'un matériau non toxique et non abrasif (p. ex. nylon, polyéthylène, polypropylène) peuvent être utilisés pour inspecter les poissons au cours de l'essai. Si l'on utilise des paniers, on doit en placer dans chaque récipient d'essai, y compris ceux contenant les solutions témoins. Les paniers doivent être assez grands pour permettre aux poissons de se déplacer librement dans tout le récipient d'essai. Avant usage, chaque panier doit être nettoyé et rincé à fond avec de l'eau témoin/de dilution.

4.5 Observations et mesures

La couleur, la *turbidité*, l'odeur et la présence de matières solides flottantes ou décantables dans l'échantillon devraient être observées au début de l'essai. L'apparence des solutions témoins devrait aussi être observée, et tout changement évident survenant pendant l'essai devrait être consigné.

Les mesures de l'oxygène dissous, du pH et de la température doivent être effectuées dans chaque solution d'essai, y compris les solutions témoins, au moins au début et à la fin de l'essai. La température devrait être mesurée, et l'aération devrait être vérifiée dans chaque solution d'essai, y compris les solutions témoins, toutes les 24 heures. L'oxygène

dissous et le pH peuvent aussi être mesurés pendant l'essai (p. ex. toutes les 24 heures ou lorsque des organismes d'essai meurent ou semblent stressés). Les mesures initiales relatives à chaque solution d'essai devraient être effectuées après la période de préaréation (voir la section 4.3). Les mesures finales devraient être réalisées après que les observations biologiques ont été achevées. La salinité de chaque solution d'essai doit être mesurée au moins au début de l'essai.

L'observation fréquente et régulière des poissons dans chaque récipient d'essai est nécessaire d'une part pour obtenir des renseignements sur le moment de leur mort ainsi que sur toutes les réactions *sublétales évidentes* et, d'autre part, pour éliminer les poissons morts qui pourraient autrement souiller la solution d'essai. Les poissons dans chaque récipient d'essai doivent être inspectés au moins après 24, 48, 72 et 96 heures. Des observations plus fréquentes (p. ex. 0,5, 1, 2, 4, 8 heures) sont recommandées pendant le premier jour de l'essai. Pendant chaque période d'observation, tous les poissons morts doivent être consignés et éliminés. Les poissons sont réputés morts quand ils ne laissent apparaître aucun signe d'activité operculaire ou autre et qu'ils ne réagissent pas à une légère poussée. Les effets toxiques sublétaux évidents devraient aussi être consignés (p. ex. apparence ou comportement anormaux, accroissement du rythme respiratoire ou de la « toux », comportement de nage irrégulier, remontée à la surface, décoloration et perte d'équilibre; voir l'annexe E dans EC, 1990b). Toutes les différences par rapport aux poissons témoins devraient être observées. Dans le cas de solutions d'essai fortement colorées, opaques ou mousseuses, il est possible d'inspecter les poissons à l'aide d'une épuisette (nettoyée et rincée avant son utilisation) ou en faisant remonter les poissons à la surface dans un panier adapté (section 4.4).

La *longueur à la fourche* moyenne des poissons dans le témoin de l'eau de dilution (mesurée à partir de l'extrémité du museau jusqu'à l'extrémité du rayon de la nageoire caudale du milieu) doit être déterminée et consignée à la fin de l'essai. La mesure de la longueur à la fourche de chaque poisson témoin devrait servir à évaluer si la taille du poisson d'essai respectait la recommandation (autrement dit, le plus gros poisson ne devrait pas être plus de 1,6 fois plus long que le poisson le plus petit dans le même essai; voir la section 2.1).

Le poids humide moyen d'un poisson dans le témoin de l'eau de dilution (après avoir été séché et pesé dans les 30 minutes suivant son retrait du réservoir) doit être déterminé et consigné à la fin de l'essai. Cette mesure doit être utilisée pour confirmer que la plage requise de poids pour les poissons d'essai (poids humide moyen doit être compris entre 0,20 et 1,2 g; voir la section 2.1) et la densité de chargement (la densité de chargement de poissons dans chaque récipient d'essai doit être $\leq$ 0,5 g poisson/L; voir la section 4.2) ont été respectées.

Chaque poisson dans chaque *traitement* devrait être examiné pour déterminer sa forme morphologique (voir la section 2.1 et l'annexe D). Cela peut être réalisé par l'examen de la présence d'une carène caudale, par des techniques de coloration pour la numération sur plaque ou par l'analyse taxonomique des poissons.

Tous les poissons survivants (y compris les poissons témoins) utilisés dans l'essai doivent être éliminés sans cruauté à la fin de l'essai. L'euthanasie doit être effectuée conformément aux lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) sur l'euthanasie d'animaux utilisés à des fins scientifiques (CCPA, 2010). Les organismes d'essai peuvent être euthanasiés à la fin de l'essai après les observations finales de mortalité et d'apparence ou de comportement anormaux pour faciliter les mesures finales de la longueur à la fourche et du poids humide. L'administration aux poissons d'une surdose d'anesthésique comme le méthanesulfonate de tricaïne est recommandée. Les poissons peuvent être transférés dans un seau contenant du méthanesulfonate de tricaïne à raison de 2 g/L, atténué par l'ajout de bicarbonate de soude pour un pH de 6,5 (Paula Jackman, Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique, Environnement et Changement climatique Canada, communication personnelle, 2017).

4.6 Critère de validité de l'essai

L'essai n'est pas valable si > 10 % des poissons témoins meurent ou présentent un comportement atypique/stressé (une nage atypique, des mouvements convulsifs, une nage rapide à la surface, une perte d'équilibre, etc.; voir l'annexe E dans EC, 1990b). Pour que les résultats d'un essai de toxicité comprenant deux séries de témoins (c.-à-d. un témoin de l'eau de dilution et un témoin de la salinité) soient jugés valables et acceptables, les deux contrôles doivent satisfaire de façon indépendante aux critères de validité de l'essai.

Section 5

Modes opératoires pour un essai à concentration unique afin de déterminer le taux de mortalité après 96 heures

Toutes les conditions, tous les modes opératoires et toutes les installations indiquées aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 9 s'appliquent aux modes opératoires pour l'essai d'une concentration unique d'*effluent*.

Ces modes opératoires utilisent une concentration de 100 % d'effluent, sauf indication contraire, et un témoin (*eau témoin* seulement), qui est normalement l'eau de maintien/d'acclimatation. Si la salinité de l'effluent et la salinité à laquelle sont acclimatés les poissons diffèrent de plus de 5 g/kg, un deuxième témoin (c.-à-d. le témoin de la salinité) ajusté à la salinité de l'effluent doit aussi être utilisé (voir la section 4.2). L'utilisation de solutions *répétées* (p. ex. trois répétitions de la concentration de 100 % et trois répétitions de chaque solution témoin, en utilisant dix poissons dans chaque solution répétée) est recommandée pour cet essai afin d'apporter une plus grande confiance à l'égard des résultats d'essai et de leur interprétation. Au moins dix poissons doivent être exposés à chaque effluent et à chaque solution de témoins.

L'essai n'est pas valable si > 10 % des poissons témoins (données combinées, si l'on a recours à des répétitions) présentent un comportement atypique ou stressé et/ou sont morts (voir section 4.6). Pour que les résultats d'un essai de toxicité comprenant deux séries de témoins (c.-à-d. un témoin de l'eau de dilution et un témoin de la salinité) soient jugés valables et acceptables, les deux contrôles doivent satisfaire de façon indépendante aux critères de validité de l'essai.

Le *paramètre* pour cet essai est le *taux* de mortalité après 96 heures. Un taux de mortalité > 50 % est couramment utilisé pour déterminer si un échantillon « réussit » ou « échoue » à un essai. Par exemple, en vertu du *Règlement sur les effluents des mines de métaux*, un effluent échoue à cet essai s'il est à l'origine de plus de 50 % des décès des poissons à une concentration de 100 %.

Section 6

Modes opératoires pour un essai à concentrations multiples afin de déterminer la CL50 de 96 heures

Toutes les conditions, tous les modes opératoires et toutes les installations indiquées aux sections 1, 2, 3, 4, 7 et 9 s'appliquent aux présents modes opératoires.

Au moins cinq concentrations d'*effluent* et un témoin (*eau de dilution* seulement), qui est normalement la même chose que l'eau de maintien/d'acclimatation, doivent être utilisés dans les essais pour estimer une *CL50*. Si la salinité de l'effluent et la salinité à laquelle sont acclimatés les poissons diffèrent de plus de 5 g/kg, un deuxième témoin (c.-à-d. le témoin de la salinité) ajusté à la salinité de l'effluent doit aussi être utilisé (voir la section 4.2). Au moins dix poissons doivent être exposés à chaque concentration d'essai, y compris la concentration non diluée (100 %) et les témoins. La concentration la plus élevée doit être l'effluent non dilué (concentration à 100 %), et chaque concentration successive doit correspondre à au moins 50 % de la concentration plus élevée suivante. Il est avantageux d'utiliser une série géométrique (logarithmique), p. ex. des concentrations de 100, 50, 25, 12,5 et 6,3 %. Les concentrations peuvent être basées sur d'autres proportions ou sur des séries de dilution normalisées (voir l'annexe D dans EC, 1990b).

Comme cet essai de détermination de la CL50 doit inclure un effluent non dilué (100 %) comme la concentration la plus élevée, les résultats de cet essai peuvent également servir à déterminer le *paramètre* de concentration unique du pourcentage de mortalité dans un effluent non dilué (100 %) après 96 heures (voir la section 5).

Les répétitions de chaque concentration peuvent être utilisées. L'utilisation de solutions *répétées* (c.-à-d. exposer un plus grand nombre de poissons) pourrait fournir une représentation plus précise de la courbe concentration-réponse (USEPA, 2016a) et, par conséquent, renforcer la confiance à l'égard des résultats d'essai et de leur interprétation.

La CL50 après 96 h et ses limites de confiance à 95 % doivent être calculées si les données sont exploitables pour ce calcul et la méthode de calcul doit être indiquée. Le document d'orientation d'Environnement et Changement climatique Canada sur les méthodes statistiques pour les essais d'écotoxicité, SPE 1/RM/46 (EC, 2005) fournit des directives et conseils supplémentaires concernant le calcul de la CL50. Des programmes informatiques pour calculer la CL50 et les limites de confiance sont disponibles (EC, 2005) et devraient être utilisés.

L'essai n'est pas valable si > 10 % des poissons témoins (données combinées, si l'on a recours à des répétitions) présentent un comportement atypique ou stressé et/ou sont morts (section 4.6). Pour que les résultats d'un essai de toxicité comprenant deux séries de témoins (c.-à-d. un témoin de l'eau de dilution et un témoin de la salinité) soient jugés valables et acceptables, les deux contrôles doivent satisfaire de façon indépendante aux critères de validité de l'essai. Seul le témoin de l'eau de dilution est utilisé pour le calcul de la CL50 ou pour le calcul d'autres paramètres statistiques impliquant des comparaisons entre les résultats de chaque série de concentration d'essai et ceux des solutions témoins.

Section 7

Modes opératoires pour les essais sur un toxique de référence

Un *toxique de référence* doit être utilisé pour évaluer la sensibilité relative du *lot* de poissons utilisé dans l'essai de toxicité ainsi que la *précision* et la fiabilité des données produites par le laboratoire concernant ce toxique de référence dans des conditions d'essai normalisées, tout comme les compétences techniques du personnel du laboratoire qui effectue l'essai (EC, 1990c).

Les produits chimiques de référence choisis doivent être mis à l'essai dans un essai à concentrations multiples mis en route dans les 14 jours précédant ou suivant la date du début de l'essai de toxicité et lorsqu'un nouveau lot de poissons est acclimaté. Les poissons utilisés dans l'*essai de toxicité de référence* mené conjointement avec un essai visant à déterminer la létalité aiguë d'un effluent doivent provenir du même lot conservé au laboratoire et utilisé dans l'essai sur l'effluent. Les modes opératoires et conditions à suivre sont identiques à ceux mentionnés aux sections 4 et 6, tel qu'il est décrit dans Environnement et Changement climatique Canada (1990c), sauf que les aliquotes d'un produit chimique de référence sont ajoutées à l'eau de dilution et mises à l'essai, au lieu d'un effluent. L'eau témoin/de dilution utilisée régulièrement dans les essais sur l'effluent doit aussi être utilisée pour l'essai de toxicité de référence.

Dans le cas de l'espèce *G. aculeatus*, il est recommandé d'utiliser un phénol de qualité « réactif » comme toxique de référence. La CL50 après 96 h devrait être calculée pour le toxique de référence et exprimée en mg/L en fonction du phénol. D'après les résultats obtenus pendant les essais interlaboratoires, la CL50 moyenne après 96 h pour l'épinoche à trois épines était de 14,6 mg phénol/L (CV = 19,6 %; n = 9) (AquaTox, 2017). Les *solutions mères* de phénol doivent être préparées le jour même de leur utilisation, ou leur stabilité doit être démontrée pendant le maintien si elles sont entreposées avant leur utilisation. Il a été démontré que l'utilisation de certains métaux en tant que toxiques de référence avec l'épinoche posait des problèmes de solubilité pour le zinc et le cuivre dans l'eau saline et entraînait une variabilité interlaboratoire plus élevée avec le cadmium par rapport au phénol dans les essais interlaboratoires (AquaTox, 2017). Il n'est donc pas recommandé d'utiliser des métaux comme toxiques de référence avec les épinoches.

La concentration du toxique de référence dans toutes les solutions mères devrait être analysée chimiquement avec la méthode appropriée (APHA *et al*., 2012). Au moment de préparer les solutions d'essai, il faudrait prélever des aliquotes auprès du témoin et des échantillons à concentrations faibles, moyennes et élevées pour les analyser immédiatement ou les entreposer aux fins d'analyse ultérieure, dans l'éventualité d'une CL50 atypique (c.-à-d. se situant à l'extérieur des *limites de la zone de confiance*). Si elles sont entreposées, certaines aliquotes doivent être entreposées dans l'obscurité à 4 ± 2 °C. Les solutions de phénol devraient subir un traitement de conservation avant d'être entreposées (APHA *et al*., 2012). On devrait procéder à l'analyse chimique des aliquotes entreposées à cette fin dès que l'essai toxicologique est terminé. Il est souhaité, mais non obligatoire, de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois les observations biologiques achevées. Le calcul de la CL50 devrait être fondé sur les concentrations mesurées lorsque celles-ci diffèrent suffisamment (c.-à-d. ≥ 20 %) des concentrations nominales et lorsque la précision des analyses chimiques est satisfaisante.

Une fois qu'on dispose d'un nombre suffisant de données (p. ex. au moins cinq points de données) [EC, 1990c, 2005], une *carte de contrôle* qui représente les valeurs de la CL50 sur un graphique doit être préparée et continuellement mise à jour avec chaque nouvel essai de toxicité de référence. Sur la carte de contrôle, le logarithme de concentration devrait être porté sur l'axe vertical par rapport aux données de l'essai ou au nombre d'essais sur l'axe horizontal. Chaque CL50 pour le toxique de référence devrait être comparée avec les limites de la zone de confiance établies auparavant. La CL50 est acceptable si elle se situe à l'intérieur des limites de

la zone de confiance (± 2 ET). On doit se servir du logarithme (CL50) dans tous les calculs de moyennes et d'écarts types. Cette pratique reflète une adhésion à l'hypothèse selon laquelle chaque CL50 a été estimée en fonction du logarithme des concentrations. La *moyenne* du logarithme (CL50), ainsi que ses limites de la zone de confiance supérieure et inférieure (± 2 ET), calculées en fonction des valeurs disponibles du logarithme (CL50), sont recalculées avec chaque CL50 successive (EC, 1990c, 2005). Si l'essai est souvent effectué, les 20 points de données les plus récents concernant le toxique de référence peuvent être utilisés pour calculer les moyennes et les limites de la zone de confiance.

On peut établir la carte de contrôle en effectuant simplement la représentation graphique de la moyenne et ± de 2 ET en tant que logarithmes ou, lorsque cela est souhaité, en les convertissant en valeurs arithmétiques et en représentant la CL50 et ± 2 ET sur une échelle de concentration logarithmique. Différentes approches pour établir une carte de contrôle (p. ex. Levey-Jennings, moyenne mobile) sont acceptables. Les cartes de contrôle peuvent servir à dégager des tendances au fil du temps. Des exemples de tendances qui pourraient être observées sont notamment les suivants : une tendance ascendante ou descendante, plusieurs points successifs d'un côté de la moyenne, des changements qui sont observés à différents moments de l'année et des valeurs successives de la CL50 situées à l'extérieur des limites de la zone de confiance ± 2 ET.

Si une CL50 donnée tombe à l'extérieur des limites de la zone de confiance, il convient de mettre en doute la sensibilité des poissons d'essai ainsi que le rendement et la précision de l'essai. Comme cette situation peut se produire dans 5 % des cas par le simple jeu du hasard, l'obtention d'une seule valeur aberrante de la CL50 n'est pas nécessairement un signe de sensibilité anormale du lot de poissons ou un signe de précision insatisfaisante des données toxicologiques. Il s'agit seulement d'un avertissement. Si cela se produisait, on devrait procéder à un examen approfondi de toutes les conditions d'acclimatation et de maintien des organismes, des conditions d'essai ainsi que des compétences techniques.

En fonction des résultats, une acclimatation et une réévaluation des poissons avec un ou plusieurs toxiques de référence devraient être entreprises, ou un nouveau lot de poissons devrait être obtenu et acclimaté afin d'être utilisé dans des essais de toxicité subséquents avec des effluents et des toxiques de référence.

Le fait que les résultats soient tous à l'intérieur des limites de la zone de confiance n'est pas nécessairement un gage de la cohérence des résultats obtenus par le laboratoire. Des données historiques extrêmement variables pour un toxique de référence donné élargiraient ces limites à un point tel qu'un nouveau résultat d'essai pourrait se trouver à l'intérieur des limites, tout en représentant une variation indésirable dans les résultats de l'essai. On trouvera des indications sur la variation raisonnable des données sur les toxiques de référence (c.-à-d. les limites de la zone de confiance d'une carte de contrôle) à la sous-section 2.8.1 et à l'annexe F d'Environnement et Changement climatique Canada (2005).

Une CL50 qui tombe à l'extérieur des limites de contrôle (moyenne ± 3 ET) révèle presque à coup sûr que l'essai est inacceptable et qu'il devrait être repris après un examen attentif de tous ses aspects. Si les paramètres se situent entre les limites de contrôle et les limites de la zone de confiance plus de 5 % du temps, cela révélerait une détérioration de la précision. Encore là, l'essai le plus récent devrait être repris après un examen attentif des modes opératoires, des conditions et des calculs.

Section 8

Modes opératoires pour les essais sur des produits chimiques

La présente section donne des instructions précises concernant la mise à l'essai de *produits chimiques*, de substances chimiques (p. ex. formulations) ou de mélanges chimiques individuels (c.-à-d. échantillons d'eau modifiés avec une substance d'essai), en plus des modes opératoires indiqués aux sections 1 à 7.

8.1 Propriétés, étiquetage et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique, de la formulation ou du mélange de produits chimiques à mettre à l'essai, notamment ses principaux ingrédients et leur concentration, sa solubilité dans l'eau de mer (naturelle ou artificielle), sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation, sa toxicité pour les humains et les organismes aquatiques et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter les fiches de données sur les aspects liés à la sécurité des substances d'essai (p. ex. fiches signalétiques), s'il en existe. Quand la solvabilité dans l'eau soulève des doutes ou des difficultés, les modes opératoires acceptables utilisés antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses du produit chimique devraient être recueillis et consignés et/ou la solubilité du produit chimique dans l'eau témoin/de dilution devrait être déterminée en laboratoire. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule structurelle, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés significatives, la présence et les quantités d'additifs et le coefficient de partage octanol-eau.[6]

On devrait aussi connaître une méthode analytique acceptable pour mesurer le produit chimique dans l'eau de mer aux concentrations prévues pour l'essai, ainsi que les données indiquant la *précision* et *l'exactitude* de l'analyse.

Dès réception des produits chimiques, les contenants doivent être fermés hermétiquement et codés ou étiquetés. L'information requise (c.-à-d. le nom du produit chimique, le fournisseur, la date de réception) doit être indiquée sur l'étiquette et/ou consignée sur une fiche de données distincte consacrée à l'échantillon, le cas échéant. 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.

8.2 Préparation des solutions d'essai

Dans le cas des produits chimiques, on exécute généralement un essai à concentrations multiples afin d'établir la CL50 (voir la section 6). Il peut s'avérer souhaitable de prévoir des *répétitions* (p. ex. deux ou trois) pour chaque concentration d'essai, lorsqu'il s'agit d'évaluer la *toxicité* de produits chimiques ou de mélanges chimiques aux fins d'enregistrement fédéral ou à d'autres fins réglementaires. Des répétitions peuvent s'avérer nécessaires en vertu des règlements sur l'enregistrement d'un produit chimique, d'un pesticide ou d'une catégorie analogue de produits chimiques. Puisque l'objectif d'un essai à concentrations multiples est de déterminer la CL50 après 96 h (en se fondant sur les données sur la mortalité), un essai utilisant au moins cinq concentrations et des témoins est recommandé. Le nombre de répétitions et de *traitements* pourrait être réduit ou éliminé pour les essais permettant d'obtenir une plage, ainsi que pour les essais de dépistage et d'études de recherche non réglementaires, en fonction de l'écart prévu entre les récipients d'essai dans un traitement.

[6] La connaissance des propriétés du produit chimique aidera à déterminer les précautions et exigences particulières requises pour sa manipulation et sa mise à l'essai (p. ex. les essais dans une installation bien aérée, besoin d'utiliser un solvant). L'information concernant la solubilité et la stabilité chimiques en eau de mer est également utile dans l'interprétation des résultats des essais.

On prépare généralement les solutions d'essai du produit chimique à mettre à l'essai en ajoutant les aliquotes d'une *solution mère* préparée dans de l'eau témoin/de dilution. Autrement, dans le cas de solutions concentrées ou de grands volumes, des quantités pondérées (à l'aide d'une balance adéquate) de produit chimique peuvent être ajoutées dans l'eau témoin/de dilution pour obtenir les teneurs nominales à mettre à l'essai. Dans le cas d'échantillons aqueux (p. ex. formulations chimiques dans l'eau), des solutions d'essai peuvent aussi être préparées en ajoutant les quantités appropriées de sels de mer secs du commerce (voir la section 2.3) directement dans l'échantillon ou dans chacune des solutions d'essai pour ajuster la salinité afin qu'elle soit comprise dans la plage souhaitée. Il fait préparer et consigner des concentrations d'essai nominales en tenant compte de l'ajustement de la salinité. Si la salinité de la concentration d'essai la plus élevée est > 5 g/kg supérieure ou inférieure à la salinité à laquelle les poissons sont acclimatés, un deuxième témoin dont la salinité a été ajustée (écart maximal de 1 g/kg) à celle de la concentration d'essai la plus élevée (témoin de la salinité) doit être inclus dans l'essai. Pour connaître les directives sur l'utilisation d'un témoin de la salinité, voir la section 4.2. Si des solutions mères sont utilisées, la concentration et la stabilité du produit chimique d'essai dans la solution devraient être déterminées avant l'essai. Les solutions mères soumises à une photolyse devraient être protégées contre la lumière, et les solutions mères instables doivent être de nouveau préparées, le cas échéant. Si de l'eau désionisée, distillée ou de l'eau douce est utilisée pour préparer la solution mère, des sels de mer secs du commerce devraient être ajoutés, au besoin, pour ajuster la salinité de chaque solution d'essai afin qu'elle soit comprise dans la plage souhaitée.

En ce qui concerne les produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les directives fournies dans le document sur les essais de toxicité pour les organismes aquatiques visant des substances et mélanges difficiles de l'OCDE (OCDE, 2000) devraient être suivies. On ne devrait pas utiliser 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 chimique d'essai en vue de son utilisation commerciale normale. L'utilisation d'un solvant autre que de l'eau devrait être évitée dans la mesure du possible. Un solvant organique peut être utilisé pour la dissolution de la substance d'essai dans de l'eau de dilution lorsqu'aucune autre méthode acceptable de préparation de la solution d'essai n'est disponible. Le cas échéant, on doit préparer une solution témoin supplémentaire contenant l'eau témoin/de dilution et la même concentration d'agent solubilisant que celle contenue dans la solution la plus concentrée du produit chimique d'essai (c.-à-d. témoin du solvant). Ces agents devraient être utilisés avec parcimonie (c.-à-d. en utilisant le volume minimal nécessaire pour dissoudre ou mettre en suspension la substance d'essai dans l'eau de dilution) et leur concentration ne devrait pas dépasser celle ayant une incidence sur la survie de l'épinoche à trois épines ou au plus 0,1 mL/L dans toute solution d'essai (OCDE, 2000; Hutchison *et al.*, 2006; Green et Wheeler, 2013). Si cette information n'est pas connue, un essai préliminaire portant sur un solvant uniquement, dans le cadre duquel diverses concentrations du solvant sont utilisées, devrait être mené pour déterminer la concentration seuil susceptible de produire des effets pour ce qui est du solvant qui est étudié aux fins d'utilisation dans l'essai définitif. Si l'on utilise des solvants, il est préférable d'utiliser les produits suivants (OCDE, 2000; USEPA, 2016b) : le diméthyl formamide, le triéthylèneglycol, le méthanol, l'acétone et l'éthanol.

La teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris les solutions témoins, devrait être mesurée après leur préparation. Par la suite, on devrait soit introduire les poissons et mettre en route l'essai (voir la section 4.4), soit préaérer chaque solution d'essai (voir la section 4.3) avant d'introduire les poissons. Dans la plupart des cas, la préaération des solutions d'essai n'est pas nécessaire ou justifiée.[7] Lorsque la préaréation est justifiée (c.-à-

[7] Une aération peut extraire les produits chimiques volatils d'une solution ou accroître la vitesse d'oxydation et de dégradation chimique d'autres substances. Cependant, l'aération de solutions d'essai avant l'exposition des poissons pourrait s'avérer nécessaire en raison de la demande en oxygène de la substance d'essai.

d. après la préparation, la teneur en oxygène dissous d'une ou de plusieurs solutions d'essai est < 70 % ou > 100 % de saturation en air), on devrait suivre les directives pour la préaréation des solutions indiquées à la section 4.3.

8.3 Eau témoin/de dilution

L'eau témoin/de dilution peut être de l'*eau de mer artificielle*, de l'*eau de mer* naturelle « non contaminée » du laboratoire (voir la section 2.3) ou, si une situation locale présente un intérêt particulier, un échantillon d'*eau réceptrice* marine ou estuarienne. Le choix de l'eau témoin/de dilution dépend de l'objet de l'essai.

Si un degré élevé de normalisation est nécessaire (p. ex. si la toxicité mesurée d'un produit chimique doit être comparée et évaluée par rapport à des valeurs obtenues ailleurs pour ce produit chimique ou d'autres produits), de l'eau de mer artificielle dont la salinité a été ajustée pour correspondre à une ou plusieurs salinités communes à tous les essais devrait être préparée et servir d'eau témoin/de dilution. De plus, la salinité de toutes les concentrations d'essai devrait être de 1 g/kg de celle des concentrations témoins.

Si l'on doit évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur marin ou estuarien particulier, on peut préparer des échantillons de ce milieu dans un endroit à l'abri de l'influence du produit chimique, puis les utiliser comme eau témoin/de dilution.[8, 9, 10] Par exemple, il peut s'agir d'évaluer les effets toxiques de déversements (réels ou potentiels) de produits chimiques ou d'applications intentionnelles d'un produit chimique (p. ex. épandage d'un pesticide) sur une étendue d'eau marine ou estuarienne particulière. Si un échantillon des eaux réceptrices doit être utilisé comme eau témoin/de dilution, une solution témoin distincte doit être préparée à l'aide de l'eau témoin/de dilution qui est normalement utilisée pour l'analyse de la létalité aiguë chez l'épinoche et qui est capable d'atteindre régulièrement des résultats d'essai valides
(voir la section 4.3).

L'eau de mer naturelle ou artificielle non contaminée du laboratoire peut également être utilisée pour évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur particulier, surtout

---

S'il est nécessaire d'aérer une solution d'essai, toutes les solutions doivent être aérées, tel qu'il est décrit à la section 4.3.

[8] Les contaminants qui se trouvent déjà dans le milieu récepteur peuvent ajouter leur toxicité à celle du produit chimique à l'essai. Dans ce cas, de l'eau de dilution non contaminée (eau de mer artificielle ou eau de mer naturelle du laboratoire) donnerait une estimation plus exacte de la toxicité du produit déversé ou appliqué, mais pas nécessairement de son effet total sur le site visé.

Si l'objectif de l'essai est de déterminer l'effet d'un produit chimique particulier sur des eaux réceptrices précises, cela n'a pas d'importance si ces eaux réceptrices modifient la toxicité de l'échantillon par la présence de *toxiques* supplémentaires, ou à l'inverse, par la présence de substances qui réduisent les effets toxiques, par exemple les acides humides. Cependant, en raison de la possibilité d'effets toxiques attribuables aux eaux réceptrices « en amont », il faut inclure ce qui suit dans tout essai qui utilise les eaux « en amont » comme eau témoin/de dilution : au moins un deuxième témoin utilisant l'eau non contaminée du laboratoire qui est normalement utilisée dans les analyses de la létalité chez l'épinoche et au plus, une autre série de concentrations utilisant cette même source d'eau comme diluant.

[9] Il serait souhaitable d'acclimater un lot de poissons aux eaux réceptrices avant de les utiliser dans un essai où elles servent d'eau témoin/de dilution, mais cela est rarement réalisable en raison de la nécessité de transporter des quantités importantes d'eau au laboratoire. Si cela est possible et opportun, les essais utilisant les eaux réceptrices pourraient être réalisés près du site visé, auquel cas l'acclimatation devrait durer au moins cinq jours.

[10] Une solution de rechange (compromis) à l'utilisation des eaux réceptrices comme eau témoin/de dilution consiste à utiliser de l'eau de mer artificielle ou de l'eau de mer naturelle du laboratoire en ajustant sa salinité et son pH à ceux des eaux réceptrices. Selon la situation, l'ajustement peut se faire en fonction des moyennes saisonnières ou des valeurs mesurées dans les eaux réceptrices à un moment particulier. L'ajustement de la salinité peut être effectué au moyen des méthodes mentionnées à la section 2.3, y compris par l'ajout de sels de mer du commerce aux quantités et au ratio appropriés, l'ajustement du pH est décrit à la section 4.3.2 dans EC, 1990b.

lorsque des contraintes logistiques rendent peu pratiques le prélèvement et l'utilisation des eaux réceptrices ou s'il existe déjà une toxicité perturbatrice dans les eaux réceptrices. Cette eau de mer naturelle ou artificielle peut aussi servir d'eau témoin/de dilution dans d'autres situations (p. ex. l'évaluation préalable ou intralaboratoire de la toxicité du produit chimique).

Si l'on désire des données concernant l'influence de la salinité sur la toxicité d'un produit chimique à l'étude, on devrait mener en parallèle des essais distincts pour trois salinités ou plus. L'eau témoin/de dilution servant à de tels essais comparatifs devrait provenir de la même source : il peut s'agir d'eau de mer artificielle (voir la section 2.3) ou d'eau de mer naturelle et non diluée dont la salinité a été ajustée au besoin à l'aide de sels secs, d'eau désionisée, d'eau distillée ou d'eau douce « non contaminée ».

8.4 Observations et mesures

Outre les observations sur la toxicité décrite à la section 4.5, d'autres observations et mesures sont nécessaires pendant les essais avec les produits chimiques.

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

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les aliquotes des solutions d'essai afin de déterminer les concentrations de produits chimiques auxquelles les poissons sont exposés.[11] Lorsque des produits chimiques doivent être mesurés, on devrait prélever des échantillons dans les concentrations d'essai à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions témoins, au début et à la fin de l'essai au minimum. Ces échantillons devraient être conservés, entreposés et analysés au moyen des meilleures méthodes éprouvées et validées avec des seuils de détection acceptables qui permettent d'établir la concentration du produit chimique visé en solution aqueuse (eau de mer).

Si les mesures chimiques indiquent 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 dans le cadre duquel les solutions sont renouvelées de façon périodique (essai à *renouvellement périodique*) ou continuelle (essai à *renouvellement continu*) (OCDE, 1992).

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 poissons ont été exposés.

8.5 Paramètres d'essai et calculs

Le *paramètre* des essais de produits chimiques sera généralement une CL50 après 96 h pour le taux de mortalité des poissons (voir la section 4.5). Les modes opératoires admis pour le calcul de la CL50 et de son intervalle de confiance à 95 % sont énoncés à la section 6. La section 5 fournit des directives sur le calcul et la comparaison des paramètres pour les essais à concentration unique. Pour obtenir de plus amples renseignements sur les statistiques appropriées à appliquer pour les données sur les paramètres, le chercheur devrait

[11] 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 (USEPA, 1985) : les solutions d'essai sont aérées; la substance d'essai est volatile, insoluble ou forme un précipité en solution; on sait que cette substance est absorbée par les matériaux dont les récipients d'essai sont construits; ou on fait appel à un système à renouvellement continu. Certains cas (p. ex. la mise à l'essai de pesticides en vue de leur enregistrement) peuvent nécessiter la mesure des concentrations du produit chimique dans les solutions d'essai.

consulter le Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité d'Environnement et Changement climatique Canada, SPE 1/RM/46 (EC, 2005).

Si des témoins supplémentaires (p. ex. solvant, salinité et/ou autre) sont utilisés, les résultats doivent être examinés pour déterminer s'ils satisfont aux critères de validité de l'essai de façon indépendante (section 4.6). L'essai est considéré comme non valide si le taux de mortalité des poissons et/ou un comportement atypique/stressé dans tout témoin supplémentaire ou dans le témoin de l'eau de dilution non traité est > 10 %. Si des solvants sont utilisés pour préparer les solutions d'essai, seules les données provenant du témoin du solvant devraient être utilisées pour calculer la CL50 ou pour calculer d'autres paramètres statistiques impliquant les comparaisons des résultats de chaque série de concentrations d'essai avec les résultats des solutions témoins.

Pour chaque concentration d'essai, y compris les traitements témoins, le taux de mortalité moyen des poissons à la fin de l'essai doit être calculé et consigné si l'essai est réalisé au moyen de solutions répétées.

Section 9

Rapports à produire

Voici un résumé des exigences en matière de production de rapports et de tenue de dossiers associées à la présente méthode de référence. De plus amples précisions ou explications se trouvent dans les sections précédentes de cette méthode.

Sauf indication contraire de la part d'Environnement et Changement climatique Canada, tous les éléments énumérés à la section 9.1 doivent être signalés à Environnement et Changement climatique Canada pour chaque essai de toxicité qui est mis en route. Les renseignements doivent être fournis conformément aux règlements pertinents et d'une manière et dans un format précisés par Environnement et Changement climatique Canada (c.-à-d. manuel ou électronique, mode de transmission, forme et contenu).

Environnement et Changement climatique Canada pourrait aussi fournir des renseignements supplémentaires à la section 9.1, notamment des renseignements requis en vertu d'un règlement particulier ou nécessaires pour clarifier les rapports et l'évaluation des données.

Sauf indication contraire de la part d'Environnement et Changement climatique Canada, les éléments énumérés à la section 9.2 doivent être consignés et conservés sur dossier pendant cinq ans. Ces renseignements doivent être fournis à la demande d'Environnement et Changement climatique Canada. Ils feront l'objet d'une demande moins fréquente, p. ex. au moment d'une vérification ou d'une enquête.

Le rapport d'essai doit mentionner tout écart par rapport aux exigences absolues exposées aux sections 2 à 7 de la présente méthode de référence en ce qui concerne les essais sur l'effluent, ainsi qu'aux sections 2 à 8 de la présente méthode de référence en ce qui concerne les essais chimiques et, le cas échéant, il doit fournir des précisions au sujet de l'écart. Le lecteur doit pouvoir déterminer, à partir de ce document, si les conditions et les modes opératoires préalables et expérimentaux ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage qu'on entend en faire.

9.1 Données à déclarer

La présente section fournit une liste d'éléments qui doivent être inclus dans chaque rapport d'essai.

9.1.1 Effluent ou produit chimique

- Nom et adresse de l'installation produisant l'effluent.
- Date et heure du prélèvement de l'échantillon.
- Type d'échantillon (p. ex. « effluent non traité de l'usine », « effluent terminal de l'usine », « rejet de la lagune de déversement en cas d'urgence », « lixiviat », nom du produit chimique ou de la substance) ou codage, tel qu'il est fourni au personnel du laboratoire.
- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon.
- Brève description du lieu de prélèvement.
- Méthode d'échantillonnage (p. ex. « échantillon instantané », « échantillon discontinu », « échantillon composite de 24 h, avec prélèvement de sous-échantillons à toutes les heures »).
- Nom des personnes ayant prélevé l'échantillon.
- Date et heure auxquelles l'installation d'essai a reçu l'échantillon et température de l'échantillon à la réception.

9.1.2 Installations et conditions de l'essai

- Type et méthode d'essai; p. ex. « essai à concentration unique », « méthode décrite dans la deuxième édition de la publication SPE 1/RM/10 ».

- Nom du laboratoire d'essai et ville où il se trouve.
- Pourcentage de mortalité des poissons dans le ou les réservoirs de maintien/d'acclimatation d'où proviennent les poissons soumis aux essais, tel qu'enregistré chaque jour (ou au minimum cinq jours sur les sept compris dans une période hebdomadaire), pour la période de sept jours précédant immédiatement l'essai.
- Espèce d'organisme soumis à l'essai.
- Date et heure de mise en route de l'essai de toxicité.
- Personne(s) ayant mené l'essai et vérifié les résultats.
- pH, température, teneur en oxygène dissous et salinité de l'effluent non dilué et non ajusté, juste avant la préparation de solutions d'essai.
- Méthode utilisée (avec références) pour la mesure de la salinité de l'effluent (ou de l'échantillon du produit chimique), de l'eau témoin/de dilution et des solutions d'essai.
- Confirmation que l'échantillon ou la solution n'a pas été filtré; indication à savoir si d'autres essais avec filtration ou maintien des matières solides en suspension ont été effectués (voir la section 4.1).
- Confirmation que le pH de l'échantillon ou de la solution n'a pas été ajusté; indication du mode opératoire utilisé pour l'ajustement du pH si des essais avec et sans ajustement du pH ont été conduits (voir section 4.2).
- Confirmation que la salinité de l'échantillon ou de la solution n'a pas été ajustée; indication si un essai a été mené en parallèle à l'aide de l'eau du témoin de la salinité utilisée comme eau de dilution (voir section 4.2).
- Renseignements sur toute aération des solutions d'essai avant l'introduction des poissons (débit, durée). Débit d'aération pendant l'essai.
- Concentration et volume des solutions d'essai, y compris les solutions témoins, et mention de l'usage de répétitions, s'il y a lieu.
- Mesures de la teneur en oxygène dissous, du pH et de la température de chaque solution d'essai, y compris des solutions témoins au début et à la fin de l'essai, au minimum. Mesure de la salinité de chaque solution d'essai au début de l'essai.
- Nombre de poissons introduits dans chaque récipient d'essai.
- Longueur moyenne à la fourche des poissons dans le témoin de l'eau de dilution à la fin de l'essai, avec intervalles de valeurs mesurées.
- Poids frais moyen individuel des poissons dans le témoin de l'eau de dilution à la fin de l'essai.
- Calcul de la densité de chargement (g/L) des poissons dans les solutions témoins de l'eau de dilution.

9.1.3 Résultats

- Nombre de poissons morts dans chaque solution d'essai, y compris les solutions témoins après 24, 48, 72 et 96 h. Nombre de poissons témoins laissant apparaître un comportement atypique ou stressé.
- Pourcentage moyen de mortalité des poissons dans les solutions d'essai et les solutions témoins, après 96 h s'il s'agit d'un essai à concentration unique ou à concentrations multiples conduit en utilisant des solutions répétées. Pourcentage moyen de poissons témoins montrant un comportement atypique ou stressé si l'on a utilisé des solutions témoins répétées.
- Dans le cas des essais à concentrations multiples, estimation de la CL50 après 96 h et de ses limites de confiance à 95 %, si statistiquement possible. Méthodes employés pour calculer les paramètres statistiques.
- Dernière valeur de la CL50 après 96 h (et de ses limites de confiance à 95 %) calculée pour

les essais avec le ou les produit(s) toxique(s) de référence conduit(s) avec le lot de poissons utilisé dans les essais visant l'effluent (ou le produit chimique). Produit(s) chimique(s) de référence. Date de mise en route de l'essai. *Moyenne géométrique* des CL50 calculées antérieurement et limites d'avertissement (± 2 fois l'ET).

- Toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective qui a été prise.

9.2 Données à verser au dossier

La présente section fournit une liste d'éléments qui doivent être inclus dans le rapport d'essai ou conservés sur dossier pendant au moins cinq ans. Les renseignements déposés doivent aussi inclure ce qui suit, le cas échéant :

- Dossier de la chaîne de possession des échantillons mis à l'essai aux fins de surveillance ou d'application d'un règlement.

- Copie du dossier de réception de l'échantillon ou des échantillons.

- Certains résultats des analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons.

- Notes de laboratoire sur les observations et les mesures effectuées au cours de l'essai.

- Notes de laboratoire et la ou les cartes de contrôle pour les essais toxicologiques de référence.

- Dossiers détaillés de la provenance et de la santé des poissons utilisés pour cet essai.

- Renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais doit signer et dater les feuilles de données originales.

9.2.1 Effluent ou produit chimique

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

- Volume de l'échantillon.

- Conditions de transport et de stockage (p. ex. durées, dans le récipient scellé, dans l'obscurité; température durant l'entreposage au laboratoire; mention si l'échantillon était gelé à l'arrivée).

- Apparence et autres propriétés (observations sur la couleur, la turbidité, l'odeur et la présence de solides flottants ou décantables).

- Modification de la couleur, précipitation, floculation, rejet de substances volatiles et autres modifications survenues pendant la préparation des solutions d'essai et durant l'essai.

- Modes opératoires et résultats de toute analyse chimique effectuée sur l'échantillon, si disponibles (p. ex. teneur en matières solides en suspension, matières dissoutes totales).

9.2.2 Installations et conditions de l'essai

- Adresse du laboratoire d'essai.

- Description des installations d'élevage/acclimatation et d'essai, y compris leur agencement général et leurs moyens d'isolation.

- Conditions normales de maintien et d'acclimatation (récipients, emplacement, éclairage, température, y compris le taux maximal de variation, la salinité, y compris le taux maximal de variation, l'aération, les volume et débits d'eau, mode opératoire utilisé pour le renouvellement/la filtration de l'eau, nombre et densité des poissons, procédures de manipulation, type de nourriture, ration et fréquence de l'alimentation, incidence et traitement éventuel de maladies, pourcentage hebdomadaire cumulatif de mortalité).

- Durée de l'acclimatation immédiatement avant l'essai.

- Provenance des poissons soumis à l'essai, y compris le nom du fournisseur et/ou préposé au prélèvement et lieu du prélèvement, date du prélèvement, certificats de confirmation taxonomique de l'espèce, tous les dossiers du fournisseur accompagnant chaque envoi, y compris le nombre d'organismes d'essai expédiés, ainsi que la date de l'envoi, la date de l'arrivée au laboratoire d'essai, la température, la teneur en oxygène dissous, ainsi que le pH de l'eau et la mortalité des poissons dans les contenants d'expédition à leur arrivée au laboratoire.
- Résumé des conditions et modes opératoires propres à l'essai en ce qui a trait au maintien et à l'acclimatation des poissons (p. ex. durées, source d'eau, densité de chargement, caractéristiques comme la température, la salinité, le pH et la teneur en oxygène dissous, type de nourriture et ration, manifestation de caractéristiques de reproduction [c.-à-d. couleurs nuptiales exhibées par les mâles et abdomen gonflé des femelles], le cas échéant, poissons dépourvus d'une carène caudale [c.-à-d. morphes caparaçonnées vers le bas de plaques osseuses ou épinoche tachetée], le cas échéant, incidence et traitement éventuel de maladies, pourcentage hebdomadaire cumulatif de mortalité) s'ils diffèrent des pratiques habituelles.
- Description de la ou des source(s) de l'eau utilisée pour l'élevage et l'acclimatation des poissons et comme eau témoin/de dilution.
- Brève description des modes opératoires, des produits utilisés et durée d'aération et de maintien de la préparation et/ou ajustement de la salinité de l'eau témoin/de dilution et de l'eau témoin de la salinité, le cas échéant et/ou solutions d'essai pour les essais chimiques.
- *Prétraitement* de l'eau d'acclimatation et de l'eau témoin/de dilution, le cas échéant (p. ex. correction de la température et de la salinité, débit et durée de l'aération, type et quantité de tout produit chimique ajouté, détails sur l'entreposage).
- Mesures (moyennes et plages) de la qualité de l'eau d'acclimatation et de l'eau témoin/de dilution effectuées sur l'approvisionnement en eau et dans les réservoirs de maintien. Renseignements à fournir : pH, teneur en oxygène dissous et chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau potable municipale déchlorée utilisée pour préparer l'eau témoin/de dilution) et teneur en ammoniac total. Autres renseignements également souhaitables : matières solides, carbone organique, couleur, ions minéraux, métaux, ammoniac non ionisé et pesticides, gaz totaux dissous et alcalinité, le cas échéant.
- Systèmes de réglage de l'éclairage et de la température.
- Source d'éclairage, photopériode et mesures antérieures de l'éclairage dans les réservoirs d'élevage ou d'acclimatation et à la surface des récipients d'essai.
- Description des récipients d'essai (dimension, forme et matériau), des couvercles, des paniers (s'ils sont utilisés pour inspecter les poissons) et leurs procédures courantes de nettoyage.
- Modes opératoires utilisés pour l'introduction selon un ordre aléatoire des poissons dans les récipients d'essai et pour la disposition selon un ordre aléatoire des concentrations d'essai dans l'installation d'essai.
- Mode opératoire et appareillage pour l'aération des solutions d'essai.
- Modes opératoires employés pour préparer et entreposer les solutions mères et les solutions d'essai de substances chimiques; description et concentrations de tout solvant utilisé.
- Modes opératoires (avec références) utilisés pour les analyses chimiques de l'échantillon ou des solutions d'essai; détails relatifs à l'échantillonnage, à la préparation et à l'entreposage de l'échantillon/de la solution, préalablement aux analyses chimiques.
- Toute autre mesure chimique d'échantillons, de solutions mères ou de solutions d'essai (p. ex. concentrations d'un ou de plusieurs produits chimiques précis, teneur en matières solides en suspension) avant et/ou au moment de l'essai.
- Utilisation et description d'un essai préliminaire ou de détermination d'une plage.

- Toutes les mesures individuelles de longueur à la fourche et du poids humide des poissons soumis à l'essai (avec les valeurs moyennes et la gamme de valeurs pour chaque échantillon).
- Profondeur de la solution d'essai dans les récipients d'essai. Apparence des solutions, y compris toute modification évidente survenue pendant l'essai.
- Concentrations d'essai des toxiques de référence, tant nominales que mesurées. Indication de l'ensemble de données utilisé pour estimer la CL50 et description de tout écart par rapport aux modes opératoires et conditions indiqués pour l'essai de toxicité de référence ou de toute exclusion de ceux-ci.
- Toute mesure de la qualité de l'eau des solutions d'essai non consignée au procès-verbal (section 9.1.2).

9.2.3 Résultats

- Toute observation du nombre de poissons morts non consignée au procès-verbal (p. ex. des observations plus fréquentes le premier jour de l'essai) (voir sections 4.5 et 9.13).
- Observations du comportement et de l'apparence des poissons dans chaque solution d'essai faites au cours de l'essai.

  Toute représentation graphique manuelle des données utilisée pour vérifier une CL50 générée par ordinateur.

Références

APHA, AWWA, and WEF (American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation). 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed.*, Rice EW, Baird RB, Eaton AD, and Clesceri LS (eds.), Washington, DC. 1496 p.

AquaTox (AquaTox Testing and Consulting Inc.). 2017. Test Method Development with Threespine Stickleback: Inter-laboratory Study, Report prepared for Method Development and Applications Unit, Environment and Climate Change Canada, Ottawa, Ontario. 26 p. + app.

ASTM (American Society for Testing and Materials). 2014a. Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory Testing, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania, ASTM E1733-95(2014). 12 p.

ASTM. 2014b. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians, ASTM International, West Conshohocken, Pennsylvania ASTM E729-96(2014). 22 p.

Barber I, and Nettleship S. 2010. From "Trash Fish" to Supermodel: The Rise and Rise of the Three-spined Stickleback in Evolution and Ecology, *Biologist*, 57:15–21.

CCAC (Canadian Council on Animal Care). 2010. CCAC Guidelines on: Euthanasia of Animals Used in Science, Canadian Council on Animal Care, Ottawa, Ontario. 32 p.

CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 1999. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Reactive Chlorine Species, In: Canadian Environmental Quality Guidelines 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg, Manitoba. 9 p.

Deitzer G. 1994. Spectral Comparisons of Sunlight and Different Lamps, In: *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop*, Tibbits TW (ed.), 1 Mar. 1994, Madison, Wisconsin, pp. 197–199.

EC (Environment Canada). 1990a. Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Threespine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/10, including March 2000 amendments. 65 p.

EC. 1990b. Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Rainbow Trout, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/9, including May 1996 and May 2007 amendments. 66 p.

EC. 1990c. Guidance Document on the Control of Toxicity Test Precision Using Reference Toxicants, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/12. 90 p.

EC. 2000a. Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Rainbow Trout, Environmental Protection Service, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/13 2nd ed., including May 2007 and February 2016 amendments. 36 p.

EC. 2000b. Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Effluents to Daphnia magna, Environmental Protection Service, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/14 2nd ed., including February 2016 amendments. 34 p.

EC. 2005. Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Environmental Protection Service, Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/46, including June 2007 amendments. 283 p.

Envirosphere (Envirosphere Consultants Ltd). 2017. Morphological Assessment of Threespine Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in Freshwater and Marine Samples – Atlantic and Pacific Canada, Report prepared for Harris Industrial Testing Service Ltd., South Rawdon, Nova Scotia. 23 p.

Green J and Wheeler JR. 2013. The Use of Carrier Solvents in Regulatory Aquatic Toxicology Testing: Practical, Statistical and Regulatory Considerations, *Aquatic Toxicology*, 144-145: 242–249.

Hagen DW and Moodie GEE. 1982. Polymorphism for Plate Morphs in *Gasterosteus aculeatus* on the East Coast of Canada and a Hypothesis for their Global Distribution, *Canadian Journal of Zoology*, 60: 1032–1042.

Hart JL. 1973. *Pacific Fishes of Canada*, Bulletin 180, Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Ontario. 740 p.

HITS (Harris Industrial Testing Service Ltd.). 2017. Research in Support of Standardized Test Method Development of Threespine Stickleback, Report prepared for Method Development and Applications Unit, Environment and Climate Change Canada, Ottawa, Ontario. 28 p.

Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, and Pickford DB. 2006. Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review, *Aquatic Toxicology*, 76: 69–92.

Katsiadaki I. 2007. The Use of the Stickleback as a Sentinel and Model Species in Ecotoxicology, In: *The Biology of the Three-Spined Stickleback*, Ostlund-Nilsson S, Mayer I, Huntingford FA (eds.), Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, pp. 319–351.

Katsiadaki I, Sanders M, Sebire M, Nagae M, Soyano K, and Scott AP. 2007. Three-Spined Stickleback: an Emerging Model in Environmental Endocrine Disruption, *Environmental Sciences*, 14: 263–283.

Mattern MY. 2007. Phylogeny, Systematics, and Taxonomy of Sticklebacks, In: *The Biology of the Three-Spined Stickleback*, Ostlund-Nilsson S, Mayer I, Huntingford FA (eds.), Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, pp. 1–40.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1992. Guideline for Testing of Chemicals, Fish, Acute Toxicity Test, No 203, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France. 9 p.

OECD. 2000. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No 23, ENV/JM/MONO(2000)6, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France. 53 p.

Sager JC and McFarlane JC 1997. Radiation, In: *Plant Growth Chamber Handbook*, Langhans RW and Tibbits TW (eds.), North Central Regional Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report No. 99, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa, pp. 1–30.

Scott WB and Crossman EJ. 1973. *Freshwater Fishes of Canada*, Bulletin 184, Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Ontario. 966 p.

Scott WB and Scott MG. 1988. *Atlantic fishes of Canada*. University of Toronto Press, Toronto, Ontario. 731 p.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1985. Hazard Evaluation Division, Standard Evaluation Procedure, Acute Toxicity Test for Estuarine and Marine Organisms (Estuarine Fish 96-Hour Acute Toxicity Test), Prepared by Office of Pesticide Programs, Report EPA 540/9-85-009, Washington, DC. 17 p.

USEPA. 1991. Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I Toxicity Characterization Procedures, 2nd ed., Prepared by Office of Research and Development, Duluth, Minnesota, Report EPA/600/6-91/003. 87 p.

USEPA. 1996. Marine Toxicity Identification Evaluation (TIE), Phase I Guidance Document, Prepared by Atlantic Ecology Division, Narragansett, Rhode Island, Report EPA/600/R-96/054. 66 p.

USEPA. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, 5th ed., Prepared by Office of Water (4303T), Washington, DC, Report EPA 821-R-02-012. 275 p.

USEPA. 2016a. Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP 850.1075, Freshwater and Saltwater Fish Acute Toxicity Test, Prepared by Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (7101), Washington, DC, Report EPA 712-C-16-007. 19 p.

USEPA. 2016b. Ecological Effects Test Guidelines: OCSPP 850.1000, Background and Special Considerations - Tests with Aquatic and Sediment-Dwelling Fauna and Aquatic Microcosms, Prepared by Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (7101), Washington, DC, Report EPA 712-C-16-014. 53 p.

Ward AJW, Duff AJ, Krause J, and Barber I. 2005. Shoaling Behaviour of Sticklebacks Infected with the Microsporidian Parasite *Glugea anomala*, *Environmental Biology of Fishes*, 72: 155–160.

Wootton RJ. 1976. *The Biology of the Sticklebacks*, Academic Press Inc. New York, New York. 387 p.

Wootton RJ. 1984. *A Functional Biology of Sticklebacks*, University of California Press, Berkley and Los Angeles. 265 p.

Wootton RJ. 2009. The Darwinian Stickleback *Gasterosteus aculeatus*: A History of Evolutionary Studies, *Journal of Fish Biology*, 75: 1919–1942.

Annexe A

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement et Changement climatique Canada[a]

Titre de la méthode d'essai biologique ou du document d'orientation	Numéro de rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996 et mai 2007
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)*	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur *Daphnia* spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie du cladocère *Ceriodaphnia dubia*	SPE 1/RM/21 Deuxième édition	Février 2007	–
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22 Deuxième édition	Février 2011	–
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente *(Photobacterium phosphoreum)*	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	–
Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce	SPE 1/RM/25 Deuxième édition	Mars 2007	–
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins globuleux et oursins plats)	SPE 1/RM/27 Deuxième édition	Février 2011	–
Essai de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 Deuxième édition	Juillet 1998	–
Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes *(Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius)* dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	–

[a] Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Catalogue des publications d'Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada. Il est également possible de demander des copies imprimées par courriel à l'adresse : enviroinfo@ec.gc.ca. Ces documents sont disponibles gratuitement en format PDF sur le site Web suivant : http://www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/default.asp?lang=Fr&n=0BB80E7B-1. Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le chef de la Section de l'évaluation biologique et normalisation, Environnement et Changement climatique Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada.

Titre de la méthode d'essai biologique ou du document d'orientation	Numéro de rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)			
Méthode d'essai biologique – essai de survie et de croissance de l'amphipode *Hyalella azteca* dans les sédiments et l'eau	SPE 1/RM/33 Deuxième édition	Janvier 2013	–
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole *Lemna minor*	SPE 1/RM/37 Deuxième édition	Janvier 2007	–
Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides *(Polydora cornuta)* dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	–
Essais pour déterminer la toxicité des sols contaminés pour les vers de terre *(Eisenia andrei, Eisenia fetida* ou *Lumbricus terrestris)*	SPE 1/RM/43	Juin 2004	Juin 2007
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Février 2005	Juin 2007
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/47 Deuxième édition	Février 2014	–
Essai de croissance de plantes terrestres indigènes de la région boréale exposées à un sol contaminé	SPE 1/RM/56	Août 2013	–
B. Méthodes de référence[b]			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 Deuxième édition	Décembre 2000	Mai 2007 et février 2016
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*	SPE 1/RM/14 Deuxième édition	Décembre 2000	Février 2016
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/35	Décembre 1998	–
Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	–
Méthode de référence pour mesurer la toxicité des sédiments contaminés chez les embryons et les larves des échinides (oursins globuleux ou oursins plats)	SPE 1/RM/58	Juillet 2014	–

[b] Pour la présente série de documents, par *méthode de référence*, on entend une méthode biologique particulière d'essai de la toxicité, c'est-à-dire une méthode écrite comportant un ensemble explicite de directives et de conditions expérimentales décrites avec précision. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement et Changement climatique Canada, la *méthode de référence* est souvent limitée, dans son emploi, aux essais exigés par certains règlements.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro de rapport	Date de publication	Modifications applicables
C. Documents d'orientation			
Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence	SPE 1/RM/12	Août 1990	–
Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physico-chimique et d'essais biologiques	SPE 1/RM/29	Décembre 1994	–
Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec produit toxique de référence	SPE 1/RM/30	Septembre 1995	–
Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats	SPE 1/RM/34	Décembre 1999	–
Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres	SPE 1/RM/44 Deuxième édition	Décembre 2016	–
Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité	SPE 1/RM/46	Mars 2005	Juin 2007
Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/50	Mars 2008	–
Renseignements de base et conseils supplémentaires pour l'étude de la létalité aiguë d'un effluent d'eau usée pour la truite arc-en-ciel	–	Mars 2008	–
Guide d'échantillonnage et de préparation de sol contaminé aux fins d'essais biologiques	SPE 1/RM/53	Février 2012	–

Annexe B

Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en juin 2017)

Gouvernement fédéral, Environnement et Changement climatique Canada

Suzanne Agius
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qc)

Deborah Austin
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qc)

Adrienne Bartlett
Division de la recherche sur la protection des écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Lee Beaudette
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Rene Beaulieu
Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord
Edmonton (Alb.)

Christian Blaise (émérite)
Centre St. Laurent,
Montréal (Qc)

Lorraine Brown
Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Joy Bruno
Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Julia Brydon
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qc)

Craig Buday
Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Melanie Camplin
Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord
Edmonton (Alb.)

Heather Dillon
Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord
Edmonton (Alb.)

Ken Doe (chercheur émérite)
Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

Tamzin El-Fityani
Bureau national des recommandations et des normes
Ottawa (Ont.)

Chris Fraser
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

François Gagné
Recherche sur les écosystèmes fluviaux
Montréal (Qc)

Patricia Gillis
Division de la recherche sur la protection des écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Manon Harwood
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (Qc)

Christina Heise
Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord
Edmonton (Alb.)

Ryan Hennessy
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Natasha Hostal
Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord
Edmonton (Alb.)

Dale Hughes
Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

Paula Jackman
Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

Stephanie Kvas
Division de l'écotoxicologie et de la faune
Ottawa (Ont.)

Heather Lemieux
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Michelle Linssen-Sauvé
Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Danielle Milani
Division de la recherche sur l'étude des impacts sur les écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Rachel Miliano
Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Joanne Parrott
Division de la recherche sur la protection des écosystèmes aquatiques
Burlington (Ont.)

Linda Porebski
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qc)

Juliska Princz
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Ellyn Ritchie
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Grant Schroeder
Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Ajith Dias Samarajeewa
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Rick Scroggins
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

David Taillefer
Section des programmes de protection marine
Gatineau (Qc)

Sylvain Trottier
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (Qc)

Graham van Aggelen
Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (C.-B.)

Leana Van der Vliet
Laboratoires Sciences et technologie
Ottawa (Ont.)

Brian Walker
Laboratoire des essais environnementaux
du Québec
Montréal (Qc)

Peter Wells (chercheur émérite)
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (N.-É.)

Gouvernement fédéral, Ressources naturelles Canada

Philippa Huntsman-Mapila
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET, RNCan
Ottawa (Ont.)

Morgan King
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET, RNCan
Ottawa (Ont.)

Carrie Rickwood
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales
CANMET, RNCan
Ottawa (Ont.)

Gouvernement provincial

Richard Chong-Kit
Ministère de l'Environnement et de l'Action en matière de changement climatique de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

Olesya Hursky
Saskatchewan Research Council
Saskatoon (Sask.)

Lisa Kennedy (co-présidente)
Ministère de l'Environnement et de l'Action en matière de changement climatique de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

David Poirier
Ministère de l'Environnement et de l'Action en matière de changement climatique de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

Trudy Watson-Leung (co-présidente)
Ministère de l'Environnement et de l'Action en matière de changement climatique de l'Ontario
Etobicoke (Ont.)

Établissements privés de recherche/autres

Eloise Veilleux
Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
Ste-Foy (Qc)

Annexe C

Environnement et Changement climatique Canada, laboratoires d'essai environnemental régionaux

Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique
Immeuble des sciences de l'environnement
443, avenue Université, Université de Moncton
Moncton (Nouveau-Brunswick)
E1A 3E9

Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon
Centre des sciences environnementales du Pacifique
2645, route Dollarton Hwy
North Vancouver (C.-B.)
V7H 1B1

Laboratoire des essais environnementaux du Québec
105, rue McGill
Montréal (Qc)
H2Y 2E7

Laboratoire des essais environnementaux des Prairies et du Nord
Northern Forestry Building
5320, 122^{e} rue NW
Edmonton (Alb.)
T6H 3S5

Pour obtenir les coordonnées actuelles des personnes-ressources du laboratoire régional, veuillez communiquer avec :

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement et Changement climatique Canada
335, chemin River
Ottawa (Ont.)
K1A 0H3
Courriel : ec.methodes-methods.ec@canada.ca

Annexe D

Caractéristiques distinctives de l'épinoche à trois épines

L'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758) est un poisson de petite taille omniprésent de l'hémisphère nord qui a fait l'objet d'études approfondies et qui se trouve dans les milieux marins, estuariens et d'eau douce. Ces poissons, qui ont un corps aplati sur les côtés, une forme de torpille et qui sont caractérisés par des épines pelviennes et dorsales prédominantes, vivent dans les zones peu profondes de milieux côtiers marins et estuariens, ainsi que dans des petits cours d'eau, des rivières et des lacs. L'espèce *G. aculeatus* est généralement *anadrome*, consacrant la plus grande partie de sa vie dans les eaux marines côtières et retournant dans les milieux estuariens et d'eau douce pour y frayer. Cependant, les populations sont variées, certaines ne vivant que dans l'eau douce. Outre son importance écologique et scientifique, l'espèce a été largement utilisée dans les essais de toxicité (voir section 1.0).

Dépourvues des écailles typiques dont sont dotés la plupart des poissons téléostéens, les épinoches sont caractérisées par de nombreuses plaques osseuses latérales qui forment une rangée distinctive qui descend de chaque côté du corps (Wootton, 1984). Il existe trois formes morphologiques (ou morphes), à savoir les formes entièrement, partiellement caparaçonnées et caparaçonnées vers le bas de plaques osseuses (Mattern, 2007). Ces morphes sont aussi appelées *trachurus*, *semiarmatus* et *leiurus*, respectivement (Wootton, 1976). Dans le cas des formes entièrement caparaçonnées de plaques osseuses, chaque poisson est généralement doté d'une rangée ininterrompue de 30 à 35 plaques osseuses latérales sur sa longueur (de la nageoire pectorale à la queue) et d'une carène caudale distincte. Les formes partiellement caparaçonnées de plaques osseuses peuvent posséder 8 à 30 plaques osseuses qui se trouvent dans deux régions (antérieures et postérieures), séparées par un espace dans la rangée de plaques osseuses latérales. La carène caudale est présente, mais n'est pas aussi prédominante que chez les morphes entièrement caparaçonnées de plaques osseuses. Les formes caparaçonnées vers le bas de plaques osseuses comprennent 1 à 9 plaques osseuses latérales le long de la partie antérieure du corps et sont dépourvues d'une carène caudale (Wooton, 1976; Mattern, 2007). Les figures D-1 et D-2 illustrent les différences en matière de plaques osseuses latérales et de carène caudale entre les morphes caparaçonnées vers le bas de plaques osseuses et les morphes entièrement caparaçonnées de plaques osseuses. Les morphes entièrement caparaçonnées de plaques osseuses sont prédominantes chez les populations de poissons marins et anadromes, tandis que les morphes caparaçonnées vers le bas de plaques osseuses sont prédominantes chez les populations d'eau douce (Wootton, 1976, 1984; Mattern, 2007). Dans les eaux canadiennes, il n'est pas facile de décrire la répartition de la morphe partiellement caparaçonnée de plaques osseuses en ce qui a trait à l'association avec les habitats d'eau marine ou d'eau douce (Hagen et Moodie, 1982). Bien que les phénotypes (morphes caparaçonnées entièrement, partiellement et vers le bas de plaques osseuses) soient assez uniformes dans une population donnée, le nombre de plaques osseuses peut varier chez les individus et on sait que les populations constituées de plus d'une morphe sont présentes dans les milieux marins et d'eau douce (Wootton, 1984, 2009).

L'épinoche tachetée, *Gasterosteus wheatlandi*, est observée dans les eaux côtières de l'Atlantique nord-américain, et son apparence est semblable à celle de l'épinoche à trois épines (Scott et Scott, 1988). Les épinoches tachetées ont peu de plaques osseuses latérales (5 à 11) dans la région antérieure et sont dépourvues d'une carène caudale. Les taches noires distinctives sont souvent utilisées pour faire la distinction entre l'espèce *G. wheatlandi* et l'espèce *G. aculeatus* (Mattern, 2007), mais les observations récentes de poissons sauvages capturés ont révélé que ces taches noires ne peuvent pas être attribuées exclusivement à l'espèce *G. wheatlandi* (Karen Marks, Harris Industrial Testing Service, communication personnelle, 2016; Envirosphere, 2017). On examine attentivement également d'autres caractéristiques

morphologiques (p. ex. dans la nageoire et l'épine pelviennes) pour distinguer ces deux espèces similaires (figure D-3; Wootton, 1976).

Chez les poissons vivants, la carène caudale est une caractéristique morphologique qui peut être utilisée pour distinguer les épinoches à trois épines (présence de la carène caudale) des épinoches tachetées (absence de la carène caudale) et pour distinguer les morphes entièrement et partiellement caparaçonnées de plaques osseuses (présence de la carène caudale; voir figure D-2, photos b, c, d, e et f) des morphes caparaçonnées vers le bas de plaques osseuses (absence de la carène caudale; voir figure D-1, photos c et d). La carène caudale (ou carène du pédoncule caudal) se trouve sur les côtés du poisson, dans la région postérieure, juste à l'avant de la nageoire de la queue (ou caudale). Il s'agit d'une masse charnue qui parcourt horizontalement le corps du poisson et chez les morphes entièrement caparaçonnées de plaques osseuses, elle mesure généralement 0,1 à 0,8 cm de long et 0,02 à 0,06 cm de large (Envirosphere, 2017). Elle est visible à l'œil nu, et la manipulation minimale impliquée semble ne pas avoir d'effets dommageables sur le poisson.

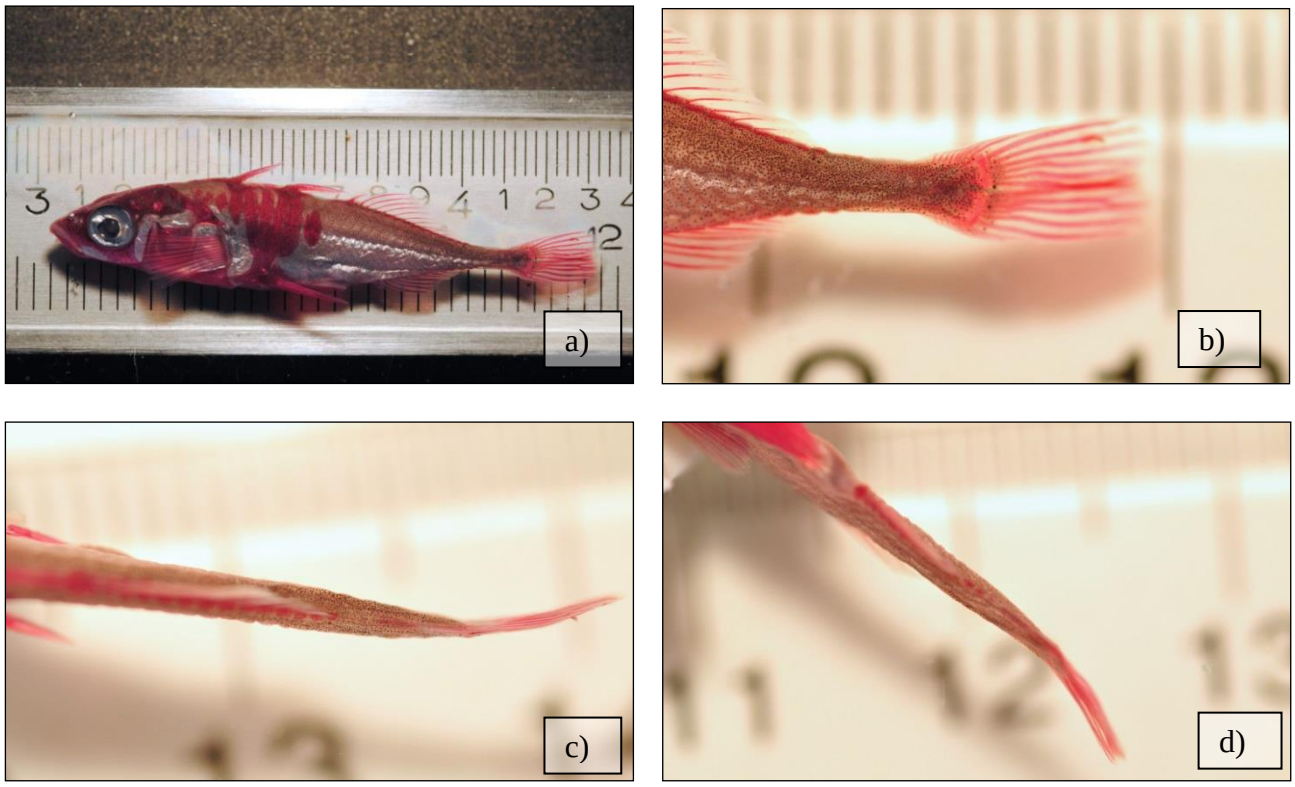


Figure D-1 Morphe caparaçonnée vers le bas de plaques osseuses de l'espèce *G. aculeatus*, teintée de rouge d'alizarine a) vue latérale, b) vue latérale de la région postérieure, c) vue supérieure de la région postérieure, d) vue inférieure de la région postérieure.
(Photos : P. L. Stewart)

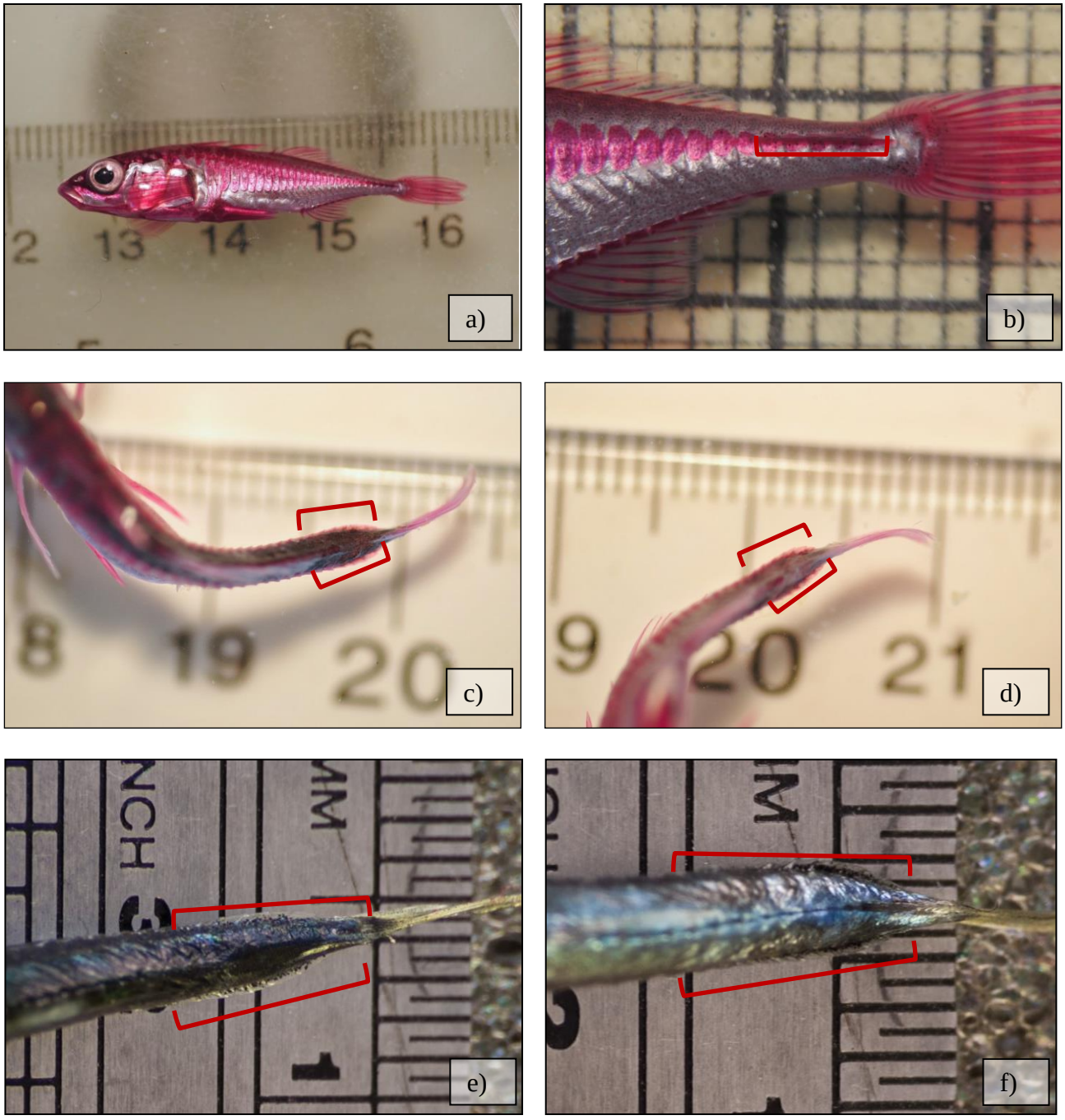
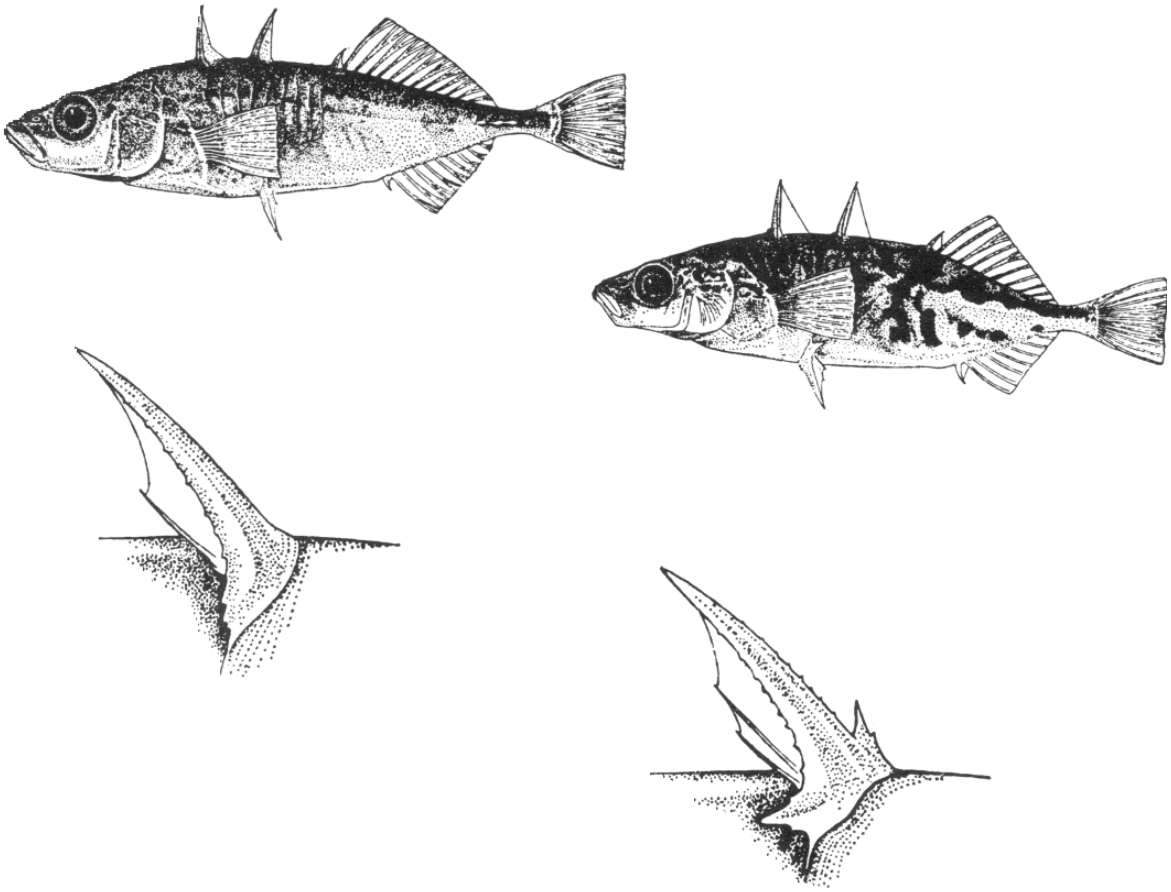


Figure D-2 Morphe entièrement caparaçonnée de plaques osseuses de l'espèce *G. aculeatus*, teintée de rouge d'alizarine (a à d) et non teintée (e et f). a) vue latérale, b) vue latérale de la région postérieure, c) vue supérieure de la région postérieure, d) vue inférieure de la région postérieure, e) vue supérieure de la région postérieure, f) vue inférieure de la région postérieure. Les crochets rouges indiquent la carène caudale. (Photos a, b, c et d : P. L. Stewart; photos e et f : C. Kidd)



Gasterosteus aculeatus
Épines dorsales : trois (rarement quatre); dernière épines courte; nageoire pelvienne d'une épine et un rayon mou, épine avec une pointe à la base; pédoncule caudal avec une carène; corps avec ou sans tâches noires rondes; couleur en vie : vert, bleu argenté.

Gasterosteus wheatlandi
Épines dorsales : trois (rarement deux); nageoire pelvienne d'une épine avec deux rayons mous, épine avec deux pointes bien développées à la base; pédoncule caudal sans carène; de nombreuses taches noires rondes sur les côtés; couleur en vie : jaune citron.

Figure D-3 Solution pour distinguer l'épinoche à trois épines (*G. aculeatus*) de l'épinoche tachetée (*G. wheatlandi*); l'agrandissement présente la région de la nageoire pelvienne. (Adaptée de Scott et Crossman, 1973 et de Scott et Scott, 1988)