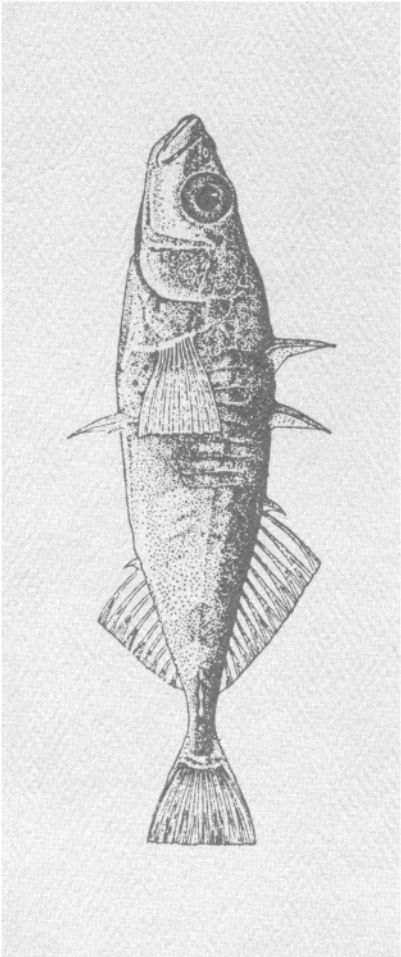
Série de la Protection de l'environnement



Méthode d'essai biologique :

essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines

(Gasterosteus aculeatus)

Rapport SPE 1/RM/10
Juillet 1990
(avec les modifications apportées en mars 2000)

Canada

Environnement Canada Environment Canada

Méthode d’essai biologique: essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines

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

Rapport SPE 1/RM/10
Juillet 1990
(avec les modifications apportées en mars 2000)

Données de catalogue avant publication (Canada)

Vedette principale au titre:

Méthode d'essai biologique: essai de létalité
aiguë sur l'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)*

(Méthode générique; SPE 1/RM/10)
Publ. en anglais sous le titre: Biological test method,
acute lethality test using threespine
stickleback *(Gasterosteus aculeatus)*.
Comprend des références bibliogr.
ISBN 0-662-96302-4
No. de cat. MAS En49-24/1-10F

1. Hydrobiologie -- Aspect de l'environnement.
2. Épinoche à trois épines --Toxicologie.
3. Mer -- Pollution. 4. Environnement --
Surveillance -- Canada. I. Canada. Direction
générale de la protection de l'environnement.
II. Canada. Environnement Canada. III. Rapport
(Canada. Environnement Canada); SPE 1/RM/10.
IV. Titre: Essai de létalité aiguë sur
l'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)*.

QH90.57B5514 1990 574.92 C90-098696-4

©Ministre des Approvisionnements et Services Canada 1990
No. de cat. En49-24/1-10F
ISBN 0-662-96302-4

Commentaires

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

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

This report is also available in English under the title *Biological Test Method: Acute Lethality Test Using Threespine Stickleback* (Gasterosteus aculeatus). For copies, please contact:

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

Résumé

Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour l'exécution d'essais de létalité sur l'épinoche à trois épines (Gasterosteus aculeatus) *acclimatée à l'eau de mer.*

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

Abstract

Methods recommended by Environment Canada for performing acute lethality tests with seawater-acclimated threespine stickleback (Gasterosteus aculeatus) *are descirbed in this report.*

General or universal conditions and test procedures are outlined for undertaking an acute lethality test using a variety of test materials. Additional conditions and procedures are stipulated which are specific for assessing samples of chemicals, effluents, elutriates, leachates, and receiving waters. Included are instructions on holding and acclimating test organisms, sample handling and storage, test facility requirements, procedures for preparing test solutions and test initiation, specified test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of caculation, and the use of reference toxicants.

Avant-propos

Le présent document fait partie d'une série de méthodes recommandées pour mesurer et évaluer les effets bioaquatiques de substances toxiques. Ces méthodes on été évaluées par la Direction de la protection de l'environnement (DPE); elles sont recommandées pour les applications suivantes:

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

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

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

Table des matières

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

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

Section 2
Organismes soumis à l'essai 4
2.1 Espèce 4
2.2 Cycle biologique et taille 4
2.3 Source 4
2.4 Détention et acclimatation 4
2.4.1 Installations 4
2.4.2 Éclairement 4
2.4.3 Eau 7
2.4.4 Température 8
2.4.5 Oxygène dissous 9
2.4.6 Alimentation 9
2.4.7 Nettoyage des réservoirs 9
2.4.8 Morbidité, mortalité et traitement des poissons 9

Section 3
Système d'essai 11
3.1 Installations 11
3.2 Éclairement 11
3.3 Réservoirs d'essai 11
3.4 Eau de contrôle/de dilution 11

Section 4
Méthodes d'essai universelles 13
4.1 Préparation des solutions d'essai 13
4.2 Mise en route de l'essai 16
4.3 Conditions de l'essai 17
4.3.1 Oxygène dissous et aération 17
4.3.2 pH 18

4.3.3 Salinité 19
4.4 Observations et mesures 19
4.5 Résultats et calculs 20
4.6 Produits toxiques de référence 23
4.7 Considérations juridiques 25

Section 5
Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques 26
5.1 Propriétés, étiquetage, transport et stockage des échantillons 26
5.2 Préparation des solutions d'essai 26
5.3 Eau de contrôle/de dilution 27
5.4 Observations et mesures 28
5.5 Résultats et calculs 28

Section 6
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons, d'effluents, d'élutriats et de lixiviats 29
6.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons 29
6.2 Préparation des solutions d'essai 29
6.3 Eau de contrôle/de dilution 30
6.4 Conditions de l'essai 31
6.5 Observations et mesures 32
6.6 Résultats et calculs 32

Section 7
Méthodes particulières pour l'essai d'échantillons de milieux récepteurs 33
7.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons 33
7.2 Préparation des solutions d'essai 33
7.3 Eau de contrôle/de dilution 33
7.4 Observations et mesures 34
7.5 Résultats et calculs 34

Section 8
Procès-verbal de l'essai 35
8.1 Substance à expérimenter 35
8.2 Organismes soumis à l'essai 35
8.3 Installations et appareils 36
8.4 Eau de contrôle/de dilution 36
8.5 Méthode d'essai 36
8.6 Conditions de l'essai 36
8.7 Résultats de l'essai 37

Références 38

Annexe A
Membres du Groupe intergouvernmental sur la toxicité aquatique et adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada 42

Annexe B
Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines 44

Annexe C
Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité 48

Annexe D
Termes convenant à la description de l'aspect et du comportement des poissons 49

Liste des tableaux

1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour la détention et l'acclimatation de l'épinoche à trois épines 6

2 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées 14

Liste des figures

1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptées à différents types de substances 2

2 Clé permettant de distinquer l'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)* de l'épinoche tachetée *(G. wheatlandi)* 5

3 Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique des mortalités sur papier de probabilité logarithmique 22

Liste des abréviations

°C . . . . . degré Celsius
CL50 . . . . . concentration létale 50
cm . . . . . centimètre
d . . . . . jour
EIT . . . . . Évaluation d'identification de la toxicité
g . . . . . gramme
h . . . . . heure
HCl . . . . . acide chlorhydrique
L . . . . . litre
MC . . . . . marque de commerce
mg . . . . . milligramme
min . . . . . minute
mL . . . . . millilitre
N . . . . . normal
NaOH . . . . . hydroxyde de sodium
OD . . . . . oxygène dissous (concentration)
SI . . . . . Système international d'unités
TL50 . . . . . temps létal 50
µ . . . . . micro
> . . . . . supérieur à
< . . . . . inférieur à
≥ . . . . . supérieur ou égal à
≤ . . . . . inférieur ou égal à
‰ . . . . . parties par millier (salinité)
± . . . . . plus ou moins

Glossaire

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

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit (doivent)* est utilisé pour exprimer une obligation absolue.

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

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

Termes techniques généraux

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

Conformité - Fait de respecter les exigences du governement en matière de réglementation ou de déliverance de permis.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Termes désignant les substances servant aux essais

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

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

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

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

Eau de mer artificielle - Eau douce à laquelle on a ajouté de la saumure hyperconcentrée en quantités reconstituant la salinité (et le pH) de l'eau de mer requise pour l'essai.

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

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

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

Eau estuarienne - Eau saumâtre des parties côtières des océans résultant de la dilution mesurable de l'eau de mer par l'eau douce apportée par les cours d'eau.

Eau marine - Eau de mer du large ou provenant du large et n'ayant pas subi de dilution appréciable par l'eau douce naturelle apportée par les cours d'eau.

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

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

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

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

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

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

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

Solution mère - Solution aqueuse concentrée de la substance à expérimenter. Des volumes mesurés de la solution de mère sont ajoutés à l'eau de dilution afin de préparer des solutions d'essai aux concentrations requises.

Termes de toxicologie

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

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

Essai à renouvellement périodique - Essai de toxicité pendant lequel les solutions d'essai sont renouvellées périodiquement, généralement aux 24 h.

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

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

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

Évident - Clairement discernable dans les conditions d'essai 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.

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

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

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

Toxicité - Capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs chez les poissons.

Toxicité aiguë - Effet nocif discernable (létal ou sublétal) provoqué chez les organismes soumis à l'essai dans une période d'exposition courte, généralement quatre jours ou moins dans le cas des poissons.

Remerciements

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

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

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

Les personnes suivantes, qui ont passé en revue la version définitive, 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 (ministère des Pêches et océans (MPO), Winnipeg, Man.), M. Nassichuk (MPO, Vancouver, C.-B.), I. Birtwell (MPO, West Vancouver, C.-B.), G. van Aggelen (ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, North Vancouver, C.-B.), G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton, Ont.), et P. Chapman (EVS Consultants Ltd., North Vancouver,
C.-B.).

Introduction

1.1 Contexte

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

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

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

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

L'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)*, espèce anadrome et d'eau douce commune, tolère les eaux marines, estuariennes et douces et vit principalement dans les eaux peu profondes. Ses habitats côtiers sont presque circumpolaires, mais elle préfère les zones tempérées et subarctique de l'hémisphère nord. L'espèce est largement présente sur toutes les côtes de cet hémisphère, exception faite de celles des mers arctiques froides. L'épinoche à trois épines fréquente la côte du Pacifique, de la Californie au nord-ouest de l'Alaska, ainsi que la côte de l'Atlantique, de la Nouvelle-Écosse au nord du Labrador (Hart, 1973; Scott et Scott, 1988).

G. aculeatus est utilisée depuis plusieurs années par les chercheurs d'Environnement Canada (annexe A) et d'autres laboratoires canadiens pour évaluer les effets toxiques aigus d'effluents rejetés dans les milieux marins et estuariens. Environnement Canada (SPE, 1985) et Pêches et Océans Canada (Wong, 1982) ont publié des protocoles pour la conduite d'essais de toxicité létale aiguë sur l'épinoche à trois épines acclimatée à l'eau de mer, afin d'évaluer les effets toxiques de rejets réels ou proposés de

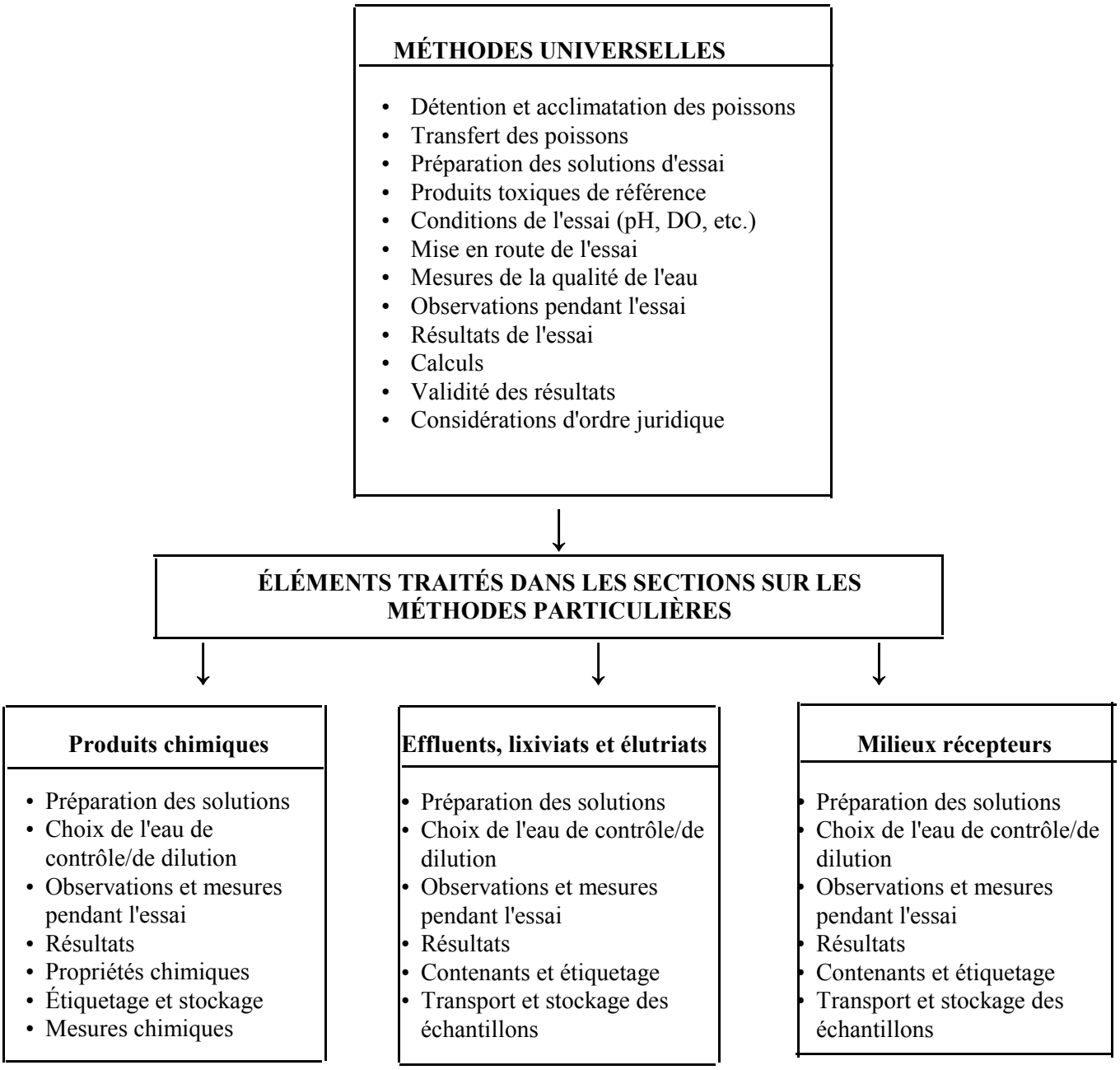


Figure 1 Schéma de la démarche adoptée pour définir les conditions et méthodes d'essai adaptée à différents types de substances

fluides de forage pétrolier dans le milieu marin canadien. Des chercheurs canadiens ont étudié la documentation rendant compte des résultats des essais de toxicité létale aiguë menés sur cette espèce (EVS, 1976) et, après comparaison d'essais menés avec cette espèce et d'autres espèces marines, ils ont recommandé l'utilisation de l'épinoche à trois épines pour les essais en eau de mer portant sur des contaminants aquatiques (EVS, 1977). *L'Environnemental Protection Agency des États-Unis* (EPA, 1975, 1985a) et *l'American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1980) en ont également recommandé l'utilisation pour la tenue d'essais de toxicité en eau marine ou estuarienne.

Voici en partie les raisons qui motivent ce choix:

- la biologie et l'histoire naturelle de l'épinoche à trois épines sont bien connues (Hart, 1973; Wootton, 1976; Purcell, 1979; Coad, 1981; Allen et Wootton, 1982);
- l'espèce est largement présente dans les eaux marines et estuariennes des côtes canadiennes (océans Atlantique, Pacifique et Arctique);
- elle se capture aisément et s'acclimate facilement aux conditions de laboratoire;
- elle est euryhaline et prospère dans un large éventail de salinités en laboratoire;
- la taille du poisson permet de mener à peu de frais les essais de toxicité létale aiguë; et
- l'espèce a déjà servi à des essais de toxicité de produits chimiques et d'eaux usées en eau de mer et en eau douce (van de Dikkenberg *et al.,* 1989), et des chercheurs ainsi que des responsables de la réglementation au Canada et aux États-Unis ont indiqué qu'elle se prêtait bien aux essais de toxicité en eau de mer.

La méthodologie exposée dans le présent rapport est conçue pour des poissons acclimatés à l'eau de mer et prévoit l'utilisation d'eau de mer comme eau de contrôle/de dilution. Selon l'objet de l'essai, cette eau de mer peut être artificielle ou naturelle, saumâtre (p. ex., d'une salinité comprise entre 10 et 20 ‰) ou intégralement salée. D'autres méthodes d'essai portant sur des poissons acclimatés à l'eau douce ou sur d'autres organismes sensibles d'eau douce permettent d'évaluer les effets toxiques létaux aigus des produits chimiques ou des eaux usées qui se trouvent dans les milieux d'eau douce, qui y sont rejetés ou qui sont destinés à l'être. L'annexe B donne un aperçu des variables et des méthodes exposées dans les rapports de méthodologie actuels concernant les essais de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines.

Organismes soumis à l'essai

2.1 Espèce

L'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)* doit être utilisée pour les essais.

2.2 Cycle biologique et taille

On peut utiliser des poissons de moins d'un an ou des juvéniles. Le poids frais moyen des poissons devrait être compris entre 0,2[a] et 3 g. Le plus gros poisson ne devrait pas être plus de deux fois plus long que le plus petit poisson soumis au même essai. Afin d'assurer un taux de chargement adéquat et l'uniformité de la taille des poissons soumis à l'essai, on devrait mesurer régulièrement la longueur et le poids frais moyens (± l'écart type) d'un échantillon représentatif de poissons (p. ex., mesurer chaque semaine au moins 10 poissons prélevés dans le réservoir de détention, ou mesurer les poissons témoins à la fin de l'essai).

2.3 Source

Tous les poissons servant à un essai devraient provenir de la même population et de la même source et doivent être exempts de maladies connues. Il peut s'agir des poissons d'élevage ou de poissons capturés dans des eaux côtières marines ou estuariennes puis acclimatés aux conditions de laboratoire. L'épinoche se capture bien au moyen de sennes de rivage, d'éperviers ou de nasses à vairon. L'obtention et l'expédition des poissons devraient être approuvées par le ministère fédéral des Pêches et Océans (MPO).

L'épinoche tachetée, *Gasterosteus wheatlandi*, ressemble à l'épinoche à trois épines et, dans les eaux côtières de l'Atlantique, peut être capturée en même temps que celle-ci (Scott et Scott, 1988). C'est pourquoi il y a lieu d'examiner les prises avec attention pour faire la distinction entre les deux espèces (figure 2), afin de garantir que seule *Gasterosteus aculeatus* est utilisée pour les essais.

2.4 Détention et acclimatation

Le tableau 1 fournit une liste de contrôle sommaire des conditions recommandées pour la détention et l'acclamatation de l'épinoche à trois épines.

2.4.1 Installations

Les poissons peuvent être élevés et acclimatés dans des bassins ou des réservoirs où l'eau peut s'écouler. Ces bassins ou réservoirs doivent être fabriqués de matériaux non toxiques comme l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester armé de fibre de verre, l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène. Ils devraient être à l'abri de toute agitation et se trouver, de préférence, dans un endroit séparé des réservoirs d'essai.

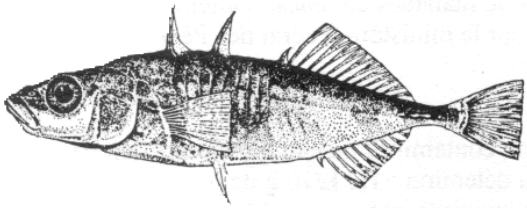
Les bassins ou réservoirs de détention (ou d'élevage) peuvent être à l'intérieur ou en plein air. Les réservoirs d'acclamatation des poissons à l'éclairement en laboratoire et aux autres conditions de l'essai devraient se trouver à l'intérieur; s'ils sont en plein air, on devrait les doter de couvercles munis d'appareils d'éclairage à réglage photopériodique.

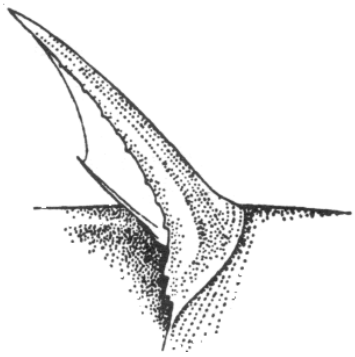
2.4.2 Éclairement

Selon les exigences et l'objet de l'essai, l'éclairement pendant l'acclamatation peut être naturel ou assuré par des appareils fluorescents

[a] Les jeunes poissons don't le poids moyen est inférieur à 0,2 g peuvent être utilisés pour les essais de toxicité, à condition de se nourrir activement depuis au moins deux semaines et d'avoir été acclimatés pendant cette période aux conditions d'éclairement, de température, et de salinité prévues pour l'essai.

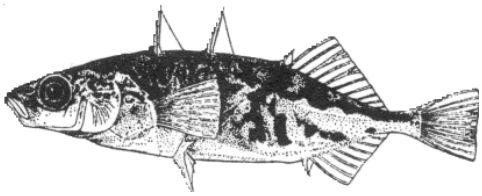
ÉPINOCHE À TROIS ÉPINES

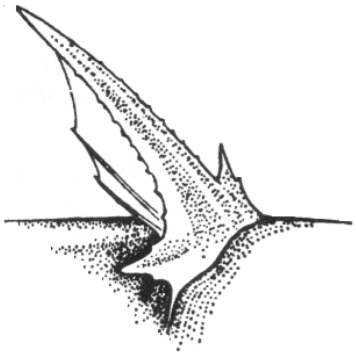




Trois épines dorsales (rarement quatre), la dernière étant courte; nageoires pelviennes à une épine et un rayon mou, l'épine ayant une cuspide basale; pédoncule caudal avec carène; corps sans taches noires rondes; couleur verte, bleue ou argentée.

ÉPINOCHE TACHETÉE





Trois épines dorsales (rarement deux); nageoires pelviennes à une épine et deux rayons mous, l'épine ayant deux fortes cuspides basales; pédoncule caudal sans carène; nombreuses taches noires rondes sur les côtés; couleur jaune citron.

Source : Scott et Crossman, 1973; Scott et Scott, 1988.

Figure 2 Clé permettant de distinguer l'épinoche à trois épines *(Gasterosteus aculeatus)* de l'épinoche tachetée *(G. wheatlandi)*

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions et méthodes recommandées pour la détention et l'acclimatation de l'épinoche à trois épines

Source de poissons	Poissons d'élevage ou capturés dans des eaux marines ou estuariennes et exempts de maladies connues. Obtention et expédition approuvée par le ministère fédéral des Pêches et Océans.
Eau	Eau de mer naturelle non contaminée ou eau de mer artificielle. Volume et débit pour la détention : 1,0 L/g de poissons et 1,4 L/g de poissons par jour respectivement. Idéalement, salinité correspondant, à 5 ‰ près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution, pour au moins deux semaines.
Température	Température favorisant la santé des poissons. Température d'acclimatation obtenue à raison d'au plus 3 °C/d et maintenance à 10 ± 2 °C pendant au moins deux semaines.
Oxygénation/aération	Oxygène dissous de 80 à 100 % de saturation, maintenu au besoin par aération avec de l'air filtré exempt d'huile.
Éclairement	Éclairage fluorescent (ou équivalent) en spectre continu, entre 100 et 500 lux à la surface; lumière pendant 16 ± 1 h, obscurité pendant 8 ± 1 h, avec transition progressive de préférence.
Alimentation	Au moins une fois par jour, avec des aliments commerciaux standard en boulettes ou en flocons, du poisson frais haché ou des artémias. La nourriture doit être stockée ou congelée conformément aux recommandations du fabricant.
Nettoyage	Siphonnage des débris tous les jours ou selon les besoins; transfert dans des réservoirs propres et désinfectés, si nécessaire.
Maladie	Les mortalités doivent être surveillées chaque jour et les poissons moribonds doivent être enlevés. Le taux de mortalité du groupe de poissons devant être soumis à l'essai doit être inférieur ou égal à 1 % par jour pour chaque tranche de sept jours précédant l'essai. Les poissons qui ont été traités ne doivent pas être utilisés pour des essais pendant deux semaines après le traitement.
Observations et mesures	La température, l'oxygène dissous, le pH, la salinité, le débit et les mortalités devraient être mesurés et consignés, de préférence chaque jour.

suspendus à spectre continu[b]. Si un réglage photopériodique est nécessaire, la photopériode devrait normalement correspondre à une séquence constante de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité. L'éclairement à la surface devrait être entre 100 et 500 lux. Une période de transition de 15 à 30 minutes entre la lumière et l'obscurité est recommandée pour l'éclairement artificiel[c]. Les poissons devraient être acclimatés à des conditions d'éclairement (y compris la photopériode et l'intensité lumineuse) conformes aux conditions de l'essai pendant deux semaines au moins, et, de préférence, trois semaines ou plus avant l'essai.

2.4.3 Eau

L'eau de mer artificielle (reconstituée) devrait être préparée par ajout de saumure hyperconcentrée (SHC) à de l'eau douce appropriée, en quantités permettant d'obtenir la salinité voulue. L'utilisation de SHC obtenue d'une source d'eau de mer naturelle est recommandée (EC, 1997). La saumure hyperconcentrée peut aussi être préparée avec des sels de mer déshydratés commerciaux (p. ex., Forty Fathom™, Instant Ocean™, ou Rila Marine Mix™) ou des sels de qualité « réactif » (p. ex., *GP 2 modifiés* : voir tableau 8 dans EPA, 1993).

Si la SHC est préparée avec des sels de mer, il faudrait s'assurer de la qualité et de la régularité d'un lot donné de ces sels avant de procéder à l'essai. Certains chercheurs sont d'avis que certains lots de sels de mer peuvent avoir des effets toxiques indésirables ou avoir un effet séquesterant sur les substances soumises à l'essai. On recommande de procéder au préalable à un essai de 96 h pour surveiller la survie, l'aspect et le comportement d'un groupe ou plus de réplicats d'épinoche à trois épines détenues dans l'eau de contrôle/de dilution dont la salinité est ajustée avec de la SHC obtenue du lot de sels de mer commerciaux en question.

Selon les résultats de l'essai préablable, le lot de sels de mer étudié pourrait être utilisé pour la préparation de la SHC qui servira à l'ajustement de la salinité désirée.

On peut aussi ajouter des sels déshydratés à de l'eau de mer naturelle pour en augmenter la salinité jusqu'au niveau désiré.

La préparation de l'eau de mer artificielle peut se faire au moyen d'eau désionisée, d'eau distillée, d'eau de surface ou souterraine non contaminée ou encore d'eau potable municipale déchlorée. Si l'on utilise de l'eau douce naturelle ou de l'eau municipale, il y a également lieu d'en contrôler et d'en évaluer la qualité. Il est recommandé à cet égard de mesurer, pour chaque lot d'eau de mer artificielle préparé, des variables comme le chlore résiduel (si l'on utilise de l'eau municipale), le pH, la salinité, les solides en suspension, l'oxygène dissous, les gaz totaux dissous, la température, l'azote ammoniacal, les

---

[b] Des fluorescents ou autres tubes à spectre continu, complétés au besoin d'un éclairage naturel extérieur, devraient être utilisés pour reproduire la portion visible de la lumière naturelle. À noter cependant que l'intensité de la radiation ultraviolette (UV-B) obtenue avec un éclairage fluorescent blanc froid ou des fluorescents à spectre continu ne se rapproche pas de celle obtenue avec un éclairage naturel, et que la toxicité de certains effluents et produits chimiques peut être fortement altérée par des réactions photolytiques causées par les rayons UV-B. Pour certains essais (p. ex., photoactivation ou photodégradation de matières toxiques par rayons UV), des éclairages spéciaux (p. ex., lampes à vapeur de mercure haute pression) dotés de caractéristiques spectrales différentes peuvent convenir. Des informations utiles à ce sujet sont données dans la publication de l'ASTM (1996). Les études visant à déterminer l'influence de l'éclairement sur la toxicité pourraient comprendre des comparaisons juxtaposées avec des réplicats de solutions exposées à des conditions d'éclairement différentes (p. ex., éclairage fluorescent à spectre continu *versus* lampe à vapeur de mercure haute pression).

[c] Une période de transition (« aube et crépuscule ») est recommandée, étant donné que des changements brusques d'intensité ont pour effet d'effrayer et de stresser les poissons. Il existe des systèmes de rhéostats automatisés pour diminuer et accentuer l'intensité de l'éclairage fluorescent; ces systèmes sont cependant coûteux. On peut également utiliser une source secondaire d'éclairage incandescent, réglée par minuterie et rhéostat automatisé, afin d'assure cette période de transition.

nitrates, les métaux, les pesticides organophosphorés totaux et la teneur totale en composés organochlorés.

S'il faut utiliser de l'eau potable municipale pour préparer de l'eau de mer artificielle, on doit assurer une déchloration efficace de l'eau à laquelle les poissons sont exposés, de sorte qu'elle soit exempte de toute concentration nocive de chlore. La teneur en chlore résiduel de l'eau dans les bassins d'élevage et de l'eau de contrôle/de dilution dans les réservoirs d'essai ne devrait pas dépasser 0,002 mg/L (CCMRE, 1987). On peut procéder à une aération vigoureuse de l'eau (avant de l'acheminer par pompage dans les réservoirs de détention ou d'acclimatation) afin de la débarasser du chlore volatil. Il est recommandé d'utiliser des filtres au charbon activé (Armstrong et Scott, 1974) pour enlever la chloramine résiduelle et les autres composés organiques chlorés[d].

Il faut assurer un débit d'eau constant dans les réservoirs de détention et d'acclimation. Pour empêcher l'accumulation de déchets métaboliques, on devrait admettre dans le réservoir au moins 1 L/min d'eau de mer fraîche par kilogramme de poissons détenus (soit 1,4 L/g de poissons par jour ou 0,69 g de poissons/jour/L)[e]. De plus, pour éviter le surpeuplement, le réservoir devrait renfermer, en tout temps, au moins 1 L d'eau pour chaque tranche de 10 g de poissons détenus (Sprague, 1973). Des circonstances telles que l'acclimatation des poissons à l'eau de mer artificielle ou un approvisionnement limité en eau de mer, peuvent nécessiter la filtration et la recirculation de l'eau, ou encore son renouvellement périodique dans des systèmes statiques. En pareil cas, il faudrait mesurer fréquemment l'ammoniac et les nitrites afin d'assurer qu'ils n'atteignent pas de niveaux nocifs.

L'eau qui entre dans les réservoirs de détention et d'acclimatation ne devrait pas être saturée en gaz. Lorsqu'il y a lieu de croire qu'il y a sursaturation, on devrait vérifier fréquemment la pression de gaz totale de l'alimentation en eau (Bouck, 1982). Il faudrait recourir à des mesures correctives (p. ex., l'utilisation de colonnes d'aération ou une aération vigoureuse dans un réservoir ouvert) si la teneur en gaz dissous dépasse 100 % de saturation.

Idéalement, les poissons devraient être acclimatés pendant au moins deux semaines à de l'eau de mer d'une salinité correspondant, à 5 ‰ près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution destinée à l'essai. Des données inédites récentes*, obtenues au moyen de produits toxiques de référence et de salinités différentes des salinités d'acclimatation, indiquent toutefois que cela pourrait ne pas constituer un facteur critique dans les essais de létalité aiguë.

On devrait contrôler régulièrement, de préférence tous les jours, la température de l'eau de chaque bassin d'acclimation ou de détention ainsi que sa teneur en oxygène dissous, sa salinité, son pH et son débit. Il est aussi recommandé de contrôler chaque semaine, ou plus fréquemment, la teneur de l'eau en ammoniac en nitrites.

2.4.4 Température

La température de l'eau pour la détention de populations de poissons en vue d'essais ultérieurs peut se situer en dehors des limites admissibles

---

[d] On ne devrait pas se servir de thiosulfate ou d'autres produits chimiques pour enlever le chlore résiduel dans la préparation de l'eau de mer artificielle devant servir d'eau de dilution. Ces produits chimiques pourraient modifier la toxicité de l'échantillon.

[e] Au besoin (par exemple, si les poissons doivent être acclimatés à de l'eau de mer artificielle ou à un milieu récepteur dont la quantité est restreinte), on peut réduire considérablement les besoins d'eau pour l'acclimatation en faisant recirculer l'eau dans le réservoir après l'avoir fait passer par un filtre adapté à l'élimination des déchets métaboliques.

* Environnement Canada, région de l'Atlantique (adresse à l'annexe A).

pour l'essai, à condition d'être compatible avec la santé des poissons. Lorsqu'on prépare un lot de poissons pour la période d'acclimatation, on peut modifier la température de l'eau à raison d'au plus 3° C/d jusqu'à ce que la température d'acclimatation de 10 ± 2° C [f] soit atteinte. Les poissons devraient être acclimatés à cette température pendant au moins deux semaines, de préférence, pendant plus de trois semaines avant le début de l'essai.

2.4.5 Oxygène dissous

La teneur en oxygène dissous (OD) de l'eau des réservoirs de détention et d'acclimatation devrait correspondre à 80 à100 % de saturation en air. S'il est nécessaire de maintenir ce niveau d'OD, on devrait assurer une aération complémentaire des réservoirs au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile.

2.4.6 Alimentation

L' épinoche à trois épines se nourrit de divers aliments en laboratoire. On peut lui donner une ration quotidienne de poisson frais haché, de flocons pour poissons tropicaux ou d'autres aliments pour poissons disponibles dans le commerce; ce régime peut être complété avec des artémias (SPE, 1985). Selon la température de l'eau et leur taille, les poissons devraient être nourris une ou plusieurs fois par jour. Une ration quotidienne correspondant (en poids de nourriture sèche) à 1 à 5 % du poids frais est recommandée à titre de ligne directrice, mais on peut la modifier en fonction du type de nourriture et des habitudes alimentaires des poissons. La méthode et la durée maximale de stockage de la nourriture commerciale devraient être conformes aux recommandations du fabricant.

2.4.7 Nettoyage des réservoirs

Les bassins et réservoirs utilisés pour la détention et l'acclimatation des poissons devraient rester propres. Une fois par jour, ou aussi souvent que nécessaire, il faudrait siphonner la nourriture excédentaire et les excréments, afin d'éviter qu'ils ne s'y accumulent. Il est recommandé de recourrir à des modèles de réservoirs qui assurent un autonettoyage partiel (p. ex., ceux qui sont dotés de colonnes d'alimentation doubles et centrales), puisqu'ils permettent de réduire les exigences d'entretien.

Afin de diminuer la fréquence des maladies, il faudrait désinfecter les réservoirs avant d'y déposer un nouveau lot de poissons. Les désinfectants appropriés comprennent ceux qui renferment des composés chlorés ou iodophores, ou du chlorure de n-alkyldiméthylbenzylammonium (p. ex., Comet[MC], Ovidine[MC], Argentyne[MC] ou Roccal[MC]). Étant donné que les désinfectants sont toxiques pour les poissons, les réservoirs devraient ensuite être rincés à fond avec l'eau servant à la détention et à l'acclimatation des poissons.

2.4.8 Morbidité, mortalité et traitement des poissons

Il faudrait inspecter chaque jour les poissons afin de détecter des signes de maladie[g]. Les individus morts ou moribonds devraient être enlevés immédiatement. Pendant la période de sept jours précédent l'essai, le taux de mortalité doit être inférieur à 1 % par jour dans les réservoirs d'où proviennent les poissons soumis à l'essai. Si ce taux est supérieur, la durée d'acclimatation devrait être prolongée d'au moins 7 jours tant et aussi longtemps que le taux de mortalité dépasse 1 % par jour pour chacun des 7 jours qui

---

[f] Une température d'acclimatation et d'essai inférieure (p. ex., 5° C) ou supérieure (p. ex., 15° C) peut convenir mieux pour l'étude de la toxicité de substances ayant entré ou risquant d'entrer dans de l'eau de mer très froide ou plus tempérée.

[g] 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, un coloration foncée, des branchies pâles, des nageoires rongées ou effliloches et des lésions externes.

précèdent immédiatement l'utilisation des poissons dans l'essai.

Il faudrait éviter, dans la mesure du possible, d'utiliser des produits chimiques pour prévenir et contrôler les maladies chez les poissons. Il est fortement recommandé de se départir des stocks de poissons qui présentent des signes de maladie, plutôt que de les traiter. Si l'on est contraint d'utiliser des poissons traités avec des produits chimiques, il faudrait attendre au moins deux semaines avant de les utiliser dans des essais. Des dossiers rapportant tout traitement appliqué à des poissons destinés à des essais devraient être obtenus des piscicultures, et de tels dossiers devraient être gardés tout au long de la période de détention et d'acclimatation dans les installations d'essai.

Système d'essai

3.1 Installations

L'essai doit être réalisé dans une installation isolée des allées et venues générales du laboratoire. S'il n'existe pas de pièce isolée, la zone d'essai devrait être entourée d'un rideau opaque (p. ex., en plastique noir), afin de réduire le stress infligé aux poissons pendant l'essai. La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum.

Il faut prévoir une installation d'essai permettant de maintenir la température de toutes les solutions d'essai dans l'intervalle précisé (10 ± 2° C), sauf indication contraire. On peut y arriver par différents moyens, notamment un appareil de conditionnement de l'air réglé par thermostat ou une série de bains-marie à température contrôlée dans lesquels les réservoirs d'essai sont immergés.

3.2 Éclairement

Les conditions d'éclairement auxquelles les poissons sont soumis devraient être identiques à celles définies à la section 2.4.2. La photopériode doit être établie pour coïncider avec celle à laquelle les poissons ont été acclimatés.

3.3 Réservoirs d'essai

Les réservoirs pour l'essai de produits chimiques devraient être en verre[h] (bocaux ou aquariums, selon la taille et le nombre de poissons par contenant). Les réservoirs pour l'essai d'échantillons d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs peuvent être en verre, en Plexiglas, en acrylique, en polypropylène ou en polyéthylène, ou être revêtus de polyéthylène. Si des revêtements jetables sont utilisés dans les réservoirs, il n'est pas nécessaire de les rincer avec de l'eau de contrôle/de dilution, mais il ne faut pas les réutiliser.

Tous les réservoirs d'essai doivent contenir au moins 15 cm d'eau. Dans un même essai, la profondeur de l'eau ainsi que le type, les dimensions et la forme des contenants doivent être identiques pour toutes les solutions d'essai.

3.4 Eau de contrôle/de dilution

Selon la substance à expérimenter et l'objet de l'essai (sections 5 à 7), l'eau de contrôle/de dilution peut être : de l'eau de mer « non contaminée »; de l'eau de mer artificielle ; de l'eau de mer naturelle à laquelle on a ajouté de la saumure hyperconcentrée (pour en ajuster la salinité); ou un échantillon de milieu récepteur recueilli à proximité de la source de contamination, mais à l'abri de son influence. Les conditions relatives au prélèvement, au transport et au stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1.

L'eau de contrôle/de dilution doit être ramenée à la température de l'essai avant d'être utilisée. La sursaturation en gaz de cette eau devrait être évitée.

Avant son utilisation, l'eau de contrôle/de dilution devrait avoir une teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de la valeur de saturation en air. Au besoin, le volume nécessaire d'eau de contrôle/de dilution devrait être aéré

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

vigoureusement (à l'aide d'un jet d'air comprimé exempt d'huile passant à travers des pierres de barbotage immédiatement avant l'utilisation; il faudrait alors en vérifier la teneur en oxygène dissous pour confirmer qu'un niveau de 90 à 100 % de saturation a été atteint.

Méthodes d'essai universelles

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

Le tableau 2 fournit une liste de contrôle récapitulative des conditions et méthodes recommandées pour les essais de toxicité létale aiguë sur l'épinoche à trois épines. On y tient compte des méthodes recommandées pour les essais portant sur des types de substances particuliers.

4.1 Préparation des solutions d'essai

Tous les réservoirs, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et seaux pour le transfert des poissons dovient être nettoyés et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés. Chaque réservoir d'essai devrait être rincé avec de l'eau de contrôle/de dilution juste avant son utilisation*.

Les concentrations d'essai et le nombre de solutions à préparer dépendent de l'objet de l'essai. Lorsqu'on veut estimer une CL50 après 96 h, il faut préparer au moins cinq concentrations d'essai et une solution de contrôle (eau de dilution à 100 %)[i]. On peut utiliser un série géométrique de dilutions, dans laquelle chaque concentration successive s'établit à envrion 50 % de la précédente (p. ex., 100, 50, 25, 12,5, 6,3), afin de faciliter le calcul précis de la CL50 et de ses limites de confiance à 95 %. On peut aussi choisir les concentrations d'essai à partir d'une série logarithmique appropriée de dilutions (annexe C).

Si l'on utilise un milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution, il faudrait préparer une deuxième solution de contrôle en utilisant l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés pendant deux semaines ou plus. On ne peut utiliser un milieu récepteur s'il est manifestement toxique selon les critères de l'essai auquel il est destiné[j]; en pareil cas, on devrait utiliser de l'eau de mer artificielle (section 2.4.3) ou de l'eau de mer naturelle « non contaminée » du laboratoire comme eau de contrôle et pour l'ensemble des dilutions.

Pour un essai donné, il faut utiliser la même eau afin de préparer la solution de contrôle et toutes les concentrations d'essai. 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 ou un autre dispositif fait d'un matériau non toxique. Par la suite, chaque solution, y comprise les solutions de contrôle, devrait être aérée légèrement à raison d'au plus 6,5 mL/min · L (section 4.3.1).

Si l'on utilise de l'eau de mer comme eau de contrôle/de dilution, elle devrait être préparée soit avec de la saumure hperconcentrée (SHC) obtenue d'une source d'eau de mer naturelle non contaminée ou de la SHC préparée avec des sels de mer commerciaux ou des sels de qualité

* Le rinçage n'est pas nécessaire si l'on utilise un revêtement de polyéthylène jetable.

[i] On peut procéder à un essai préalable de détermination de l'ordre de grandeur avant d'entreprendre l'essai définitif; cet essai porte généralement sur une gamme de concentrations plus vaste et se déroule fréquemment en 24 h ou moins. Afin d'établir la CL50 finale, chaque essai doit comprendre une ou plusieurs solutions de contrôle.

[j] Une comparison de l'aspect, du comportement et de la survie des poissons dans cette eau de contrôle, par rapport au milieu récepteur de contrôle, permet de distinguer les réactions de toxicité qui pourraient être attribuables à la présence de contaminants dans le milieu récepteur.

Tableau 2 Liste de contrôle des conditions et méthodes d'essai recommandées

Méthodes Universelles	
Type d'essai	Statique, durée de 96 h*.
Eau de contrôle/ de dilution	Eau de mer «non contaminée » du laboratoire; eau de mer artificielle s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; milieu récepteur «en amont» pour évaluer l'effet toxique à un endroit précis**; oxygène dissous (OD) de 90 à 100 % de saturation au moment de l'utilisation; idéalement, salinité égale, à 5 % près, à celle de l'eau d'acclimatation.
Poissons	Poissons de moins d'un an ou juveniles; poids moyen de 0,1 à 3 g; en principe, au moins 10 poissons par solution d'essai; densité de chargement ≤ 0,5 g/L pour un essai de quatre jours.
Profondeur de la solution	15 cm au minimum.
Température	10 ± 2°C (sauf indication contraire).
Oxygène/aération	Au moment de la préparation, préaérer les solutions d'essai pendant 30 minutes à raison d'au plus 6,5 mL/min · L si requis ou si necessaire (*cf.* 5.2, 6.2 et 7.2). Par la suite et seulement en cas de nécessité, préaérer chaque solution au même débit, pendant au plus 90 minutes ou moins si l'on a obtenu dans un temps plus court ≥ 70 % de saturation dans la solution d'essai à la concentration la plus élevée. Aérer les solutions au même rythme pendant l'essai.
pH	Aucune correction si le pH de la solution d'essi est compris entre 6,5 et 8,5***; un deuxième essai (à pH corrigé) peut s'avérer nécessaire ou pertinent si le pH de l'échantillon ou de la solution n'est pas compris dans cet intervalle.
Éclairement	À spectre continu; 100–500 lux à la surface; normalement, 16 ± 1 h de lumière : 8 ± 1 h d'obscurité; de préférence avec transition progressive.
Alimentation	Ne pas nourrir les poissons dans les 16 h qui précèdent immédiatement l'essai, ni pendant l'essai.
Observations	Mort, aspect et comportement des poissons; au moins à 24, 48, 72 et 96 h.
Mesures	Température, pH et OD, au moins au début et à la fin de l'essai (de préférence, chaque jour); salinité, au moins début de l'essai.
Résultats	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai et la substance à expérimenter; il peut s'agir d'établir la CL50 après 96 h (nécessitant des limites de confiance à 95 %) ou d'un essai à concentration unique (pourcentage de mortalité à 96 h ou moins; TL50).
Produit toxique de référence	Phénol ou zinc (en équivalents de sulfate de zinc); effectuer un essai statique de CL50 après 96 h aussitôt les poissons acclimatés et moins chaque mois ultérieurement.
Validité de l'essai	L'essai n'est pas valable si plus de 10 % des poissons témoins meurent ou ont un comportement atypique ou stressé.
Produit Chimiques	
Solvants	À uitliser seulement dans des cas particuliers.

Concentration	Il est recommandé de mesurer la concentration au début et à la fin de l'exposition, dans les solutions à teneur supérieure, moyenne et inférieure et dans les solutions de contrôle; si les concentrations diminuent de plus de 20 %, réévaluer en utilisant un essai à renouvellemnt continu ou périodique.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformement aud précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau de mer artificielle s'il faut assurer un degré élevé de normalisation; milieu récepteur pour étudier les effets toxiques locaux; sinon, eau de mer du laboratoire.
Effluents et Lixiviats	
Transport et stockage	Transport à la température ambiante (plus de 1°C, moins de 30 °C) ou entre 1 et 8°C si le délai de transport est supérieur à deux jours; les échanillons ne devraient pas geler pendant le transport et devraient être stockés dans l'obscurité entre 1 et 8°C (de préférence à 4 ± 2° C); l'essai devrait commencer dans les trois jours et doit être mis en route dans les cinq jours du prélèvement des échantillons.
Eau de contrôle/ dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau de laboratoire ou de milieu récepteur «en amont» pour les essais de surveillance et de conformité.
Solides ou élements flottants à forte densité	On peut décider de recirculer les solutions d'essai.
Salinité	N'est normalement pas corrigée; si l'échantillon est essentiellement consitué d'eau douce (salintité inférieure à 5 ‰) et si l'on veut étudier la contibution de la salintié à sa toxicité, mener un deuxième essai en corrigeant la salinité pour qu'elle corresponde, à 5 ‰ près, à celle de l'eau de contrôle/de dilution.
Élutriats	
Transport et stockage	Procéder à l'extraction dans les sept jours de la réception des échantillons; conserver dans l'obscurité entre 1 et 8°C (de préférence à 4 ± 2°C); effectuer l'essai dans les dix jours de la réception des échantillons.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; eau de mer artificielle s'il faut assurer un degré élevé de normalisation.
Salinité	Comme pour les effluents et lixiviats.
Milieux recepteurs	
Transport et stockage	Comme pour les effluents et lixiviats.
Eau de contrôle/ de dilution	Conformément aux précisions fournies ou selon l'objet de l'essai; milieu récepteur «en amont» pour les efftets locaux.

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

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

*** Si le pH n'est pas compris dans cet intervale, les résultats peuvent indiquer une toxicité attributable à un pH bilogiquement nocif.

« réactif » (*cf.* 2.4.3 et 4.3.3). Toute SHC préparée avec des sels de mer commerciaux ou de qualité « réactif » doit être filtrée (≤ 1µm), aérée au cours de la nuit, puis couverte et entreposée à l'obscurité à 4 ± 2° C pendant une semaine au moins avant emploi (EC, 1997). De plus, avant d'utiliser de l'eau de mer artificielle pour préparer la SHC ou l'eau de contrôle/de dilution, le personnel de laboratoire doit faire la preuve qu'il peut rencontrer les critères spécifiques à l'essai, pour qu'un essai conduit avec de l'eau de mer artificielle viellie soit condiéré valide [cf. 4.3 (EC, 1997)].

4.2 Mise en route de l'essai

Chaque réservoir placé dans l'installation d'essai doit porter un code ou une étiquette précisant clairement la substance à expérimenter et sa concentration, ainsi que la date et l'heure du début de l'essai. Les réservoirs devraient être placés de manière à pouvoir facilement observer le comportement et la mortalité des poissons. Les solutions d'essai devraient être placées selon un ordre aléatoire (Sprague, 1973). Il est recommandé de couvrir au besoin les réservoirs d'essai avec des plaques de verre ou des grilles propres et non toxiques, afin d'empêcher les poissons de s'échapper. On devrait avoir recours à des plaques de verre si l'on craint que des contaminants en provenance d'autres sources entrent dans les solutions d'essai ou que des substances volatiles s'échappent de celles-ci. La température, l'oxygène dissous, la salinité et le pH de l'eau des réservoirs devraient être vérifiés et, si cela est nécessaire ou permis, corrigés pour s'établir à des valeurs admissibles avant qu'on y dépos les poissons.

Il est recommandé de prévoir au moins dix poissons par solution d'essai, quoique certaines circonstances peuvent justifier un nombre moins élevé[k]. Les poissons doivent être déposés en nombres égaux dans chaque solution d'essai et de contrôle. Ils peuvent être répartis entre deux réservoirs ou plus, de façon à respecter la densité de chargement requise de ≤0,05 g/L[l]. L'ordre

---

[k] La réduction de dix à sept du nombre de poissons par solution d'essai donne lieu à une perte minimale de précision dans le calcul de la CL50 (Douglas *et al.*, 1986). Cette démarche peut s'avérer nécessaire et admissible dans les cas où l'on calcule des CL50 et où l'on ne dispose pas d'assez de poissons pour en utiliser dix par solution.

Lorsque le volume d'échantillons est insuffisant pour qu'on maintienne la densité maximale de chargement de poissons (c.-à-d., ≤0,5 g/L) en utilisant dix poissons par solution d'essai, on pourrait à la rigueur utiliser moins de poissons par solution. La réponse obtenue sera exacte mais moins précise cependant; le dépassement de la densité de chargement entraînera en revanche un résultat inexact.

[l] Le poids frais total des poissons dans toute solution d'essai ou de contrôle ne doit pas dépasser 0,5 g/L pour cet essai de quatre jours en conditions statiques. Une densité inférieure de chargement de poissons pourrait être utilisée couramment, chaque fois que possible, pour réduire l'accumulation de déchets métaboliques et l'appauvrissement des produits toxiques de l'eau par les poissons. Une densité convenable de 0,125 g a été suggérée pour un essai de quatre jours.

Une densité supérieure de chargement de poissons peut réduire la toxicité apparent de certains échantillons. Des densités maximales de 0,4 g/L (Davis et Mason, 1973) et de 0,5 g/L (Craig et Beggs, 1979) ont été recommandées pour les essais de quatre jours, parce que des valeurs plus élevées entraînent une survie prolongée ou des CL50 supérieures pour les poissons exposés à des effluents ou des produits chimiques.

Les essais statiques recommandés ici peuvent indiquer une toxicité inférieure à celle que mesurait un essai à renouvellement continu. Les effluents des usine de pâte kraft blanchie peuvent ne révéler que la moitié de leur toxicité aiguë dans un essai statique, par rapport à un essai à renouvellement continu (Walden *et al.,* 1975). Les effluents très toxiques peuvent présenter une toxicité quatre fois plus grande dans des essais à renouvellement continu, mais la différence peut être faible pour les effluents légèrement toxiques (Loch et MacLeod, 1974).

La densité de chargement recommandée dans le présent document est donc considérée comme un maximum admissible. Comme on réalise des essais statiques, il faut tenir compte du fait que l'utilisation de ce chargement maximal pourrait influencer la toxicité apparent. Dans les deux cas, il s'agit de compromise qui tiennent compte de l'économie d'acheimer de échantillons de petit taille aux laboratoires d'essai. En raison de la variabilité quotidienne

d'introduction des poissons dans les réservoirs d'essai devrait être aléotoire et établi au préalable. Chaque poisson ne doit être utilisé qu'une seule fois comme organisme soumis à l'essai ou comme organisme témoin.

Les poissons dans les réservoirs d'acclimatation ne devraient pas être nourris pendant les 16 h au moins qui précèdent l'essai. Afin de réduire le stress, on devrait les transférer le plus rapidement possible du réservoir d'acclimatation aux réservoirs d'essai. Il faut éliminer tous les poissons qu'on échappe ou qui sont blessés pendant le transfert. Si les épuisettes entrent en contact avec les solutions d'essai, elles devraient être rincées (avec de l'eau de dilution) entre les transferts. L'eau 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 pour le dépôt des poissons dans les réservoirs d'essai.

4.3 Conditions de l'essai

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

La température d'essai devrait être de 10 ± 2°C, sauf indication contraire [f].

Chaque réservoir d'essai doit contenir au moins 15 cm de solution d'essai. La densité de chargement dans chaque réservoir d'essai ne doit pas dépasser 0,5 g/L.

Chaque solution d'essai, y compris la ou les solutions de contrôle, doit être aérée au rythme de 6,5 ± 1 mL/min · L.

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

L'essai n'est pas valable si plus de 10 % des poissons dans l'eau de contrôle meurent ou laissent apparaître un comportement de nage atypique, par exemple des mouvements convulsifs, une nage rapide à la surface ou une perte d'équilibre (annexe D).

4.3.1 Oxygène dissous et aération

Selon la substance testée ou les objectifs de l'étude, la préaération de chaque solution d'essai (y compris la ou les solutions de contrôle) dans des conditions définies immédiatement avant l'introduction des poissons dans les récipients d'essai pourrait être recommandée ou exigée (*cf.* 5.2, 6.2 et 7.2). Dans les cas où la préaération est recommandée ou requise, chaque solution, y compris la ou les solutions de contrôle, doit être aérée faiblement pendant 30 minutes au rythme de 6,5 ± 1 mL/min · L. On devrait immédiatement après mesurer la teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai. Si (et seulement si) la valeur mesurée dans une ou plusieurs solutions est inférieure à 70 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, il faut poursuivre la préaération au même rythme pendant une période limitée à 90 minutes[m]. Cette préaération devrait cesser dès que l'on a obtenu 70 % de saturation dans le concentration la plus

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

des effluents industriels, il serait généralement plus utile de consacrer les ressources disponibles à des essais plus fréquents d'échantillons plus petits, plutôt que de réaliser des essais définitifs mais peu frequents portant sur de gros échantillons. Pourtant, il faut tenir compte de la possibilité que les essais laissent apparaître une toxicité plus forte dans les cas où les conditions sont supérieures au minimum.

[m] L'aération peut éliminer les produit chimiques volatils de la solution ou accroître leur taux d'oxydation et de dégradation en d'autres substances. Cependant, l'aération des solutions d'essai avant l'exposition des poissons peut s'avérer nécessaire en raison de la demande d'oxygène de la substance à expérimenter (p. ex., appauvrissement de l'oxygène dans l'échantillon pendant son stockage). L'aération aide aussi au remélange de la solution d'essai.

élevée (ou 100 % en cas de sursaturation évidente). Sitôt la période de 90 minutes écoulée ou que l'on a obtenu 70 % de saturation (si cette valeur a été obtenue dans un temps plus court), les poissons sont introduits dans les solutions et l'essai est mis en route.

Au début de l'essai, l'aération des solutions d'essai (et de contrôle) devrait commencer ou être maintenue (*cf.* 5.2, 6.2 et 7.2) à un débit de 6,5 ± 1 mL/min · L, et se poursuivre durant toute la durée de l'essai. L'aération (ou préaération) des solutions devrait être assurée par des bulles d'air comprimé préalablement filtré pour qu'il soit exempt d'huile, en utilisant un diffuseur d'air* propre en verre de silice ou une pipette en verre jetable. Le débit d'aération devrait être vérifié et surveillé au moins une fois par jour au moyen d'un débitmètre.

Si, lorsqu'on applique le degré d'aération prescrit, les niveaux d'oxygène dissous auxquels sont exposés les poissons tombent sous 60 % de saturation (OCDE, 1984; EPA, 1985a) et que l'essai vise à établir le degré auquel l'appauvrissement en oxygène peut favoriser la mort des poissons, on peut réaliser un deuxième essai avec l'échantillon (ou une partie de celui-ci en utilisant un débit d'aération supérieur suffisant pour maintenir les teneurs en oxygène dissous à ≥ 70 % des saturation. On peut aussi réaliser le deuxième essai en utilisant de l'oxygène gazeux comprimé, injecté dans chaque solution d'essai à un débit contrôlé (6,5 ± 1 mL/min · L).

4.3.2 pH

Les essais de toxicité devraient normalement être effectués sans correction du pH. Il se peut que l'échantillon de produit chimique, d'eaux usée ou de milieu récepteur produise, pour une solution d'essai, un pH qui se situe en dehors de l'intervalle de 6,5 à 8,5, et que l'on cherche à évaluer des produits chimiques toxiques plutôt que les effets létaux ou modificateurs du pH; en pareil cas, on devrait corriger le pH des solutions d'essai ou de l'échantillon avant d'y déposer les poissons, ou effectuer parallèlement un deuxième essai (avec correction du pH)[n, o]. Pour ce deuxième essai, avant l'exposition des poissons, le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai peut[p], selon les objectifs de l'essai, être neutralisé (corrigé à une valeur de 7,0) ou ramené à des valeurs correspondant, à 0,5 unité près, au pH de l'eau de dilution. Selon une autre démarche admissible pour ce deuxième essai, on peut ramener le pH de chaque solution

---

* Un diffuseur convenable mesurant 3,8 cm sur 1,3 cm et adapté à un tube capillaire jetable en plastique d.un diamètre hors-tout de 0,5 cm est offert (article de catalogue no As-1) par Aqua Recherche Ltée., C.P. 208, North Hatley (Québec), J0B 2C0; tél. : (819) 842-2890.

[n] Le pH de l'eau de mer naturelle non contaminée se situe normalement entre 7,5 et 8,5. Les solutions d'eau de mer dont le pH se situe à l'extérieur de l'intervalle de 6,5 à 8,5 ne sont pas représentatives du milieu estuarien ou marin. Dans ce contexte, de telles valeurs du pH sont considérées atypiques (sur le plan environnemental).

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

Cela étant dit, les substances qui font passer le pH des substances d'essai à l'extérieur de l'intervalle de 6,5 à 8,5 peuvent causer des effets toxiques attribuables au seul pH. Un deuxième essai (avec pH corrigé), mené en parallèle dans des conditions par ailleurs identiques, permettrait de déterminer à quel point le pH, contribue à la toxicité de l'échantillon et de mesurer la reduction de la toxicité attributable à la correction du pH.

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

d'essai (y compris les solutions de contrôle) à une valeur de 6,5 à 7,0 (si échantillon d'essai a ou produit un pH inférieur à 6,5) ou de 8,0 à 8,5 (si l'échantillon a ou produit un pH supérieur à 8,5). Des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) de titre inférieur ou égal à 1 *N* devraient normalement être utilisées pour toutes les opérations de correction du pH. Certaines situations (p. ex., des échantillons d'effluents à pouvoir tampon élevé) peuvent exiger l'utilisation de teneurs supérieurs d'acide ou de base.

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des lignes directrices utiles pour la correction du pH. Il faudrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les solutions d'essai ou les aliquotes d'échantillons faisant l'objet d'une correction du pH[p]. Le délai nécessaire pour atteindre cet équilibre dépend du pouvoir tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluents, il est recommandé de prévoir une durée de 30 à 60 minutes pour la correction du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Une fois l'essai lancé, on surveille (section 4.4), sans le corriger, le pH de chaque solution d'essai.

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

4.3.3 Salinité

La salinité des échantillons aqueux devrait être mesurée avant le début des essais de toxicité, qui devraient normalement être exécutés sans correction de la salinité.

Lorsque la salinité de l'échantillon de produit chimique, d'eaux usées ou de milieu récepteur est essentiellement constitué d'eau douce (salinité inférieure à 5 ‰) et qu'on désire étudier la contribution de la salinité à sa toxicité, on devrait conduire un deuxième essai en parallèle avec une aliquote de l'échantillon dont la salinité a été ajustée pour correspondre à 5 ‰ près de celle de l'eau de contrôle/de dilution. La quantité minimale de saumure hyperconcentrée (SHC) (*cf.* 2.4.3 et 4.1) nécessaire à cet ajustement devrait être ajoutée à l'échantillon ou à chaque solution d'essai. Advenant que l'on ajoute de la SHC à l'échantillon/aux solutions d'essai pour ajuster la salinité, l'essai de toxicité doit inclure une solution de contrôle préparée uniquement avec cette SHC et de l'eau désionisée dont la salinité est ajustée à celle de de la salinité d'essai. De plus, tout essai conduit avec de l'eau de dilution qui diffère en quoique ce soit de cette *SCH de contrôle* (p. ex., eau de mer naturelle avec ou sans ajout de SHC; eau de mer naturelle avec ajout de SHC, etc.) doit inclure une solution de contrôle séparée préparée avec la même eau de dilution.

4.4 Observations et mesures

Sauf indication contraire, il faudrait observer les poissons dans chaque réservoir d'essai au moins 24, 48, 72 et 96 h après le début de l'essai. Il faudrait également consigner les mortalités et les cas d'aspect ou de comportement anormal de poissons.

À chaque observation, il faudrait consigner le nombre de poissons morts dans chaque réservoir d'essai et enlever ces poissons. 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. Il faudrait également examiner les poissons afin de détecter les effets toxiques sublétaux évidents (p. ex., l'accroissement du rythme respiratoire ou de la « toux », un comportement de nage irrégulier, la remontée à la surface, la décoloration et la perte d'équilibre), et noter toute différence par rapport aux poissons témoins. L'annexe D donne des exemples de termes à utiliser pour consigner les changements de comportement et d'aspect des poissons.

La teneur en oxygène, le pH et la température doivent être mesurés dans chaque solution d'essai (y compris la ou les solutions de contrôle), au moins au début et à la fin de l'essai mais de préférence au début de chaque période d'exposition de 24 h. Les mesures finales devraient être faites après que l'on ait procédé aux observations biologiques. La salinité de chaque solution d'essai devrait être mesurée au moins au début des l'essai.

On doit déterminer, à la fin de l'essai, la longueur à la fourche et le poids frais moyens (± l'écart type) des poissons témoins.

4.5 Résultats et calculs

Dans les essais à concentrations multiples, il faut consigner le pourcentage de poissons morts au terme de 96 h d'exposition à chaque solution d'essai de produits chimiques ou d'eaux usées. On doit calculer la CL50 après 96 h et ses limites de confiance à 95 %, en indiquant la méthodes utiliée pour ces calculs.

Pour estimer une CL50, les données de mortalité de tous les réservoirs de l'essai pour une concentration donnée sont combinées. Si la mortalité n'est pas ≥ 50 % dans au moins une concentration, la CL50 ne peut être estimée. S'il n'y a aucune mortalité à une concentration donnée, cette information est utilisée comme celle produisant une mortalité de 0 %. Cependant, si des concentrations successives produisent une série de 0 % de mortalité, seule la plus forte concentration de la série devrait servir à estimer la CL50 (c.-à-d., l'effet zéro le plus « proche de la ligne médiane » de distribution des données). Le même principe s'applique lorsqu'une mortalité de 100 % est obtenue successivement aux concentrations élevées de l'essai : n'est prise en compte que la plus faible concentration ayant produit 100 % de mortalité. L'utilisation d'une seule valeur d'effet 0 % ou 100 % vaut pour n'importe quelle forme d'analyse statistique et pour tracer manuellement un diagramme.

Différents programmes informatiques conviennent pour calculer la CL50. Stephan (1977) a mis au point un programme qui fait appel à trois méthodes (des probits, de la moyenne mobile et binomiale). Ce programme en langage BASIC est recommandé et peut être obtenu sur disquettes avec la permission du Dr. Charles E. Stephan, EPA, Duluth, Minn. en s'adressant à Environnement Canada (voir annexe A pour l'adresse). D'autres méthodes de calcul informatiques et manuelles peuvent être utilisées (p. ex., EPA, 1985a; Hubert, 1987; APHA *et al.*, 1998; EC, 2000). La méthode abrégée de Spearman-Kärber (Hamilton *et al.,* 1977) est déconseillée puisque les personnes qui ne connaissent pas les incidences de l'écrêtement des données dose-effet peuvent obtenir des résultats divergents (EC, 2000).

Le programme de C.E. Stephan, que nous recommandons, estime la CL50 selon chacune des trois méthodes qu'il utilise, s'il y a au moins deux cas où une partie des poissons sont morts. Pour les données uniformes ou régulières, les trois résultats seront dans doute analogues[q], et les

---

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

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

valeurs de l'analyse des probits devraient être privilégiées et consignées. L'estimation binomiale peut légèrement différer des autres et ne devrait être utilisée qu'en dernier ressort. Si les résultats ne comprennent pas au moins deux cas où une partie des poissons sont morts, seule la méthode binomiale peut servir à estimer la CL50. Elle n'estime pas les limites de confiance formelles; elle dégage au contraire les limites extérieures d'une gamme à l'intérieur de laquelle la CL50 et les limites de confiance réelles se trouveraient.

On devrait vérifier toute CL50 calculée par ordinateur en examinant, sur une échelle de probabilité logartihmique, la courbe des mortalité après 96 h pour les diverses concentration d'essai[q] (figure 3) (APHA *et al.,* 1998; EC, 2000). Tout écart important entre la CL50 estimée au moyen de cette courbe et la CL50 calculée par ordinateur doit être résolu. Un graphique produit par ordinateur pourrait être utilisé s'il était basé sur des échelles de probabilité logarithmique. Advenant que des erreurs se soient produites lors de l'entrée des données, un graphique produit par ordinateur comporterait la même erreur que l'analyse mathématique, et le chercheur devrait soigneusement vérifier si le positionnment des points est correct.

Pour les essais à concentration unique, les résultats dépendent de l'objectif de l'essai. Il peut s'agir : a) du pourcentage de mortalité au terme de l'exposition des poissons à l'échantillon non dilué pendant 96 h; b) du pourcentage de mortalité à différents moments, pour la comparison de la toxicité; ou c) du temps létal de chaque poisson dans chaque solution.

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

---

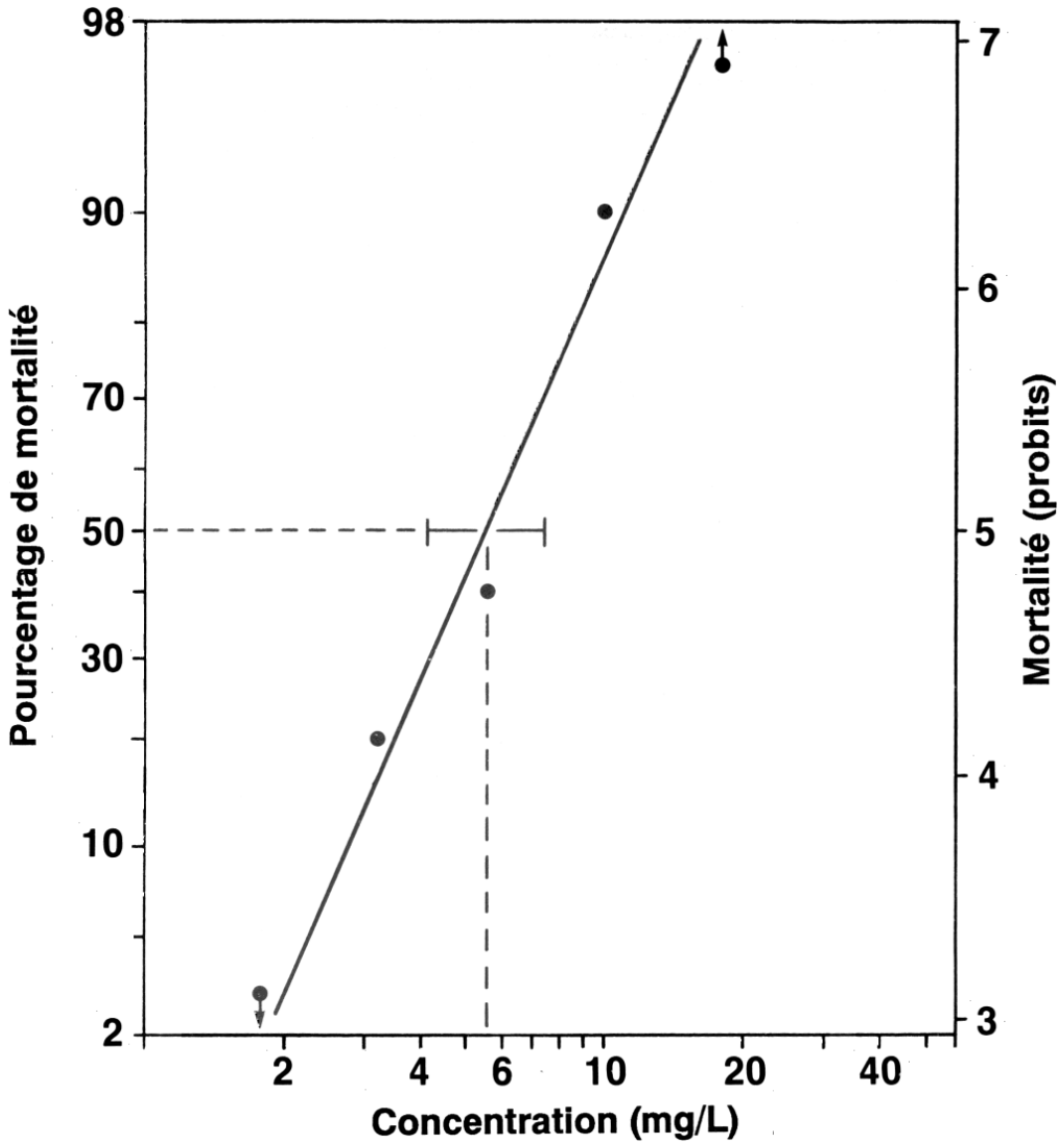
comme suit:

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

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

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

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



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

Figure 3 Estimation d'une concentration létale 50 par la représentation graphique des mortalités sur papier de probabilité logarithmique

toxicité ultime; par conséquent, les comparaisons reposant sur ces résultats ne donnent que des indications semi-quantitatives.

4.6 Produits toxiques de référence

L'utilisation courante de produits toxiques de référence est nécessaire pour qu'on puisse évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative de la population de poissons soumis à l'essai ainsi que la précision et la fiabilité des données obtenues en laboratoire (EC, 1990). La sensibilité des poissons aux produits toxiques de référence devrait être évaluée après l'acclimatation d'une nouveau lot de poissons en vue d'une utilisation éventuelle et au moins une fois par mois lorsque la population de poissons acclimatés est utilisée dans des essais de toxicité.

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

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

On recommande d'utiliser du phénol ou du zinc (préparé à partir de sulfate de zinc) de qualité « réactif » comme produits toxiques de référence pour cet essai. On devrait évaluer la sensibilité des poissons grâce à des essais statiques visant à mesurer la CL50 après 96 h pour l'un de ces produits chimiques ou les deux, en utilisant l'eau de dilution employée couramment par le laboratoire*. Les conditions de l'essai (y compris le type et la qualité de l'eau de dilution) et les méthodes employées doivent être cohérentes et conformes aux principes énoncés dans le présent document.

De l'eau de mer (naturelle ou artificielle [r]) doit être utilisée comme eau de contrôle/de dilution. Pour obtenir un degré élevé de normalisation des essais de produits toxiques de référence, on devrait corriger la salinité de cette eau de sort qu'elle corresponde à une valeur constante (p. ex., 28 ± 1 ‰ ou 14 ± 1 ‰) pour toutes les déterminations faites au laboratoire. La salinité choisie devrait se fonder sur la valeur dont on s'est servi antérieurement au laboratoire pour obtenir des données de toxicité ainsi que sur la valeur qui s'approche le plus de la salinité des solutions de produits chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou de milieux récepteurs à expérimenter. De plus, elle doit correspondre, à 10 ‰ près, à celle de l'eau à laquelle les poissons ont été acclimatés. Si cela est justifié et si l'on dispose de groupes distincts d'épinoches acclimatées à chacune de ces salinités, on peut mener un essai statique afin de déterminer la CL50 après 96 h du produit toxique de référence pour chacune d'entre elles.

---

* On peut utiliser de l'eau de mer artificielle si l'on souhaite atteindre un degré de normalisation supérieure.

---

[r] Il est recommandé de se servir d'eau de mer artificielle comme eau de dilution pour la tenue des essais de produits toxiques de référence, car cela réduit la probabilité d'écarts entre les résultats des essais par suite de changements quotidiens ou saisonniers de la chime de l'eau de mer naturelle.

Une fois que l'on dispose de suffisamment de données (EC, 1990), un diagramme de contrôle devrait être établi et mis à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. On porte les CL50 successives sur le graphique et on les étudie pour déterminer si les résultats s'inscrivent dans un intervalle de ± 2 fois l'écart type des valeurs respectives obtenues dans les essais précédents. Pour être acceptable, la nouvelle CL50 doit s'inscrire à l'intérieur des limites d'avertissement. Pour établir le diagramme de contrôle, on devrait recalculer pour chaque CL50 successive, la moyenne des valeurs logarithmiques disponibles (CL50) ainsi que les limites d'avertissement supérieur et inférieur (± 2 écarts types) obtenues avec le produit toxique de référence, jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1985a; 1993; EC, 1990, 1998). La moyenne et ± 1 fois l'écart type devraient être rapportés en ordonnée versus la date de l'essai (ou le numéro de l'essai) en abscisse.

Le logaritme de concentration (y compris la CL50) doit être utilisé dans tous les calculs de moyenne ou d'écart type. On a de la sorte une continuité avec le fait que chaque CL50 a été estimeée en fonction des logarithmes de concentrations. Le diagramme de contrôle peut être établi en reportant les logarithmes de la moyenne et ± 2 écarts types sur du papier à échelle artihmétique, ou en portant les valeurs arithmétiques sur l'échelle logarithmique de papier semi-logarithmique. Lorsque les CL50 ne suivent pas une distribution log-normale, il se peut qu'une moyenne arithmétique accompagnée d'un écart type se révèle plus appropriée.

Lorsqu'une CL50 donnée déborde des limites d'avertissement, il faut mettre en doute la sensibilité des organismes soumis à l'essai ainsi que la valeur et la précision du système d'essai. Comme cette situation peut se produire dans 5 % des cas, du fait du hasard seulement, une CL50 qui s'inscrit en dehors des limites ne signifie pas nécessairement que la sensibilité des organismes d'essai ou que la précision des données toxicologiques soient en cause. Il s'agit plutôt d'un avertissement qu'il pourrait y avoir un problème. On doit alors vérifier toutes les conditions de détention et d'essai.

Les solutions mères des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.,* 1998). On devrait utiliser du sulfate de zinc (généralement de formule $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ et d'une masse moléculaire égale à 4,3982 fois celle du zinc) pour la préparation des solutions de zinc, qui devraient être acides (pH de 3 à 4). On peut conserver les solutions acides de zinc dans l'obscurité à 4 ± 2° C pendant plusiers semaines jusqu'au moment de l'utilisation. La concentration de zinc devrait être exprimée en mg Zn^{++}/L.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (p. ex., APHA *et al.,* 1998). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur faible, moyenne et élevée; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CL50 serait atypique (à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on devrait les tenir à l'obscurité, à une température de 4 ± 2° C. Les solutions de zinc et de phénol devraient être préservées avant d'être stockées (APHA *et al.,* 1998). Les aliquotes stockées nécessitant une mesure chimique devraient être analysées sans délai aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, ine fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la CL50 devrait être fondé sur les concentrations moyennes mesurées, si elles diffèrent appréciablement (c.-à-d., de plus de 20 %) des concentrations nominales et si les analyses chimiques sont exactes et fiables.

4.7 Considérations juridiques

Les prescriptions complètes et détaillées établies pour les essais de létalité aiguë réalisés à des fins juridiques débordent le cadre du présent document. On doit absolument prendre soin de veiller à ce que les échantillons soumis à des essais soient recevables en preuve en cas d'action en justice devant un tribunal. Pour cela, les échantillons doivent : être représentatifs de la substance échantillonnée; ne pas être contaminés par des substances étrangères; avoir des coordonnées précises (date, heure et lieu d'origine); être consignés clairement pour assurer la continué de la preuve; et être analysés le plus tôt possible après leur prélèvement. Les personnes responsables de l'exécution de l'essai et de l'établissement du procès-verbal doivent assurer la continuité de la preuve en cas d'action en justice (McCaffrey, 1979) ainsi que l'intégrité des résultats des essais.

Méthodes particulières pour l'essai de produits chimiques

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

5.1 Propriétés, étiquetage, transport et stockage des échantillons

On devrait obtenir des renseignements sur les propriétés du produit chimique à expérimenter, notamment sa solubilité dans l'eau, sa tension de vapeur, sa stabilité chimique, ses constantes de dissociation et sa biodégradabilité. Il faudrait consulter la fiche signalétique sur les marchandises dangereuses concernant ce produit, s'il en existe une. Quand la solvabilité dans l'eau d'un produit chimique soulève des doutes ou des difficultés, les méthodes admissibles utilisées antérieurement pour la préparation de solutions aqueuses de ce produit devraient être recueillies et consignées. Il faudrait également recueillir et consigner les autres renseignements existants, par exemple la formule 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 n-octanol/eau[s].

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

5.2 Préparation des solutions d'essai

Dans le cas des produits chimiques, on exécute généralement un essai à concentrations multiples afin d'établir la CL50. Il peut s'avérer souhaitable de prévoir des répétitions (deux ou trois) pour chaque concentration d'essai, lorsqu'ils s'agit d'évaluer de nouveaux produits chimiques. Des répétitions peuvent s'avérer nécessaires en vertu des règlements sur l'enregistrement des pesticides et des catégories analogues de produits chimiques.

On peut préparer les solutions en ajoutant des quantités prépesées (à l'aide d'une balance de précision) du produit chimique dans chaque réservoir d'essai, de façon à obtenir les teneurs nominales à expérimenter[t], ou en ajoutant des volumes mesurés d'une solution mère. On devrait préparer les solutions mères en dissolvant le produit chimique à expérimenter dans de l'eau de contrôle/de dilution. Pour les produits chimiques qui ne se dissolvent pas facilement dans l'eau, les solutions mères peuvent être préparées au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington *et al.*, 1988; Shiu *et al.,* 1988) ou, comme second choix, par dispersion ultrasonique. L'expérimentateur devrait être conscient du fait que ce dernier procédé peut donner lieu à des variations de la disponibilité

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

[t] Cette démarche n'est normalement utilisée que pour préparer des concentrations élevées ou des volumes importants de solutions d'essai. Dans les autres cas, on peut obtenir une plus grande exactitude en préparant une solution mère.

biologique du produit chimique (et, par conséquent, de sa toxicité), en raison de la production de gouttelettes non uniformes et de tailles différentes.

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

La teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris la ou les solutions de contrôle, devrait être mesurée après leur préparation. Cela fait, on devrait soit introduire les poissons et mettre en route l'essai (*cf.* 4.2), soit préaérer chaque solution d'essai (voir 4.3.1) avant d'introduire les poissons. Dans la plupart des cas, la préaération des solutions d'essai n'est pas nécessaire et ni justifiée (voir note de bas de page m). Lorsque la préaération est justifiée, on devrait suivre les indications pour la préaération des solutions, données en 4.3.1.

5.3 Eau de contrôle/de dilution

L'eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau de mer artificielle, de l'eau de mer naturelle «non contaminée» du laboratoire ou, si une situation locale présente un intérêt particulier, un échantillon d'un milieu récepteur marin ou estuarien, prélevé à proximité de la source de contamination mais à l'abri de son influence. Le choix de l'eau de contrôle/de dilution dépend de l'objet de l'essai.

Si un degré élevé de normalisation est nécessaire (p. ex., 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 d'une salinité corrigée pour correspondre à une ou plusieurs salinités communes à tous les essais devrait servir d'eau de contrôle/de dilution. Des salinités de 28 ‰ (pour l'eau salée) et de 14 ‰ (pour l'eau estuarienne saumâtre) sont recommandées pour la tenue d'essais comparatifs.

Si l'on doit évaluer l'effet toxique d'un produit chimique sur un milieu récepteur 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 de contrôle/de dilution[u, v, w]. Par exemple, il peut s'agir d'évaluer l'effet toxique de déversements

---

[u] Les contaminants qui se trouvent déjà dans le milieu récepteur peuvent ajouter leur toxicité à celle du produit chimique ou de l'eau usée à expérimenter. Dans ce cas, de l'eau de 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 impact total sur le site visé.

[v] Il serait souhaitable d'acclimater un groupe de poissons au milieu récepteur avant de l'utiliser dans un essai où ce milieu sert d'eau de contrôle/de dilution, mais cela est rarement réalisable en raison de la nécessité de transporter de forts volumes d'eau. Si cela est possible et opportun, les essais utilisant le milieu récepteur pourraient être réalisés près du site visé, auquel cas l'acclimatation devrait durer au moins cinq jours.

[w] Une solution de rechange (compromis) quant à l'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution consiste à corriger le pH et la salinité de l'eau de mer du laboratoire pour qu'ils correspondent à ceux du milieu récepteur. Selon la situation, la correction peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées dans le milieu récepteur à un moment particulier.

réels ou potentiels de produits chimiques sur une nappe d'eau particulière. L'eau de mer naturelle du laboratoire peut également être utilisée à cette fin, surtout lorsque des contraintes logistiques rendent peu pratiques le prélèvement et l'utilisation du milieu récepteur. Elle peut aussi servir d'eau de contrôle/de dilution dans d'autre situations (p. ex., l'évaluation préalable ou intra-laboratoire de la toxicité du produit chimique).

Si l'on désire des donnés concernant l'influence de la salinité sur la toxicité d'un produit chimique, on devrait mener en parallèle des essais distincts pour trois salinités ou plus (p. ex., 10, 20 et 28 ‰). L'eau de contrôle/de dilution servant à de tels essais comparatifs devrait provenir de la même source : il peut s'agir d'eau de mer artificielle (section 2.4.3) ou d'eau salée naturelle (salinité ≥ 28 ‰) diluée avec de l'eau douce « non contaminée » jusqu'à l'obtention des salinités désirées.

5.4 Observations et mesures

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

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

Si le dosage du produit chimique indique que les concentrations ont fléchi de plus de 20 % pendant l'essai, la toxicité létale aiguë du produit chimique devrait être réévaluée au cours d'un essai à renouvellement périodique ou continu (OCDE, 1984).

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.

5.5 Résultats et calculs

Le résultat des essais de produits chimiques est généralement une CL50 après 96 h. Les méthodes admises pour le calcul de la CL50 et de son intervalle de confiance à 95 % sont énoncées à la section 4.5.

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

---

[x] Il n'est pas nécessaire d'effectuer ces analyses dans tous les cas, en raison des limites de l'analyse, des coûts à engager ou de l'existence de données techniques antérieures indiquant la stabilité du produit chimique en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai. Les analyses chimiques sont particulièrement recommandables si (EPA, 1985b): les solutions d'essai sont aérées; la substance à expérimenter est volatile, insoluble ou se précipite; on sait que cette substance est absorbée par les matériaux dont les réservoirs d'essai sont construits; ou on fait appel à un système à renouvellement continu. Certains cas (p. ex., l'essai de pesticides en vue de leur enregistrement) peuvent nécessiter la mesure des concentrations du produit chimique dans les solutions d'essai.

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

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

6.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

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

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

L'essai des échantillons d'effluents et de lixiviats devrait être entrepris le plus tôt possible après leur prélèvement. Il devrait débuter dans les trois jours et doit être entrepris au plus tard cinq jours après la fin des prélèvements. Les échantillons recueillis pour extraction et essai de l'élutriat devraient subir l'essai dans des dix jours de leur réception. Les élutriats devraient faire l'objet d'un essai dans les trois jours de la préparation de l'échantillon ou selon les instructions fournies.

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

Les échantillons d'effluents et de lixiviats ne doivent pas geler au cours du transport. À l'arrivée au laboratoire, ils peuvent être ramenés immédiatement ou pendant la nuit à la température de l'essai (10 ± 2° C) et les essais peuvent être entrepris. Si un stockage plus long s'avère nécessaire, les récipients doivent être entreposés à l'obscurité à 4 ± 2° C.

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

6.2 Préparation des solutions d'essai

Les récipients contenant les échantillons doivent être agités vigoureusement avant d'être vidés,

afin d'assurer la remise en suspension des matières solides décantables. Les sous-échantillons (c.-à-d., les échantillons répartis dans deux ou plusieurs récipients) doivent être combinés, afin d'assurer leur homogénéité. S'il faut stocker à nouveau les échantillons, l'échantillon composite (ou un partie de cet échantillon) devrait être replacé dans les récipients qui contenaient les sous-échantillons et stocké (*cf.* 6.1) jusqu'au moment de les utiliser. Au besoin, la température des échantillons ou des solutions d'essai peut être corrigée à la température requise pour les essais. Pour les réchauffer, utiliser un bain-marie. **Ne pas utiliser de thermoplongeur**, vu que cela pourrait altérer les substances chimiques présentes et modifier la toxicité. Pour refroidir les échantillons ou les solutions d'essai, utiliser un bain d'eau froide ou un refroidisseur à immersion fait d'un matériau non toxique (p. ex., acier inoxydable).

Chaque essai doit comprendre une ou plusieurs solutions de contrôle. Une fois les solutions préparées et mélangées (voir section 4.1), chaque solution, y compris la ou les solutions de contrôle, devrait être aérée doucement pendant 30 minutes au rythme de 6,5 ± 1 mL/min · L. Ceci fait, il faudrait revoir les instructions données à la section 4.3.1 (2e paragraphe) et s'y conformer avant de mettre l'essai en route.

L'ajustement de la salinité de l'échantillon ou de la solution n'est en principe pas requis pour cet essai. Cependant, si l'on désire comprendre en quoi la salinité agit sur la toxicité de l'échantillon, un deuxième essai (avec ajustement de la salinité) devrait être conduit en parallèle (*cf.* 4.3.3).

Lorsque l'objet de l'essai est de comprendre la toxicité relative d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat donné avec celle d'un autre effluent, lixiviat ou élutriat obtenu ou analysé ailleurs, la salinité de toutes les solutions de contrôle ou d'essai devrait être corrigée pour s'établir à la même valeur. Des salinités d'essai de 28 ‰ ou de 14 ‰ sont recommandées pour l'obtention de toxicités comparatives représentatives des conditions marines et estuariennes. On doit suivre les méthodes décrites aux sections 2.4.3 et 4.1 pour préparer de l'eau de contrôle/de dilution dont la salinité est ajustée avec de la saumure hyperconcentrée (SHC), ainsi que les méthodes décrites en 4.3.3 pour ajuster au besoin la salinité de l'échantillon ou des solutions d'essai à la salinité voulue.

6.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les essais de surveillance et de conformité réalisés sur des échantillons d'effluents ou de lixiviats, on devrait utiliser comme eau de contrôle/de dilution l'eau du laboratoire à laquelle les poissons on été acclimatés pendant deux ou plusieurs semaines, ou un échantillon de milieu récepteur. Étant donné que les résultats pourraient s'avérer différents pour les deux sources d'eau, on doit fixer les objectifs de l'essai avant d'effectuer ce choix. Il faudrait également tenir compte des difficultés et des coûts de transport, puisque l'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution augmente considérablement le volume de liquide à transporter.

L'utilisation du milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution peut être souhaitable dans certains cas, lorsqu'il faut recueillir des renseignements propres au site visé en ce qui concerne l'effet toxique potentiel d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat sur un milieu récepteur particulier [v, w]. Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux dispositions de la section 6.1.

À certaines endroits, des lixiviats peuvent s'écouler directement dans le milieu marin ou estuarien. Dans d'autres cas, ils peuvent se mélanger à des cours d'eau côtiers avant d'aboutir dans les milieux marins. Selon la

situation et l'objet de l'étude, on peut se servir comme eau de contrôle/de dilution d'échantillons du milieu récepteur prélevés immédiatement en amont ou à proximité des lixiviats, mais à l'abri de leur influence. On peut aussi utiliser de l'eau de mer à laquelle les poissons ont été acclimatés pendant deux semaines ou plus; elle constitue également une bonne eau de contrôle/de dilution pour les essais courants de surveillance et de conformité portant sur des lixiviats.

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

Les essais nécessitant un degré supérieur de normalisation peuvent faire appel à de l'eau de mer artificielle comme de contrôle/de dilution. Cette eau convient lorsqu'il faut évaluer la toxicité d'un échantillon ou d'une série d'échantillons en comparant les résultats obtenus à un certain nombre de laboratoires ou à un même laboratoire où la qualité de l'eau est variable. En pareil cas, il est souhaitable de minimiser toute influence modificatrice attribuable à des différences dans la chimie de l'eau de dilution.

6.4 Conditions de l'essai

Les échantillons d'effluents, de lixiviats ou d'élutriats ne sont normalement pas filtrés ni agités pendant l'essai. Cependant, la présence de solides en suspension dans un échantillon peut causer du stress chez les poissons exposé et se traduire par une létalité aiguë si la concentration de ces solides est suffisamment élevée (p. ex., ≥ 2000 mg/L, Noggle, 1978; McLeay *et al.,* 1987; Servizi *et al.,* 1987). Dans certains types d'effluents traités, de fortes concentrations de solides biologiques peuvent également concourir à la toxicité des échantillons en raison de la production d'ammoniac ou de nitrites (Servizi et Gordon, 1986). Si l'on est préoccupé par la hausse de la toxicité attribuable à des concentrations élevées de solides en suspension ou décantables dans des échantillons d'effluents, d'élutriats ou de lixiviats, on peut effectuer un essai supplémentaire en maintenant les solides en suspension pendant toute la durée de l'exposition des poissons. On peut employer à cette fin des réservoirs d'essai dotés de parois verticales et d'un fond en forme de cône à pente abrupte (Noggle, 1978; McLeay *et al.,* 1983) ou des réservoirs analogues. Ils permettent d'agiter continuellement les solides en suspension pendant l'essai, par aération à partir du fond conique ou grâce à une pompe qui les aspire au fond et les redistribue à la surface. L'insertion d'un panier dans chaque réservoir d'essai permet d'effectuer une inspection périodique et d'assurer la protection des poissons contre l'appareil de recirculation. Un troisième essai, portant sur une partie de l'échantillon traitée par filtrage ou décantation afin d'éliminer les solides, peut également être mené suivant des méthodes par ailleurs identiques si l'étude vise à quantifier l'apport des solides présents dans l'échantillon à la toxicité létale aiguë.

Si l'échantillon renferme une quantité appréciable de matières flottantes (p. ex., de l'huile ou des surfactants) et que l'apport possible de ces matières à sa toxicité soulève des préoccupations, on peut agiter les solutions pendant toute la durée de l'essai afin d'assurer leur mélange et l'exposition des poissons aux constituants solubles. Les réservoirs coniques de recirculation décrits précédemment peuvent être utilisés, à cette fin; on peut également utiliser, comme solution de rechange, des réservoirs d'essai cylindriques dotés d'hélices individuelles (SPE, 1974; Balckman *et al.,* 1978). Il faut alors assurer la protection des poissons contre les hélices.

6.5 Observations et mesures

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

Au cours des essais portant sur des solutions fortement colorées ou opaques ou sur des échantillons produisant de la mousse dans le réservoir d'essai, on devrait inspecter les poissons en les soulevant à la surface de la solution aux intervalles précisés, afin d'observer leur apparence, leur comportement et leur survie (section 4.4). Il est recommandé, à cette fin, de loger les poissons dans un panier adapté construit d'un matériau non toxique et non abrasif; on peut aussi utiliser des épuisettes, à condition d'éviter de blesser les poissons ou de leur causer un stress excessif pendant la capture. Si l'on utilise des paniers, on devrait en placer un dans chacun des réservoirs contenant les solutions d'essai et de contrôle. Les paniers devraient être assez grands pour permettre aux poissons de se déplacer librement dans tout le réservoir d'essai. Avant usage, chaque panier doit être nettoyé et rincé à fond avec de l'eau de contrôle/de dilution.

6.6 Résultats et calculs

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une ou plusieurs parties non diluées de l'échantillon et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Selon les exigences réglementaires précisées, les essais de conformité peuvent faire appel à une seule concentration (100 % d'eaux usées, sauf indication contraire) ou déterminer la CL50 après 96 h (section 4.5).

Les essais réalisés pour la surveillance de la toxicité des effluents, des lixiviats ou des élutriats peuvent viser à mesurer le pourcentage de mortalité des poissons après 96 h dans une seule concentration, à établir le TL50 de l'échantillon, dilué ou non, ou encore à mesurer la CL50. Le résultat dépend d'un certain nombre de considérations, notamment les objectifs du programme de surveillance, les exigences de conformité, le coût des essais et les antécédents en matière de survie de poissons dans des eaux usées non diluées.

Les essais de toxicité réalisés à d'autres fins (p. ex., détermination de sources de toxicité à l'intérieur d'une usine, de l'efficacité d'un traitement ou des effets de modifications d'un procédé sur la toxicité) peuvent, selon les objectifs de l'étude, porter sur une seule concentration (100 % ou une dilution appropriée, ainsi qu'un contrôle) ou sur des concentrations multiples. Les essais à concentration unique sont souvent un moyen économique d'établir la présence ou l'absence d'une toxicité létale aiguë ou d'évaluer un nombre important d'échantillons afin d'établir leur toxicité relative. Les résultats de ces essais dépendent toujours des objectifs de l'étude; il peut s'agir de cotes arbitraires de réussite ou d'échec, d'un pourcentage de mortalité de poissons après 96 h ou dans un délai plus rapproché (p. ex., 24 h), ou du temps létal de chaque poisson dans chaque solution. Les éléments exposés à la section 4.5 sont pertinents dans ce cas.

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

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

7.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons

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

7.2 Préparation des solutions d'essai

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

7.3 Eau de contrôle/de dilution

Pour les échantillons de milieux récepteurs marins ou estuariens recueillis dans le voisinage d'un point de rejet d'eaux usées, d'un déversement de produits chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination possible, on pourrait utiliser comme eau de contrôle/de dilution de l'eau de mer prélevée en même temps dans le même milieu récepteur [v, w]. Cette eau devrait être prélevée le plus près possible des sources de contamination en cause, mais en amont ou à l'extérieur de leur zone d'influence. Des études sur les courants ou sur la dispersion (au moyen de traceurs) peuvent être nécessaires pour choisir un point de prélèvement acceptable.

Si l'on utilise de l'eau du milieu récepteur comme eau de contrôle/ de dilution, on devrait préparer une solution de contrôle distincte à partir de l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés pendant deux ou plusieurs semaines [j]. Il faudrait comparer, selon des conditions et des méthodes d'essai identiques, la survie, l'aspect et le comportement des poissons dans les deux solutions de contrôle. Si les poissons détenus dans le milieu récepteur de contrôle montrent des signes d'épuisement ou de mortalité et si l'on prépare des dilutions du milieu récepteur contaminé par les essais (parce que l'on s'attend à ce qu'il soit toxique), on devrait préparer à ce moment un ensemble distinct de dilutions au moyen de l'eau du laboratoire à laquelle les poissons ont été acclimatés. Les expérimentateurs prévoyant cette éventualité devraient recueillir des volumes suffisants d'échantillons pour permettre de préparer ces dilutions supplémentaires.

Des contraintes logistiques, les effets toxiques prévus ou d'autres détails pratiques propres à l'emplacement peuvent empêcher l'utilisation d'un échantillon approprié de milieu récepteur comme eau de contrôle/de dilution. D'autres circonstances peuvent aussi l'empêcher : des informations insuffisantes sur les modes de mélange et de dispersion du contaminant, ou l'incapacité de trouver une source d'eau de mer non polluée qui soit à l'abri de l'influence de la source de contamination. En pareil cas, l'eau du laboratoire utilisée pour l'acclimatation des poissons devrait servir comme eau de contrôle et pour toutes les dilutions. On peut corriger certaines de ses caractéristiques afin de simuler en partie le milieu récepteur d'amont.

La teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris les solutions de contrôle,

devraient être mesurée après leur préparation. Cela fait, on devrait soit introduire les poissons et mettre en route l'essai (voir section 4.2), soit préaerer chaque solution d'essai (voir 4.3.1) puis introduire les poissons. Dans la plupart des cas, la préaération des solutions d'essai n'est pas nécessaire, ni justifiée (voir note « m »). Lorsque la préaération est indiquée, on devrait suivre les indications pour la préparation des solutions, données en 4.3.1.

7.4 Observations et mesures

La couleur, la turbidité, le moussage, la précipitation et les autres caractéristiques de l'échantillon et des solutions devraient être observés conformément aux dispositions de la section 6.5, aussi bien pendant la préparation des solutions d'essai que par la suite, pendant les essais eux-mêmes. Ces observations viennent s'ajouter aux observations de base sur les poissons prévues à la section 4.4.

7.5 Résultats et calculs

Les résultats des essais portant sur des échantillons de milieux récepteurs devraient être conformes aux options et aux démarches prévues dans les sections 4.5 et 6.6.

Les essais de surveillance et de conformité devraient normalement porter, au minimum, sur une ou plusieurs parties non diluées d'un échantillon et sur une ou plusieurs solutions de contrôle. Les résultats des essais d'échantillons de milieux récepteurs peuvent être limités à l'établissement d'un pourcentage de mortalité des poissons après 96 h dans l'échantillon non dilué, ainsi qu'aux données sur le temps létal, le cas échéant.

Lorsque les échantillons de milieux récepteurs sont probablement toxiques et que l'on souhaite obtenir des renseignements sur le degré de dilution nécessaire pour permettre la survie à court terme des poissons, on devrait effectuer un essai permettant d'établir la CL50 après 96 h. Une ou plusieurs concentrations non diluées (échantillon à 100 %) et au moins quatre dilutions devraient faire l'objet de cet essai, en plus d'une ou de plusieurs solutions de contrôle. En supposant que les données le permettent, la CL50 et ses limites de confiance à 95 % devraient être calculées.

Procès-verbal de l'essai

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

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

Chaque procès-verbal particulier à un essai doit indiquer tout non-respect des exigences précisées par « doit », « doivent », « il faut » dans les sections 2 à 7 de cette méthode d'essai biologique, et s'il en est, indiquer en quoi cela consiste. Des programmes de surveillance particuliers peuvent exiger la mention de certains éléments dans le procès-verbal propre à l'essai ou encore demander à ce que certains renseignements méthodologiques portant la mention « données à garder en dossier ». Les détails concernant la réalisation et les résultats de l'essai qui ne sont pas consignés au procès-verbal devraient être versés aux dossiers du laboratoire d'essai de sorte qu'on puisse obtenir les renseignements voulus si une vérification de l'essai s'avère nécessaire.

8.1 Substance à expérimenter

- Type, source et description de l'échantillon (produit chimique, effluent, élutriat, lixiviat ou milieu récepteur; lieu et méthode de prélèvement; détails sur la nature, l'aspect et les propriétés de l'échantillon, ainsi que son volume ou son poids).

- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de la substance à expérimenter.

- Détails sur les modalités de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons (p. ex., échantillon instantané, discontinu ou composite, description du contenant, et température de l'échantillon à la réception et pendant le stockage).

- Identité des personnes ayant prélevé ou fourni l'échantillon.

- Date et heure du prélèvement de l'échantillon, de sa réception à l'installation d'essai et du début de l'essai définitif.

8.2 Organismes soumis à l'essai

- Espèce et source.

- Descriptions des conditions de détention et d'acclimatation (installations, éclairement, source et qualité de l'eau, prétraitement de l'eau, débit et méthode d'échange de l'eau, densité de poissons dans les réservoirs de détention et d'acclimatation, température pendant la détention et l'acclimatation, durée

de l'acclimatation, type de nourriture, ration et fréquence d'alimentation, incidence et traitement des maladies).

- Pourcentage hebdomadaire de mortalité dans la population de poissons pendant l'acclimatation.

- Longueur et poids frais moyen, intervalle, écart-type des poissons témoins à la fin de l'essai, avec densité de changement (g/L) des poissons.

8.3 Installations et appareils

- Nom et adresse du laboratoire d'essai.

- Nom des personnes ayant effectué l'essai.

- Description des systèmes de réglage de l'éclairement et de la température dans l'installation d'essai.

- Description des réservoirs d'essai (taille, forme et type de matériau) et des systèmes et appareils d'aération.

8.4 Eau de contrôle/de dilution

- Type et source(s) de l'eau utilisée comme eau de contrôle/de dilution.

- Type et quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau de contrôle/de dilution.

- Détails sur l'échantillonnage et le stockage, si l'eau de contrôle/de dilution provient du milieu récepteur « en amont ».

- Prétraitement de l'eau (correction de la température et de la salinité, dégazage, débit et durée d'aération, etc.).

- Variables de la qualité de l'eau mesurées avant l'essai et au début de l'essai (section 2.4.3).

8.5 Méthode d'essai

- Brève mention de la méthode utilisée, s'il s'agit d'une méthode normalisée (p. ex., conforme au présent document).

- Conception et description de la méthode, si elle est spécialisée (p. ex., recirculation et renouvellement périodique ou continu des solutions d'essai), ou des modification apportées à la méthodes normalisée.

- Méthode utilisée pour la préparation des solutions mères et des solutions d'essai de produits chimiques.

- Résultats de toute analyse chimique des solutions d'essai et mention des méthodes analytiques utilisées.

- Utilisation d'un essai préalable ou de détermination de l'ordre de grandeur.

- Fréquence et nature des observations effectuées pendant l'essai.

8.6 Conditions de l'essai

- Nombre, concentration, volume et profondeur des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle.

- Nombre de poissons par solution et densité de chargement.

- Photopériode, source lumineuse et éclairement à la surface des solutions d'essai.

- Renseignements sur l'aération des solutions d'essai avant et pendant l'exposition des poissons (débit, durée et mode d'application).

- Description de tout correction du pH des solutions d'essai, y compris la méthode employée et le moment de la correction.

- Résultats de toute mesure chimique des solutions d'essai (p. ex., concentration du produit chimique et teneur en solides en suspension).

- Température, pH, oxygène dissous (mg/L et pourcentage de saturation), d'après les mesures et les observations faites dans chaque solution d'essai.

- Conditions et méthodes de mesure de la CL50 après 96 h du des produits toxiques de référence.

8.7 Résultats de l'essai

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

- Comportement et aspect des poissons, et nombre et pourcentage des mortalités dans chaque solution d'essai (y compris la solution de contrôle), selon les données consignées au cours de chaque période d'observation. Nombre et pourcentage des poissons témoins ayant un comportement atypique ou stressé.

- Résultats de l'essai de détermination de l'ordre de grandeur (s'il y en a eu un).

- Toute valeur CL50 ou TL50 après 96 h (y compris les limites de confiance à 95 %) ayant été établie, y compris une mention de la méthode statistique utilisée pour les calculs.

- CL50 après 96 h et limites de confiance à 95 % établies pour le ou les produits toxiques de référence, à moins d'un mois de l'essai, au moyen du même groupe de poissons que ceux choisis pour l'essai. Valeur moyenne (± 2 fois l'écart type) obtenue pour le ou les mêmes produits de référence à l'installation d'essai au cours d'essais antérieurs.

Références

Abernethy, S.G. et G.F. Westlake. «Guidelines for pH adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing». Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, septembre 1989. 11 p.

Allen, J.R.M. et R.J. Wootton. «The Effect of Ration and Temperature on the Growth of the Threespine Stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L.». *Journal of Fish Biology,* vol. 20, 1982, p. 402-422.

APHA *(American Public Health Association) et al.*, «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,* 20e éd., American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation, Washington, DC (1998).

Armstrong, F.A.J. et D.P. Scott. «Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada,* vol. 31, 1974, p. 1881–1885.

ASTM *(American Society for Testing and Materials)*. «Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians», *Report E729-80.* Philadelphie, PA, ASTM, 1980. 25 p.

ASTM, "Standard Guide for the Use of Lighting in Laboratory Testing", E1733-95, p. 1279–1289, In: *1996 Annual Book of ASTM Standards,* Vol. 11.05, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (1996).

Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay. «Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems». *Environmental Toxicology and Chemistry,* vol. 7, 1988, p. 117–128.

Blackman, R.A., A.F.L. Franklin, M.G. Noton et K.W. Wilson. «New Procedures for the Toxicity Testing of Oil Slick Dispersants in the United Kingdom». *Marine Pollution Bulletin*, vol. 9 1978, p. 234–238.

Bouck, G.R. «Gasometer: An inexpensive Device for Continuous monitoring of Dissolved Gases and Supersaturation». *Transactions of the American Fisheries Society,* vol. 111, 1982, p. 505–516.

CCMRE (Conseil canadien des ministres des Ressources et de l'Environnement). «Recommandations pour la qualité des eaux au Canada». Ottawa, Environnement Canada, mars 1987.

Coad, B.W. «A Bibliography of the Sticklebacks *(Gasterosteides : Osteichyes)*». Collection Syllogeus, no 35. Ottawa, Musées nationaux du Canada, 1981.

Craig, G.R. et G.L. Beggs. «Evaluation of Fish Loading Rates in Regulatory Static Bioassays». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, November 7–9, 1978,* Hamilton, Ontario. Rapport technique du Servie des pêches et des sciences de la mer no. 862. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 145–160.

Davis, J.C. et B.J. Mason. «Bioassay Propcedures to Evaluate Acute Toxicity of Neutralized Bleached Kraft Pulp Mill Effluent to Pacific Salmon». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada,* vol. 30, 1973, p. 1565-1573.

Douglas, M.T., D. O. Chanter, I.B. Pell et G.M. Burney. «A Proposal for the Reduction of Animal Numbers Required for the Acute Toxicity to Fish Test (LC50 Determination)». *Aquatic Toxicology,* vol. 8, 1986, p. 243-249.

EC (Environnement Canada), Conservation and Protection, *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*. Rapport SPE 1/RM/12. Ottawa, 1990.

EC. *Méthode recommandée d'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents pour des essais de toxicité sublétale conduits en vertu du Programme de suivi des effets sur l'environnement (Programme SEE)*. Rapport non publié, juillet 1997, 5 pages. Section de l'élaboration et d'application des méthodes, Centra de technologie enironnementale, Ottawa (Ont.) (1997).

EC. *Document d'orientation sur l'interprétation et l'application des données en toxicologie environnementale.* Service de protection de l'environnement, Ottawa (Ont.). Rapport SPE X/XX/XX. en préparation (1998).

EPA *(Environmental Protection Agency)*. «Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians». EPA-660/3-75-009. Corvallis, OR, EPA, avril 1975.

EPA «Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms», EPA/600/4-85-013. W.H. Peltier and C.I. Weber (éd.), Cincinnati, EPA, 1985. 215 p. (1985a).

EPA, «Acute Toxicity Test for Estuarine and Marine Organisms (Estuarine Fish 96-hour Acute Toxicity Test)», EPA-540/9-85-009, Washington, EPA, Hazard Evaluation Division, juin 1985, (1985b).

EPA, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, Fourth Edition, Rapport EPA/600/4-90/027F (1993) Agency, Washington, DC.

EVS *(EVS Consultants Ltd.),* «Literature Survey for the Development of a Marine Toxicity Assessment System». Rapport produit pour le SPE. North Vancouver, Environnement Canada, 1976.

EVS. «Experimental Studies for the Development of a Marine Toxicity Assessment System». Rapport produit pour le SPE, North Vancouver, Environnement Canada, 1977.

Hamilton, M.A., R.C. Russo et R.V. Thurston. « Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays». *Environmental Science and Technology,* vol. 11, 1977, p. 714-719.

Hart, J.L. *Pacific Fishes of Canada.* Bulletin no 180. Ottawa, Office des recherches sur les pêheries du Canada, 1973.

Hubert, J.J. «PROBIT2: A Microcomputer Program for Probit Analysis». Guelph, University of Guelph, Department of Mathematics and Statistics, 1987.

Litchfield, J.T. « A Method for Rapid Graphic Solution of Time-percent Effect Curves». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,* vol. 97, 1949, p. 399-408.

Loch, J.S. et J.C. MacLeod. «Factors Affecting Acute Toxicity Bioassays with Pulp Mill Effluent». Technical Report Series No. Cen/T-74-2. Winnipeg, Environment Cnaada, Service des pêches et des sciences de la mer, région du Centre, 1979. 31 p.

McCaffrey, L. « The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14(1)(a) of the *Environmental Protection Act,* 1971 and Section 32(1) of the *Ontario Water Resources Act*». *Proceedings of the Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Hamilton , Ontario, November 7-9, 1978*. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer no 862. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1979, p. 15-22.

McLeay, D.J., A.J. Knox, J.G. Malick, I.K. Birtwell, G. Hartman et G.L. Ennis. «Effects on Arctic Grayling *(Thymallus arcticus)* of Short-term Exposure to Yukon Placer Mining Sediments: Laboratory and Field Studies». rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques no 1171, 1983. 134 p.

McLeay, D.J., I.K. Birtwell, G. Hartman et G.L. Ennis. «Responses of Arctic Grayling *(Thymallus arcticus)* to Acute and Prolonged Exposure to Yukon Placer Mining Effluent». *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, vol. 44, 1987. p. 658-673.

Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan, «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034, Duluth, MN, EPA, 1988.

Noggle, C. «The Behavioural and Physiological Effects of Suspended Sediment on Juvenile Salmonids». Proceedings of the Fourth Annual Aquatic Toxicity Workshop, Vancouver, B.C., november 8-10, 1977. Rapport technique du Service des pêches et des sciences de la mer, no 818. Ottawa, Pêches et Environnement Canada, 1978, p. 54-63.

OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). *Lignes directrices de l''OCDE pour les essais de produits chimiques*. Paris, 1984.

Purcell, W.F. «Response of Two Sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* and *Gasterosteus wheatlandi* to Vertical Gradients of Salinity». Thèse de M.Sc., Delhaize University, Halifax, 1979.

Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts, and R.H. Young, «Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish», Victoria, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, 1982. 18 p.

Scott, W.B. et E.F. Crossman. *Poissons d'eau douce du Canada*. Bulletin no 184. Ottawa, office des recherches sur les pêcheries du Canada, 1973.

Scott, W.B. et M.G. Scott. *Atlantic Fishes of Canada.* Toronto, University of Toronto Press, 1988.

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

Servizi, J. et R.W. Gordon. «Detoxification of TMP and CTMP Effluents Alternating in a Pilot Scale Aerated Lagoon». Pulp & Paper Canada, vol 87, no 11, 1986, p. 404-409.

Servizi, J.A. et D.W. Martens. «Some Effects of Suspended Fraser River Sediments on Sockeye Salmon *(Oncorhynchus nerka)*». *Sockeye Salmon (Oncorhynchus nerka) Population Biology and Future Management*. H.D. Smith, L. Margolis et C.C. Wood (éd.). Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques no 96. Ottawa, Pêches et Océans Canada, 1987, p. 254-264.

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

SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règles d'emploi et d'admissibilité des dispersants pour traiter les nappes de pétrole.* Rapport SPE 1-DIU-73-1, Ottawa 1973.

SPE. *Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents.* Rapport SPE 1-WP-80-1. Ottawa, 1980.

SPE. «Laboratory Procedure for Detemining the Acute Lethality of Oil-based Drilling Fluids to Marine Fish». Dartmouth, mars 1985.

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

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

van de Dikkenberg, R.P., H.H. Canton, L.A.M. Mathijssen-Speikmand et C.J. Roghair. «The Usefulness of *Gasterosteus aculeatus* - The Threespine Stickleback - as a Test Organism in Routine Toxicity Tests». Report 7186250033. Danemark, National Institutes of Public Health and Environmental Protection, avril 1989.

Venables, B. « *Mysidopsis* sp. : Life History and Culture ». Rapport inédit d'un atelier tenu à gulf Breeze (Floride) sous les auspices de American Petroleum Association, 15–16 octobre, 1986.

Walden, C.C., D.J. McLeay et P.D. Monteith. «Comparing Bioassay Procedures for Pulp and Paper Effluents». *Pulp & Paper Canada,* vol. 76, 1975, p. 130-134.

Wong, C.C., D.J. McLeay et P.D. Monteith. «Comparing Bioassay Procedures for Pulp and Paper Effluents». *Pulp & Paper Canada*, vol., 76, 1975, p. 130-134.

Wootton, R.J. *The Biology of the Sticklebacks.* Londres, Academic Press, 1976.

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

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (en juillet 1990)

Gouvernement fédéral (Environnement Canada)

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

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

K. Doe
Dartmouth (N.-É.)

W. Parker
Dartmouth (N.-É.)

N. Bermingham
Longueuil (Québec)

C. Blaise
Longueuil (Québec)

G. Elliot
Edmonton (Alberta)

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

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

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

C. Kriz
Direction des programmes fédéraux
Ottawa (Ontario)

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

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

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement technologique
Edmonton (Alberta)

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

Gouvernements provinciaux

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

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

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

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

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

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

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

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection

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

Région de l'Ontario
4905, rue Dufferin, 2è étage
Downsview (Ontario)
M3H 5T4

Région de l'Atlantique
15e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région des Prairies et du Nord
Twin Atria No. 2, pièce 210
4999-98e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Québec
105, rue McGill, 8è étage
Montréal (Québec)
H2Y 2E7

Région du Pacifique et du Yukon*
224, rue Esplanade ouest
North Vancouver (C.-B.)
V7M 3H7

---

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

Écarts de méthodologie pour l'exécution d'essais de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines*

1. Type d'essai et de substance à expérimenter

Document	Type d'essai	Substance
SPE, 1985	statique	fluide de forage
Wong, 1982	statique	fluides de forage

2. Conditions d'acclimatation des poissons

Document	Durée (sem.)	Avant l'essai	Pendant l'essai
SPE, 1985	≥2	≥1,4	≤10
Wong, 1982	≥3	>1,4	≤10

3. Conditions d'alimentation

Document	Type d'aliment	Avant l'essai	Pendant l'essai
SPE, 1985	artémias, poisson frais haché ou flocons pour poissons tropicaux	chaque jour; ne pas nourrir 24 h avant l'essai	ne pas nourrir
Wong, 1982	nourriture contenant de 30 à 40 % de protéines et quelques substances végétales	deux fois par jour; de 3 à 5 % du poids corporel	ne pas nourrir

* D'après les documents de méthodologie d'Environnement Canada et de Pêches et Océans Canada dont disposaient les auteurs en date de septembre 1988.

4. Type d'eau de contrôle/de dilution

Document	Type et traitement recommandés
SPE, 1985	eau de mer naturelle ou artificielle
Wong, 1982	eau de mer naturelle ou artificielle

5. Correction du pH avant et pendant l'essai

Document	Avant l'essai	Pendant l'essai
SPE, 1985	au besoin, corriger le pH de la solution d'essai pour qu'il se situe entre 7,0 et 9,0	au besoin, corriger chaque jour le pH de la solution d'essai pour qu'il se situe entre 7,0 et 9,0
Wong 1982	corriger le pH de l'échantillon pour qu'il correspond, à 0,5 unité près, à celui de l'eau d'acclimatation	non indiqué

6. Température avant et pendant l'essai

Document	Taux d'acclimatation (°C/d)	Température d'acclimatation (°C)	Température d'essai (°C)
SPE, 1985	graduel	10 ± 1	10 ± 1
Wong 1982	≤5	10 ± 1	10 ± 1

7. Aération pendant l'essai

Document	Oxygène Dissous pendant L'acclimatation	Aération avant l'essai (mL/min · L)	Aération au cours de l'essai (mL/min · L)
SPE, 1985	>80 % de saturation	≤7,5	≤7,5
Wong, 1982	7 mg/L	5-7,5 pendant ≤2 h	5-7,5

8. Salinité avant et pendant l'essai

Document	Salinité pendant l'acclimatation (‰)	Salinité de l'eau de contrôle/de dilution (‰)
SPE, 1985	non indiqué	30-35
Wong, 1982	20-25* ou 27-32**	non indiqué

* Pour l'essai d'échantillons de la mer de Beaufort.

** Pour l'essai d'échantillons du détroit de Davis.

9. Conditions d'éclairement avant et pendant l'essai

Document	Photopériode (lumière : obscurité)	Intensité (lux)	Aube/crépuscule (min)
SPE, 1985	14 h : 10 h	20-30	≥15
Wong, 1982	10 h : 14 h	20-30	≥15

10. Poids des poissons

Document	Poids (g)
SPE, 1985	0,2–3,0
Wong, 1982	0,5–1,0

11. Mise en route de l'essai

Document	Nombre de poissons par solution	Nombre de solutions d'essai	Profondeur des solutions (cm)	Densité de chargement (g/L)
SPE, 1985	≥10	≥6	≥15	≤0,5
Wong 1982	≥5	≥6	≥15	non indiqué

12. Résultats

Document	Durée de l'essai	CSEO*	CL50 après 96 h
SPE, 1985	96 h	indéterminée	oui
Wong, 1982	96 h	indéterminée	oui

13. Conditions de validité de l'essai

Document	% de survie à l'acclimatation	% de survie des poissons témoins
SPE, 1985	non indiqué	≥90 %
Wong, 1982	≥99 % par jour pendant deux semaines avant l'essai	≥90 %

14. Produit toxique de référence

Document	Produit chimique
SPE, 1985	non indiqué
Wong, 1982	non indiqué

Série logarithmique de concentrations convenant aux essais de toxicité*

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

1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,2	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

* Adapté de Rocchini *et al.,* 1982.

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

Termes covenant à la description de l'aspect et du comportement des poissons*

Terme	Définition
Tégument	**Revêtement épithélial du corps, y compris les branchies**
Décollé	- décollement ou perte de parties du tégument
Muqueux	- sécrétions excessives de mucus, surtout évidentes sur les branchies
Hémorragique	- saignement (p. ex., dans les branchies, l'ouverture anale ou les yeux)
Pigmentation	**Couleur de la peau, attribuable au dépôt ou à la distribution de pigments**
Pâle	- couleur plus pâle que la normale pour l'espèce (telle qu'elle apparaît dans les conditions de l'essai, à l'exclusion de la solution d'essai)
Foncée	- couleur plus foncée que la normale pour l'espèce (telle qu'elle apparaît dans les conditions de l'essai, à l'exclusion de la solution d'essai)
Tachetée	- couleur anormalement variée des poissons, pris individuellement
Comportement général	**Réactions observables des poissons soumis à l'essais, individuellement ou en groupe, dans leur environnement**
Passif	- en état d'inactivité anormalement faible; immobile ou quasi immobile
Surexcitable	- réagissant à des stimuli beaucoup plus intensément que les poissons témoins
Irrité	- présentant une hyperactivité plus ou moins continue
En surface	- restant très longtemps à la surface
En plongée	- plongeant soudainement au fond du réservoir et y restant très longtemps
Spasmodique	- agité de mouvements brusques (spasmes musculaires) sur une partie ou la totalité du corps
Tétanique	- en état de tétanie, caractérisé par des spasmes tétaniques intermittents des muscles volontaires
Normal	- en apparence non affecté par la solution d'essai ((ou non exposé à elle); conforme à l'aspect normal et aux caractéristiques de comportement habituel de l'espèce dans les conditions d'essai définies
Nage	**Autopropulsion progressive dans l'eau par un mouvement coordonné de la queue, du corps et des nageoires**
Interrompue	- absence de mouvement
Irrégulière	- évolution caractérisée par un manque d'uniformité, de régularité ou de cohérence; mouvement fluctuant et intégral
Giratoire	- le poisson tourne autour d'un point central ou évolue en spirale autour d'un axe
Éclaboussante	- les poisson nage très vite à la surface, avec des mouvements rapides du corps
Inversée	- le poisson est sur le dos (ou à peu près)
Sur le flanc	- le poisson est retourné à ± 90° sur le côté par rapport à la position normale du corps
Respiration	**Échange physique d'eau à la surface des branchies, se manifestant par le mouvement des opercules**
Rapide	- plus rapide que la normale (rythme respiratoire manifestement plus rapide que celui des poissons témoins)
Lente	- plus lente que la normale (rythme respiratoire manifestement plus lent que celui des poissons témoins)
Toux	- accroissement (par rapport aux poissons témoins) des cas de toux (circulation inverse dans les branchies, se manifeste par l'ouverture marquée des opercules)
En surface	- le poisson nage à la surface, la bouche ouverte, en pompant de l'eau ou de l'air par les branchies
Irrégulière	- ne se produisant pas à intervalles réguliers (rythmiques)

* Adapté de EPA, 1985a.