



**Procédure révisée pour l'ajustement de la salinité d'échantillons  
d'effluents soumis à un essai de toxicité sublétales en milieu marin  
conduit dans le cadre des programmes d'étude de suivi des effets  
sur l'environnement (ESEE)**

**PROCÉDURE RÉVISÉE POUR L'AJUSTEMENT DE LA SALINITÉ  
D'ÉCHANTILLONS D'EFFLUENTS SOUMIS À UN ESSAI DE  
TOXICITÉ SUBLÉTALE EN MILIEU MARIN CONDUIT DANS LE  
CADRE DES PROGRAMMES D'ÉTUDE DE SUIVI DES EFFETS  
SUR L'ENVIRONNEMENT (ESEE)**

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

**Décembre 2001**

# PROCÉDURE RÉVISÉE POUR L'AJUSTEMENT DE LA SALINITÉ D'ÉCHANTILLONS D'EFFLUENTS SOUMIS À UN ESSAI DE TOXICITÉ SUBLÉTALE EN MILIEU MARIN CONDUIT DANS LE CADRE DES PROGRAMMES D'ÉTUDE DE SUIVI DES EFFETS SUR L'ENVIRONNEMENT (ESEE)

---

## 1.0 *Application*

Environnement Canada recommande dorénavant de suivre les procédures suivantes pour l'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents devant servir à des essais de toxicité conduits conformément aux exigences des programmes d'étude de suivi des effets sur l'environnement (ÉSEE) pour les installations qui évacuent leurs rejets en milieu marin. Ces procédures sont applicables lors d'évaluation de la toxicité sublétales d'échantillons d'effluents au moyen des essais suivants :

- (a) The 7-day larval survival-and-growth test with the inland silverside fish *Menidia beryllina* (Essai de survie et de croissance sur 7 jours avec des larves de *Menidia beryllina*), exécuté selon le protocole décrit à la section 13 des méthodes de l'USEPA (1994).
- (b) The 7 day larval survival-and-growth test with the topsmelt fish *Atherinops affinis* (Essai de survie et de croissance sur 7 jours de larves de Capucettes barrées *Atherinops affinis*), exécuté selon le protocole décrit à la section 11 des méthodes de l'USEPA (1995).
- (c) Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats), exécuté selon le protocole d'Environnement Canada (1992), modifié en novembre 1997.
- (d) The sexual reproduction test using the red macroalga *Champia parvula* (Essai de reproduction avec la macroalgue rouge *Champia parvula*), exécuté selon le protocole décrit à la section 16 des méthodes de l'USEPA (1994).

Ces procédures annulent et remplacent celles recommandées auparavant par Environnement Canada (EC, 1997) pour l'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents devant servir à des essais de toxicité sublétales en milieu marin conduits conformément aux programmes d'étude de suivi des effets sur l'environnement.

## 2.0 *Bien-fondé*

L'étude de Jonczyk *et al.* (2001) récemment publiée a montré que lorsqu'on conduisait un essai de fécondation chez des oursins selon la méthode d'Environnement Canada (EC, 1992), la toxicité sublétales de nombreux échantillons d'effluents industriels ne variait pas lorsque leur salinité était ajustée soit par l'ajout direct de sels secs ou l'ajout de saumure hautement concentrée (SHC). L'étude a de plus démontré que l'utilisation d'eau de mer artificielle ou d'eau

de mer naturelle comme eau de contrôle/de dilution n'influençait en rien la toxicité de l'échantillon. Ces résultats, joints au désir de pouvoir conduire des essais de toxicité sublétales d'échantillons d'effluent de concentrations allant jusqu'à 100 % (c.-à-d., effluent non dilué), nous ont incité à revoir les lignes directrices actuelles d'Environnement Canada pour l'ajustement de la salinité en vue d'essais de toxicité sublétales en milieu marin conduits conformément aux programmes d'étude de suivi des effets sur l'environnement (ÉSEE) (EC, 1997).

Les procédures révisées d'ajustement de la salinité maintenant recommandées par Environnement Canada sont présentées dans les paragraphes qui suivent. Ces procédures révisées offrent d'autres alternatives pour l'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluent et de l'eau de contrôle/de dilution utilisés pour les essais de toxicité sublétales. Selon les alternatives choisies, la toxicité d'un échantillon peut maintenant être déterminée aussi bien avec l'échantillon d'effluent non dilué (100 % d'effluent) qu'à des concentrations plus faibles.<sup>1</sup> De plus, il est maintenant possible d'utiliser de l'eau de mer artificielle (préparée au moyen de SHC ou par l'ajout direct de sel sec à de l'eau déionisée ou autre) comme eau de contrôle/de dilution.<sup>2</sup>

### 3.0 *Salinité de la solution d'essai*

Nous donnons ici la marche à suivre pour ajuster la salinité d'un effluent soumis à l'évaluation des effets sublétaux potentiels chez des organismes marins, conformément au programme d'étude de suivi des effets sur l'environnement. Quelle que soit la méthode d'essai biologique identifiée dans le présent document pour l'analyse d'effluents (voir sous-sections 1.0 et 7.0), la salinité d'essai doit être de  $30 \pm 2$  ‰. Par conséquent, la gamme de salinité de toutes les solutions d'essai et tout au long de l'essai doit s'établir entre 28 et 32 ‰.<sup>3</sup>

### 4.0 *Ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents*

La salinité de chaque échantillon d'effluent soumis à l'un ou l'autre des essais de toxicité indiqués à la section 1.0 du présent document doit être ajustée à  $30 \pm 2$  ‰ (soit la salinité d'essai déterminée; voir Section 3.0) avant de préparer les concentrations d'essai. Pour ce faire, on peut adopter l'une ou l'autre des deux approches proposées : (1) ajustement de la salinité par ajout

<sup>1</sup> En utilisant la procédure d'ajustement de la salinité d'un échantillon recommandée dans EC (1997), c.-à-d., l'ajout à l'effluent d'une quantité de SHC à  $90 \pm 1$  ‰, suffisante pour porter la salinité de l'échantillon à  $30 \pm 2$  ‰, la plus forte concentration d'effluent qui pourrait être incluse dans un essai à concentrations multiples serait de ~70 % si la salinité de l'échantillon était de 0 ‰.

<sup>2</sup> Les procédures publiées précédemment (EC, 1997) recommandaient que la SHC soit préparée avec de l'eau de mer naturelle non contaminée, et d'utiliser la SHC ainsi préparée aussi bien comme eau de contrôle/de dilution que pour l'ajustement de la salinité.

<sup>3</sup> Deux des quatre essais de toxicité en milieu marin considérés ici (Essai de fécondation chez les échinides selon la méthode d'EC 1992 et l'essai de reproduction sexuelle avec *Champia* exécuté conformément aux procédures décrites dans la section 16 de l'USEPA 1994) précisent que la salinité de l'essai doit être de  $30 \pm 2$  ‰. Les deux autres méthodes d'essai biologique (soit les deux essais de survie et de croissance de Capucettes barrées ou de *Menidia beryllina* au stade larvaire) spécifient que la salinité d'essai doit se trouver dans la plage de 5 à 32 ‰ (voir section 13 de USEPA, 1994) ou de 5 à 34 ‰ (voir section 11 dans USEPA, 1995), l'écart des répétitions de solution (réplicats) par rapport à la salinité d'essai déterminée étant de  $\pm 2$  ‰. Pour les fins du programme d'étude de suivi des effets sur l'environnement, et en vue d'établir une approche normalisée d'ajustement de la salinité d'échantillons d'effluents applicable à chacun des quatre essais de toxicité en milieu marin, nous avons choisi une salinité d'essai de  $30 \pm 2$  ‰.

direct de sel sec à l'effluent ou (2) ajustement de la salinité par ajout de saumure hautement concentrée (SHC).

Quelle que soit l'alternative retenue, la salinité de l'échantillon devrait être ajustée le plus rapidement possible après la réception de l'effluent au laboratoire.<sup>4</sup> La température de l'échantillon ne doit pas être portée à celle de l'essai avant l'ajustement de la salinité. La température de l'échantillon au cours de l'ajustement de la salinité devrait plutôt être proche de celle de l'échantillon à sa réception au laboratoire ou, si l'échantillon a été entreposé pendant la nuit (dans quel cas il doit être maintenu au réfrigérateur à  $4 \pm 2$  °C), à la température de l'effluent à la sortie du réfrigérateur.

Si l'on choisit la première alternative, on peut soit ajouter un mélange de sels de mer secs disponibles dans le commerce<sup>5</sup> ou des sels de qualité réactif<sup>6</sup> à l'échantillon d'effluent non dilué, et ce, en quantité suffisante pour porter la salinité de l'échantillon à  $30 \pm 2$  ‰ (c.-à-d., la gamme de salinité acceptable pour chaque essai; voir section 3.0). Tout échantillon (ou sous-échantillon) auquel on ajoute directement des sels secs doit être vieilli pendant 16 à 24 h avant emploi (ou, dans le cas d'essai statique avec renouvellement, avant la première utilisation<sup>4</sup>) dans un essai de toxicité.<sup>7</sup> Pour le vieillissement de l'échantillon, il faut ajouter la quantité requise de sels tout en

<sup>4</sup> Les essais de toxicité avec des Capucettes barrées à l'état larvaire, exécutés selon le protocole décrit à la Section 13 de l'USEPA (1994), ou avec des larves de *Atherinops affinis*, exécutés selon le protocole décrit à la Section 11 de USEPA (1995), sont des essais statiques avec renouvellement quotidien de chaque solution au cours des 7 jours de l'essai. Si l'un ou l'autre de ces essais est conduit avec un seul échantillon d'effluent qui est conservé (sous forme de sous-échantillons) au laboratoire d'essai dans trois récipients distincts (c.-à-d., sous-échantillon 1 utilisé les jours 0, 1 et 2; sous-échantillon 2 utilisé les jours 3 et 4; et sous-échantillon 3 utilisé les jours 5, 6 et 7), il faut dans ce cas ajuster la salinité de chaque sous-échantillon immédiatement avant de préparer chacun des aliquots pour la mise en route de l'essai. Si l'ajustement de la salinité de l'échantillon est fait par ajout de sels secs, les sels doivent être ajoutés juste avant la période de vieillissement de 16 à 24 h précédant la première utilisation de ce sous-échantillon pour l'essai de toxicité. Si l'on a opté pour l'ajustement de la salinité avec de la SHC préparée avec de l'eau de mer naturelle ou artificielle, la saumure doit être ajoutée immédiatement avant la première utilisation du sous-échantillon pour l'essai de toxicité.

<sup>5</sup> Les mélanges de sels de mer secs disponibles sur le marché comprennent les produits vendus dans les commerces de produits pour aquariums sous des noms commerciaux tels que Instant Ocean<sup>MD</sup>, Forty Fathoms<sup>MD</sup>, et HW Marinemix<sup>MD</sup> (EC, 1992; Neiheisel et Young, 1992; USEPA, 1994, 1995; Jonczyk *et al.*, 2001). Neiheisel et Young (1992), ainsi que Jonczyk *et al.* (2001) rapportent de bons résultats dans les essais de fécondation chez les échinides (oursins de mer) dans lesquels on avait utilisé la marque Instant Ocean<sup>MD</sup> pour l'ajustement de la salinité de l'échantillon et la préparation de l'eau de contrôle/de dilution. Les laboratoires d'essai devraient se procurer la « meilleure qualité » de sels de mer commerciaux (p. ex., Forty Fathoms – Qualité pour Essais) disponibles chez le fournisseur, et devraient évaluer s'ils rencontrent les exigences de validité de l'essai en conduisant des essais de toxicité préliminaires avec ce genre de nouveaux produits ou de nouveaux lots pour préparer les *témoins de sels* (voir section 5.0).

<sup>6</sup> Spotte *et al.* (1984) et Bidwell et Spotte (1985) ont publié une formule pour préparer une SHC avec de l'eau de mer artificielle (ou de l'eau de contrôle/de dilution artificielle; voir section 5.0) avec un mélange de sels de qualité réactif dissous dans de l'eau déionisée, appelée « GP 2 modifié ». Cette formule est également fournie par l'USEPA (1994 - voir tableau 2, sections 13 et 16; 1995 - voir tableau 2, section 7).

<sup>7</sup> Les échantillons d'effluent (ou sous-échantillons; voir note de bas de page 4) dont la salinité a été ajustée devraient être soumis à une période standard de vieillissement de 24 h lorsque cela s'avère possible sans avoir à travailler le soir. Cette période de vieillissement peut cependant être ramenée à 16 h si l'échantillon a déjà deux jours à son arrivée au laboratoire et qu'il est reçu en fin d'après-midi. Dans un tel cas et afin de respecter le délai maximum de 3 jours entre la collecte de l'échantillon et la mise en route de l'essai (EC, 1992; USEPA, 1994, 1995), la période de vieillissement (pour permettre l'atteinte de l'équilibre chimique d'un effluent dont la salinité a été ajustée), peut être ramenée à 16 h. Quoi qu'il en soit, l'essai de toxicité sublétales doit être entrepris dans les 3 jours à partir de la collecte de l'échantillon.

brassant l'échantillon, après quoi l'échantillon d'effluent dont la salinité a été ajustée à  $30 \pm 2$  ‰ doit être gardé pendant 16 à 24 h à  $4 \pm 2$  °C et à l'obscurité, dans un récipient hermétiquement fermé et avec un vide d'air minimal (et sans aucune aération) (Jonczyk *et al.*, 2001). Le pH de l'échantillon devrait être mesuré et noté avant et sitôt après l'ajout du sel, mais avant le vieillissement.<sup>8</sup> Après le vieillissement, l'échantillon d'effluent devrait être brassé et il faudrait porter sa température à celle de la température d'essai (voir EC, 1992; USEPA 1994, 1995), mesurer et noter son pH<sup>8</sup>, préparer les concentrations d'essai (voir section 5.0), et mettre en route l'essai.

Si l'on a choisi la deuxième alternative, la salinité de l'échantillon doit être ajustée à la salinité de l'essai ( $30 \pm 2$  ‰) par l'ajout de la quantité voulue de saumure hautement concentrée (et au besoin, d'eau déionisée). Il faut alors utiliser de la saumure hautement concentrée (SHC) ajustée à une salinité finale de  $90 \pm 1$  ‰<sup>9</sup>. La saumure peut être préparée en concentrant de l'eau de mer naturelle non contaminée par congélation ou évaporation, ou par l'ajout de sels commerciaux (p ex., Instant Ocean<sup>MD</sup>)<sup>5</sup> ou un mélange approprié de sels de qualité réactif (p. ex., « GP 2 modifié »; voir Spotte *et al.*, 1984; Bidwell et Spotte, 1985; tableau 2 dans les sections 13 et 16 de USEPA, 1994; ou tableau 2 de la section 7 de USEPA 1995) en quantité suffisante pour obtenir une salinité de  $90 \pm 1$  ‰. Les instructions pour préparer de la SHC avec de l'eau de mer naturelle par congélation ou évaporation sont données dans les documents de Environnement Canada (1992) et de l'USEPA (1994, 1995) et sont résumées ci-dessous.

Pour préparer de la saumure hautement concentrée naturelle, on devrait faire passer de l'eau de mer naturelle de haute qualité (et préférablement de salinité élevée) dans un filtre d'au moins 10 µm avant la congélation ou l'évaporation. Si la SHC est préparée par congélation, congeler l'eau de mer entre -10 et -20 °C pendant  $\geq 6$  h et recueillir la saumure sous la glace lorsque la salinité a atteint  $90 \pm 1$  ‰ (EC, 1992; USEPA, 1995). Si la SHC est préparée par évaporation, chauffer l'eau de mer à  $\leq 40$  °C dans un récipient résistant à la corrosion et fait d'un matériau non toxique, tout en l'aérant, jusqu'à l'obtention de la salinité souhaitée, soit  $90 \pm 1$  ‰. Quel que soit le procédé utilisé (congélation ou évaporation), la salinité de la saumure devrait être

<sup>8</sup> Ces mesures visent à déterminer et à noter à partir de quel point l'ajout de sels modifie le pH de l'échantillon. Lorsqu'on compare ces mesures du pH au pH de l'effluent au moment de la préparation des solutions d'essai (voir ci-dessous), on peut mieux cerner les effets liés à l'ajout de sels et au vieillissement subséquent de l'échantillon sur le pH. Ces renseignements sont utiles pour déterminer les effets de ces manipulations sur l'intégrité de l'échantillon et lors de l'interprétation des résultats de l'essai de toxicité. Il est reconnu que les changements du pH peuvent fortement influencer la toxicité de l'échantillon. On peut supposer que certaines formulations de sels utilisées pour ajuster le pH de l'échantillon pourraient agir sur le pH; ce pourrait être le cas si de la SHC préparée avec de l'eau de mer naturelle était utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon ou lors du mélange de l'effluent dans un milieu marin naturel. Une comparaison des valeurs de pH mesuré lors de l'ajout de sels à l'effluent et après la période de vieillissement de 16 à 24 h renseigne aussi sur les changements des propriétés chimiques de l'échantillon survenus au cours de cette période.

<sup>9</sup> Bien que l'USEPA (1994,1995) précise que les solutions de saumure hautement concentrée peuvent être préparées dans une plage de salinité pouvant atteindre jusqu'à 100 ‰, Environnement Canada a choisi une salinité finale de  $90 \pm 1$  ‰ pour la SHC (artificielle ou préparée avec de l'eau de mer naturelle) pour éviter des dépassements qui pourraient entraîner des problèmes dus à la précipitation du sel. En cours de préparation de la saumure, sa salinité peut augmenter jusqu'à 100 ‰; il faut toutefois éviter de dépasser cette limite et la salinité finale doit être ajustée dans la plage de  $90 \pm 1$  ‰ par l'ajout du volume requis d'eau déionisée, d'eau de mer naturelle, ou de SHC de plus faible salinité. Pour un essai avec une solution dont la salinité est de 30 ‰, l'utilisation d'une SHC ayant une salinité finale de  $90 \pm 1$  ‰ permet de ramener la plus forte concentration d'effluent dans la solution d'essai de 70 % (si une solution de SHC de 100 ‰ est utilisée) à 67 % (avec une solution de saumure hautement concentrée à 90 ‰) (EC, 1992; USEPA, 1994).

contrôlée au cours de sa préparation et ne doit pas dépasser 100 %.<sup>9</sup> Lorsque la SHC atteint la salinité voulue ( $90 \pm 1 \text{ ‰}$ ), la SHC devrait être filtrée à  $\leq 1 \text{ }\mu\text{m}$  (USEPA, 1994; 1995) et versée dans des récipients (p. ex., des bonbonnes compressibles de 20 L en polyéthylène ou en polycarbonate).

Chaque récipient devrait être rempli, fermé et étiqueté en indiquant la salinité de la SHC et sa date de préparation. La saumure hautement concentrée naturelle fraîchement préparée peut être utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon (ou comme eau de contrôle/de dilution; voir section 5.0) dès qu'elle est prête, ou elle peut être entreposée à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière. L'expérience a montré qu'entreposée dans ces conditions, la saumure peut être conservée pendant plusieurs mois (USEPA, 1994; 1995).

Toute saumure artificielle hautement concentrée préparée avec des sels de mer commerciaux (p. ex., Instant Ocean<sup>MD</sup>) ou des sels de qualité réactif (p. ex., « GP2 modifié ») doit être filtrée (mailles  $\leq 1 \text{ }\mu\text{m}$ ), puis aérée vigoureusement pendant au moins 24 h avant de pouvoir l'utiliser. Par la suite, les portions de SHC non utilisées devraient être fermées et conservées à  $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation. La qualité de la saumure hautement concentrée est généralement acceptable même après plusieurs mois d'entreposage (USEPA, 1995).

Lorsqu'on procède par ajout direct de sels secs à l'échantillon d'effluent conformément à la première alternative décrite ici, l'essai de toxicité sublétales peut et devrait comprendre une concentration d'essai à 100 % d'effluent. Avec la deuxième alternative, c'est-à-dire l'ajout à l'échantillon non dilué de saumure hautement concentrée (naturelle ou artificielle) ayant une salinité de  $90 \pm 1 \text{ ‰}$ , la concentration maximale d'effluent qui peut être préparée et testée à la salinité de  $30 \text{ ‰}$  est de 67 % v/v si l'effluent a une salinité initiale de  $0 \text{ ‰}$  (EC, 1992). En conséquence, il est recommandé que tout essai de toxicité sublétales conduit avec un effluent dont la salinité est ajustée à  $30 \pm 2 \text{ ‰}$  avec de la SHC (naturelle ou artificielle) devrait comprendre une solution d'essai à 67 % d'effluent (soit la plus forte concentration d'essai qu'il est possible d'obtenir avec de la SHC) ainsi que des concentrations plus faibles.

## 5.0 Eau de contrôle/de dilution

La salinité de l'eau de contrôle/de dilution (c.-à-d., l'eau de mer utilisée pour la série de solutions d'eau de contrôle/de dilution soumises à l'essai de toxicité et comme eau de dilution utilisée pour préparer chaque concentration d'effluent soumise à l'essai) doit être ajustée à la salinité de l'essai (c.-à-d.,  $30 \pm 2 \text{ ‰}$ ) avant utilisation. L'eau de dilution/de contrôle peut être préparée en adoptant l'une ou l'autre des quatre approches suivantes : (1) l'eau de mer artificielle est portée à la salinité de l'essai en ajoutant la quantité voulue de sels marins secs disponibles dans le commerce (p. ex., Instant Ocean<sup>MD</sup>) ou des sels de qualité réactif (p. ex., « GP2 modifié ») à de l'eau déionisée; (2) des quantités adéquates de saumure hautement concentrée naturelle ou artificielle et de l'eau déionisée sont mélangées; (3) on utilise de l'eau de mer naturelle non contaminée ayant une salinité de  $30 \pm 2 \text{ ‰}$ ; ou (4) de l'eau de mer naturelle non contaminée ayant une salinité inférieure (c.-à-d.,  $< 28 \text{ ‰}$ ) ou supérieure (c.-à-d.,  $> 32 \text{ ‰}$ ) est mélangée avec des sels de mer secs, des sels de qualité réactif, de la SHC naturelle, de la SHC artificielle, ou de l'eau déionisée, en quantité suffisante pour ajuster sa salinité à une valeur se situant dans la gamme d'essai. Un lot donné d'eau de dilution (naturelle ou artificielle) ne devrait pas être utilisé plus de 14 jours après sa préparation. Le récipient servant à son entreposage durant cette période devrait être fermé et gardé à l'abri de la lumière (USEPA, 1994; 1995). Lors d'entreposage

prolongé (>1 jour), l'eau de mer naturelle ou artificielle préparée pour servir d'eau de dilution devrait être réfrigérée ( $4 \pm 2$  °C) pour minimiser la croissance microbienne.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée par ajout de sels de mer commerciaux (p. ex., Instant Ocean<sup>MD</sup>) ou de qualité réactif (p. ex., GP2 modifié) à de l'eau déionisée ou autre type d'eau (p. ex., eau de mer naturelle avec une salinité de <28 ‰) doit être brassée vigoureusement durant l'ajout du sel. Par la suite, le mélange (avec une salinité de  $30 \pm 2$  ‰) doit être aéré vigoureusement pendant au moins 24 h (USEPA, 1994, 1995) avant son utilisation.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée par l'ajout de SHC naturelle à de l'eau déionisée ou autre type d'eau (p. ex., eau de mer naturelle avec une salinité <28 ‰) doit être préparée conformément aux instructions données à la section 4.0 pour la préparation et l'entreposage de SHC naturelle. Le mélange (avec une salinité de  $30 \pm 2$  ‰) peut être utilisé pour préparer les témoins et les concentrations d'essai une fois que la salinité et la température requises pour l'essai ont été atteintes (voir EC, 1992; USEPA, 1994; 1995) et après aération de la solution d'essai pour obtenir une teneur en oxygène dissous dans la plage de 90 à 100 % de saturation.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée par ajout de SHC artificielle à de l'eau déionisée ou autre type d'eau (p. ex., eau de mer naturelle avec une salinité <28 ‰) doit être préparée en se conformant aux instructions données à la section 4.0 pour la préparation et l'entreposage de SHC artificielle. Toute SHC artificielle servant à cette fin doit être filtrée (mailles  $\leq 1$  µm) puis aérée vigoureusement pendant au moins 24 h avant emploi.

Toute eau de contrôle/de dilution préparée uniquement avec de l'eau de mer naturelle (salinité de  $30 \pm 2$  ‰) devrait être filtrée, aérée et entreposée au besoin, en observant la marche à suivre donnée dans la méthode d'essai respective (EC, 1992; USEPA, 1994, 1995). Avant utilisation, la quantité (y compris un surplus) d'eau de mer naturelle devant servir comme eau de contrôle/de dilution dans l'essai de toxicité sublétale doit être portée à la température de l'essai et aérée jusqu'à l'obtention de 90 à 100 % de saturation pour l'oxygène dissous à la température et la salinité de cet essai.<sup>10</sup>

Chaque essai de toxicité indiqué à la section 1.0 doit comprendre une ou plusieurs série(s) complète(s) de répétitions de solutions de contrôle. Pour tout essai où l'ajustement de la salinité à  $30 \pm 2$  ‰ (voir section 4.0) est fait au moyen de sels de mer secs commerciaux (p. ex., Instant Ocean<sup>MD</sup>) ou de qualité réactif (p.ex., « GP2 modifié ») ajoutés directement à l'échantillon d'effluent, une série de répétitions de solutions de contrôle (c.-à-d., « *témoins de sels* ») doit être incluse dans l'essai. Ces solutions de contrôle doivent être préparées en utilisant la même source, le même lot et la même concentration de sels secs que ceux ajoutés à l'échantillon d'effluent. Il en va de même pour chacun des essais pour lesquels on a recours à l'ajout de saumure hautement concentrée naturelle ou artificielle pour l'ajustement de la salinité de l'échantillon d'effluent (voir section 4.0). Une série de répétitions de solutions de contrôle (c.-à-d., « *témoins de SHC* ») doit être préparée en utilisant une la même source, le même lot et la même concentration de SHC que celle ajoutée à l'échantillon d'effluent. La salinité de ces répétitions de solutions de contrôle doit être de  $30 \pm 2$  ‰ lors de la préparation.

<sup>10</sup> Les valeurs de saturation en oxygène dissous (OD) dépendent à la fois de la température et de la salinité de l'eau (ou de l'effluent). Un tableau standard des valeurs d'OD versus la température et la salinité devrait être consulté.



Pour tout essai dans lequel l'eau de dilution n'est pas identique à l'eau de contrôle décrite dans les paragraphes qui précèdent<sup>11</sup>, il faut obligatoirement préparer une deuxième série de solutions de contrôle (c.-à-d., « *témoins d'eau de dilution* ») en utilisant une portion du même lot d'eau de dilution qui a servi à préparer les concentrations d'essai de l'échantillon d'effluent. La salinité de cette deuxième série de répétitions de solutions de contrôle doit être de  $30 \pm 2 \%$  au moment de leur préparation.

Les résultats pour chaque série de *témoins de sels*, *témoins de SHC* ou *témoins d'eau de dilution* utilisés dans un essai de toxicité doivent être étudiés pour déterminer s'ils respectent individuellement le critère spécifique à l'essai ou les critères de validité de l'essai (voir EC, 1992, section 4.5.1; USEPA, 1994, sections 13.12 et 16.11; et USEPA, 1995, section 11.12). Lorsque deux séries de solutions de contrôle sont utilisées (c.-à-d., *témoins de sels* ou *témoins de SHC* ainsi que *témoins d'eau de dilution*), les résultats de l'essai de toxicité sont considérés valides et acceptables seulement si chaque série de solutions de contrôle a individuellement satisfait aux exigences respectives de validité.<sup>12</sup>

Pour tout essai de toxicité comprenant une série de *témoins de sels* ou de *témoins de SHC*, ainsi qu'une série de *témoins d'eau de dilution*, et lorsque les résultats des deux témoins ont satisfait le critère de validité spécifique à l'essai ou les critères de l'essai, les exigences suivantes s'appliquent. Les résultats des deux séries de solutions de contrôle doivent être regroupés avant de calculer tout paramètre statistique comportant des comparaisons des résultats pour chaque série de concentrations d'essai en regard des résultats pour les solutions de contrôle.<sup>13</sup>

<sup>11</sup> Les cas où l'eau de dilution est différente de l'eau de contrôle décrite dans le paragraphe précédent peuvent notamment inclure les circonstances suivantes : (a) des sels de mer secs sont utilisés pour l'ajustement de la salinité de l'échantillon d'effluent, alors que de l'eau de mer naturelle non contaminée d'une salinité de  $30 \pm 2 \%$  est utilisée comme eau de dilution; (b) des sels de mer secs sont utilisés pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et un mélange d'eau de mer naturelle et de SHC (naturelle ou artificielle) d'une salinité finale de  $30 \pm 2 \%$  est utilisé comme eau de dilution; (c) des sels secs sont utilisés pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et un mélange d'eau déionisée et de SHC (naturelle ou artificielle) de salinité finale de  $30 \pm 2 \%$  est utilisé comme eau de dilution; (d) de la SHC (naturelle ou artificielle) est utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et de l'eau de mer naturelle non contaminée d'une salinité de  $30 \pm 2 \%$  est utilisée comme eau de dilution; (e) de la SHC (naturelle ou artificielle) est utilisée pour ajuster la salinité de l'échantillon d'effluent, et un mélange d'eau de mer naturelle et de SHC (naturelle ou artificielle) ayant une salinité finale de  $30 \pm 2 \%$  est utilisé comme eau de dilution. Dans chacune de ces circonstances (ou toute autre) où l'eau de dilution est différente de l'eau de contrôle décrite dans le paragraphe précédent, une deuxième série de solutions de contrôle doit être préparée en utilisant *uniquement* de l'eau de dilution d'une salinité de  $30 \pm 2 \%$ .

<sup>12</sup> Pour que les résultats de tout essai de toxicité qui comprend deux séries de témoins (c.-à-d., un *témoin de sels* et un *témoin d'eau de dilution*, ou un *témoin de SHC* et un *témoin d'eau de dilution*) soient considérés valides et acceptables, il faut que les deux témoins satisfassent individuellement le ou les critères de validité de l'essai. Une approche acceptable consiste à regrouper les données de ces deux séries de témoins avant de juger si les résultats de l'essai sont valides ou non, étant donné que le regroupement pourrait dans certains cas masquer une série inacceptable de résultats témoins.

<sup>13</sup> Pour un essai qui comprend un *témoin de sels* ou un *témoin de SHC* et un *témoin d'eau de dilution*, le regroupement des données des deux séries de solutions de contrôle est logique d'un point de vue biologique, étant donné que les organismes d'essai soumis à une gamme de concentrations de l'échantillon d'effluent seraient exposés à chacune de ces solutions d'essai. Le *témoin de sels* ou le *témoin de SHC* sont les plus représentatifs de la concentration à 100 % ainsi que des autres concentrations  $>50 \%$  d'effluent. Par contre, le *témoin d'eau de dilution* est celui qui représente le mieux les concentrations  $<50 \%$  d'effluent (bien qu'en fait ce soit le cas avec toute concentration comportant une dilution de l'effluent). Le simple regroupement des données des deux séries de solutions de contrôle intègre efficacement l'influence combinée du sel ou de la SHC ajoutés à l'échantillon d'effluent pour en ajuster la salinité ainsi que l'influence de l'eau de dilution (différente) utilisée pour l'essai.

## 6.0 *Expression, utilisation et consignation au procès-verbal des concentrations d'essai*

L'expression, l'utilisation et la consignation au procès verbal des concentrations d'essais (% v/v) utilisées dans un essai de toxicité sublétales pour lequel la salinité de l'effluent a été ajustée par l'ajout de sels secs (section 4.0) sont simples et routinières étant donné que l'effluent non dilué et les concentrations inférieures testées dans l'essai de toxicité ne sont pas affectées d'une manière appréciable par l'ajout de sels secs. Il en va autrement si l'on utilise une solution aqueuse de saumure hautement concentrée naturelle ou artificielle pour l'ajustement de la salinité, car l'ajout de saumure à l'effluent dilue l'échantillon (et sa concentration d'essai) en proportion directe avec le volume de saumure ajouté.<sup>14</sup>

Dans tous les cas où la salinité de l'effluent est ajustée par ajout de SHC naturelle ou artificielle (voir section 4.0), le personnel de laboratoire doit tenir compte que la concentration de l'échantillon d'effluent non dilué a été réduite par l'ajout de saumure hautement concentrée pour ajuster la salinité. Par conséquent, toute dilution subséquente de l'échantillon d'effluent avec de l'eau de dilution doit être multipliée par cette dilution requise avec de la SHC, avant d'exprimer, d'utiliser et de consigner au procès-verbal les concentrations d'essai.<sup>14</sup> Les concentrations d'essai réelles (basées sur ces calculs) devraient aussi être incluses lorsque (ou si) les concentrations d'essais sont identifiées sur les enceintes d'essai, et lors de la consignation des observations et des résultats pour chaque concentration d'essai sur des feuilles de travail et l'estimation des résultats (p. ex., LC50 et/ou CIp).

## 7.0 *Remerciements*

Cette procédure a été rédigée par D. McLeay (McLeay Environment Ltd., Vancouver, C.-B.) sous la supervision de R. Scroggins (Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Environnement Canada, Ontario). Nous tenons à remercier E. Jonczyk (BEAK International, Brampton, Ontario) pour ses conseils techniques et les données non publiées qui nous ont aidé à préparer cette procédure révisée pour l'ajustement de la salinité. Un grand merci aux personnes suivantes pour leur contribution et leurs commentaires fort utiles suite à la révision d'une version préliminaire de ce document technique d'orientation : K. Doe (Centre des sciences environnementales, Région de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton, N.-B.); J. Elphick (EVS Environment Consultants, North Vancouver, C.-B.); E. Jonczyk (BEAK International, Brampton, Ontario); M. Moody (Saskatchewan Research Council, Saskatoon, Saskatchewan); C. McPherson (EVS Environment Consultants, North Vancouver, C.-B.) et J. Pickard (BC Research Inc., Vancouver, C.-B.).

<sup>14</sup> Suite à l'ajustement de la salinité d'un échantillon (d'eau douce) d'effluent à 30 ‰ par l'ajout de SHC à 90 ‰, la concentration de l'effluent dans cet échantillon sera de 67 ‰ (voir section 4, incluant la note de bas de page 9). En conséquence, chaque dilution subséquente de cet échantillon à salinité ajustée doit être multipliée par la concentration de l'échantillon à salinité ajustée pour calculer les concentrations d'essai. Par exemple, les concentrations d'essai pour une série de dilutions allant de 100 ‰, 50 ‰, 25 ‰, 12,5 ‰, 6,25 ‰ et 3,1 ‰ de l'échantillon d'effluent seraient, à salinité ajustée, de 67 ‰, 33,5 ‰, 16,8 ‰, 8,4 ‰, 4,2 ‰ et 2,1 ‰, respectivement, de l'échantillon d'effluent original. Ces dernières concentrations sont celles qui doivent être rapportées.

## 8.0 Références

- Bidwell, J.P. et S. Spotte (1985). *Artificial Seawaters. Formulas and Methods*. Jones and Bartlett Publ. Inc., Boston, MS.
- EC (1997). *Méthode recommandée pour ajuster la salinité d'échantillons d'effluents soumis à un essai de toxicité sublétales en milieu marin conduit conformément aux programmes d'études de suivi des effets sur l'environnement (ESEE)*. Rapport technique, Juillet 1997, Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 5 pages.
- EC (1992). *Méthode d'essai biologique : Essai de fécondation chez des échinides (oursins verts et oursins plats)*. Rapport EPS 1/RM/27 comprenant les modifications apportées en novembre 1997. Collection Protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa, Ontario. 97 pages.
- Jonczyk, E., G. Gilron et B. Zajdlik (2001). Sea Urchin Fertilization Assay: An Evaluation of Assumptions Related to Sample Salinity Adjustment and Use of Natural and Synthetic Marine Waters for Testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20 : 804-809.
- Neiheisel, T.W. et M.E. Young (1992). Use of Three Artificial Sea Salts to Maintain Fertile Sea Urchins (*Arbacia punctulata*) and to Conduct Fertilization Tests with Copper and Sodium Dodecyl Sulfate. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 : 1179-1185.
- Spotte, S., G. Adams et P.M. Bubucis (1984). GP2 As an Artificial Seawater for Culture or Maintenance of Marine Organisms. *Zool. Biol.*, 3 : 229-240.
- USEPA (1995). *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to West Coast Marine and Estuarine Organisms*. Report EPA/600/R-95/136, Août 1995. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA (1994). *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms (Second Edition)*. Report EPA/600-4-91/003, Juillet 1994. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH. 483 pages.