

Série de la Protection de l'environnement



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

Méthode de référence SPE 1/RM/14
Juillet 1990

TD
182
R46
1-RM-14
1990

Rég. Québec Biblio. Env. Canada Library



38 002 132



Canada



Environnement
Canada

Environment
Canada

3006697H M

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

Protection de l'environnement
Conservation et Protection
Environnement Canada

TD

182

R46

No. SPE 1/RM/14

1990

Méthode de référence SPE 1/RM/14
Juillet 1990

Données de catalogage avant publication (Canada)

Vedette principale au titre:

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

(Méthode de référence ; SPE 1/RM/14)

Texte en français et en anglais disposé tête-bêche.
Titre de la p. de t. addit.: Biological test method,
reference method for determining acute lethality of
effluents to Daphnia magna.

Comprend des références bibliographiques.

ISBN 0-662-57747-7

N° de cat. MAS En49-24/1-14

I. Daphnies -- Mortalité -- Essais -- Normes --
Canada. Daphnies -- Microbiologie -- Normes --
Canada. 3. Effluents -- Qualité -- Essais --
Normes -- Canada. I. Canada. Direction générale
de la protection de l'environnement. II. Canada.
Environnement Canada. III. Coll.: Rapport
(Canada. Environnement Canada); SPE 1/RM/14.
IV. Titre: Méthode de référence pour la
détermination de la létalité aiguë d'effluents
chez Daphnia magna.

QL444.B83 1990

595.3'2

C90-098699-9F

Commentaires

Pour formuler des commentaires ou obtenir des renseignements sur l'utilisation de la présente méthode de référence, s'adresser à :

M. Gary Sergy
Direction du développement technologique
Environnement Canada
4999, 98^e avenue, pièce 210
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

M. Richard Scroggins
Direction des programmes industriels
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

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.

Résumé

*Le présent document décrit en termes explicites une méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez le crustacé *Daphnia magna* («puce d'eau»). Il donne des instructions précises pour l'exécution d'essais de létalité aiguë portant sur des échantillons d'effluents et pour la présentation des résultats de ces essais; il complète ainsi les directives générales fournies dans le document de méthodologie intitulé Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë sur *Daphnia* spp. (Environnement Canada, 1990a).*

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

Table des matières

Résumé	v
Glossaire	ix
Remerciements	xii
 <i>Section 1</i>	
Introduction	1
 <i>Section 2</i>	
Élevage des organismes	3
2.1 Procédés d'élevage	3
2.2 Eau	4
2.3 Conditions physico-chimiques	4
 <i>Section 3</i>	
Installations	6
 <i>Section 4</i>	
Mode opératoire général pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents	7
4.1 Étiquetage, transport et stockage des échantillons	7
4.2 Conditions de l'essai	7
4.3 Préparation des solutions d'essai	8
4.4 Mise en route de l'essai	9
4.5 Observations et mesures	9
 <i>Section 5</i>	
Mode opératoire pour l'essai d'une concentration unique d'effluent	11
 <i>Section 6</i>	
Mode opératoire pour la détermination de la CL₅₀ d'un effluent	12
 <i>Section 7</i>	
Mode opératoire pour l'essai d'un produit toxique de référence	13

Section 8

Présentation des résultats	15
8.1 Données à consigner au procès-verbal	15
8.1.1 Effluent	15
8.1.2 Installations et conditions de l'essai	15
8.1.3 Résultats	16
8.2 Données à verser au dossier	17
8.2.1 Effluent	17
8.2.2 Installations et conditions de l'essai	17
8.2.3 Résultats	18
Références	19

Annexe

Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique et adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux de Conservation et Protection ...	21
--	-----------

Glossaire

Toutes les définitions ci-après s'appliquent aux méthodes énoncées dans le présent rapport; les autres définitions figurant dans le document d'accompagnement détaillé (Environnement Canada, 1990a) s'y appliquent aussi.

Aigu - Survenant dans un bref délai, normalement 48 h ou moins dans le cas des daphnies.

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

CL₅₀ - Concentration létale 50, soit la concentration dans l'eau d'une substance (dans le cas qui nous occupe, un effluent) qui est censée être létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai après une durée d'exposition définie (p. ex., 48 h).

Conductivité - Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de transporter un courant électrique. Cette capacité dépend des concentrations des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité, ainsi que de la température de la solution. La conductivité s'exprime normalement en millisiemens par mètre (unité SI), ou en $\mu\text{mho/cm}$ ($1 \text{ mS/m} = 10 \mu\text{mho/cm}$).

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des 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, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, sans porter sur la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité en raison de conditions de base de l'essai, telles que la qualité de l'eau de dilution et l'état de santé ou la manipulation des organismes soumis à l'essai.

Dureté - Somme des concentrations de calcium et de magnésium dans l'eau, exprimée en mg/L de carbonate de calcium.

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 l'essai de toxicité.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

pH - Logarithme négatif de l'activité des ions d'hydrogène, mesurée par leur concentration en 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.

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

Produit toxique de référence - Produit chimique étalon utilisé pour évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai et la validité des mesures de la toxicité des effluents.

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

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

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

Remerciements

La présente méthode de référence a été établie en fonction des objectifs, des besoins et des commentaires d'un sous-comité de la Protection de l'environnement (PE) formé de : N. Bermingham (PE, Montréal), C. Blaise (PE, Longueuil), G. Coulombe (PE, Montréal), K. Doe (PE, Dartmouth), G. Elliott (PE, Edmonton), D. MacGregor (PE, Ottawa), J. MacLatchy (PE, Ottawa), W. Parker (PE, Dartmouth), D. Robinson (Pêches et Océans Canada, Ottawa), T. Ruthman (PE, Ottawa), R. Scroggins (PE, Ottawa), G. Sergy (PE, Edmonton) et R. Watts (PE, North Vancouver). Pour leur contribution et leurs commentaires fort utiles, les représentants des provinces au sein du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique (GITA) ont particulièrement droit à notre reconnaissance (G. Joubert, ministère de l'Environnement du Québec; G. Westlake, ministère de l'Environnement de l'Ontario; W. Young, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique du Manitoba; K. Lauten, ministère de l'Environnement et de la Sécurité publique de la Saskatchewan; J. Somers, ministère de l'Environnement de l'Alberta; S. Horvath et G. van Aggelen, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique). Nous remercions sincèrement de leurs observations les examinateurs externes suivants : D. Vaughan (PE, Dartmouth), S. Wade (PE, Dartmouth), A. Beckett (PE, Edmonton), S. Yee (PE, North Vancouver), D. Moul (PE, North Vancouver), V. Zitko (Pêches et Océans Canada, St. Andrews), V. Cairns (Pêches et Océans Canada, Burlington), S. Samis, (Pêches et Océans Canada, Vancouver), D. Poirier (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale), J. Moores (ministère de l'Environnement de l'Alberta, Vegreville), P. Martel (Institut canadien de recherches sur les pâtes et papiers, Pointe-Claire), Y. Bois (Technitrol-Eco Inc., Pointe-Claire), C.R. Cook (Produits forestiers E.B. Eddy Ltée, Espanola), G. Craig (Beak Consultants Ltd., Brampton), et D. Bradley, D. Monteith et J. Pickard (B.C. Research Corp., Vancouver). Nous tenons également à remercier l'équipe des laboratoires d'essai d'Environnement Canada (adresses à l'annexe).

MM. G. Sergy et R. Scroggins (PE, Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont fourni leur collaboration et leurs conseils techniques. Le document a été rédigé en collaboration par MM. Don McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et John Sprague (J.B. Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario).

Section 1

Introduction

Le présent document décrit les modes opératoires à employer pour les essais de létalité aiguë sur *Daphnia magna* qui sont exigés par le gouvernement du Canada dans les règlements sur la lutte contre la pollution applicables à diverses catégories d'industries. Ces modes opératoires ont pour origine des méthodes d'essai portant sur des poissons publiées antérieurement par Environnement Canada (p. ex., SPE, 1980). La présente méthode de référence devrait être utilisée conjointement avec un rapport plus complet qui présente des explications et des détails additionnels (Environnement Canada, 1990a).

Par bien des aspects, les modes opératoires exposés ci-après sont semblables à des méthodes établies par les provinces canadiennes (Colombie-Britannique, 1998; Poirier *et al.*, 1988; BNQ, 1990) ou employées aux États-Unis (EPA, 1982, 1985a et 1985b; Plotkin et Ram, 1983; ASTM, 1983; APHA *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1988) et dans d'autres pays (Pays-Bas, 1980; BHSC, 1982; OCDE, 1981; ISO, 1982; GITA, 1986). Ces méthodes se sont révélées fort utiles à la rédaction de l'ensemble du présent document, et elles constituent des sources de renseignements complémentaires très valables. Toutefois, aux fins de la réglementation, ce sont les modes opératoires présentés ci-après qu'on devrait appliquer.

L'organisme soumis à l'essai est la «puce d'eau» *Daphnia magna*, petit crustacé d'eau douce de l'ordre des cladocères. Cette daphnie se retrouve dans les étangs et les

lacs de l'Amérique du Nord, y compris l'Ouest canadien, et elle est souvent un élément important des communautés aquatiques. Les daphnies sont sensibles à une vaste gamme de contaminants aquatiques, et elles sont utilisées dans de nombreux pays pour des essais de toxicité. À cet égard, elles présentent les avantages d'une petite taille et d'un cycle biologique court, qui permet des essais rapides; elles sont en outre relativement faciles à élever en laboratoire.

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

Les essais doivent porter sur des effluents contenant de l'eau douce ou ayant une salinité inférieure ou égale à 10 ‰, définie par une conductivité inférieure ou égale à 1 550 mS/m à une température de 20 °C.

Les effluents de salinité supérieure à 10 ‰ qui sont rejetés dans des eaux douces devraient aussi faire l'objet d'essais fondés sur la présente méthode de référence et portant sur des daphnies élevées en eau douce; pour ceux qui sont rejetés

directement en mer, on devrait utiliser une espèce autorisée par le laboratoire régional d'Environnement Canada (adressés à l'annexe) et acclimatée à une eau de mer de salinité semblable à celle de l'échantillon.

Section 2

Élevage des organismes

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

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

2.1 Procédés d'élevage

Il est recommandé d'utiliser comme récipients d'essai des aquariums, des bocaux à large ouverture ou des béciers de verre. Il faut couvrir ces récipients pour les mettre à l'abri de la poussière et réduire l'évaporation. Les récipients et tous les accessoires entrant en contact avec les organismes, l'eau ou les milieux d'élevage doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, acier inoxydable, Nalgene^{MC}, porcelaine, polyéthylène).

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

On peut manipuler les daphnies adultes en versant doucement du liquide d'un contenant à un autre ou encore en les pipettant ou en les siphonnant avec soin. Les daphnies néonates sont vulnérables à

l'emprisonnement d'air sous leur carapace, et on devrait les manipuler le moins possible, au moyen d'une pipette de verre jetable, coupée et polie à la flamme pour assurer une ouverture de 5 mm, dont l'extrémité devrait rester sous l'eau quand on libère les daphnies. Il faudrait procéder rapidement au transfert des organismes, en transportant le moins d'eau possible dans le nouveau contenant.

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

La réussite des élevages de daphnies peut être évaluée au moyen des critères de santé suivants, qui doivent être respectés pour que les élevages puissent être utilisés dans des essais de toxicité. Le premier point devrait être vérifié constamment et les deux autres fréquemment :

- Il ne doit pas y avoir d'éphippiums dans l'élevage.
- Les femelles doivent avoir au plus 12 jours au moment de la naissance de la première couvée.

- Les femelles de deux à cinq semaines doivent produire une moyenne de 15 néonates ou plus par couvée.
- Il ne devrait pas mourir plus de 25 % du stock de génitrices au cours des sept jours précédant l'essai, s'il s'agit d'un élevage regroupant plusieurs groupes d'âge.

Les conclusions d'un essai portant sur un produit toxique de référence (section 7) permettent aussi d'établir si un élevage convient à des essais de toxicité.

2.2 Eau

L'eau devant servir pour l'élevage des daphnies et comme eau de contrôle/de dilution peut être de l'eau naturelle ou de l'eau reconstituée.

Dans le premier cas, on peut utiliser de l'eau souterraine ou de surface non contaminée ou de l'eau municipale déchlorée, pourvu que sa dureté se situe entre 80 et 250 mg/L. Dans le deuxième cas, on doit utiliser de l'eau modérément dure (c.-à-d. d'une dureté de 80 à 100 mg/L).

S'il faut utiliser de l'eau municipale déchlorée pour l'élevage ou comme eau de contrôle/de dilution, elle doit être exempte de toute concentration nocive de chlore au moment de l'exposition des daphnies. L'objectif établi pour la concentration en chlore résiduel total dans les élevages et dans l'eau de contrôle/de dilution des récipients d'essai est d'au plus 0,002 mg/L (Environnement Canada, 1990a).

Si l'on doit utiliser de l'eau reconstituée modérément dure (de 80 à 100 mg/L), on peut la préparer au moyen de toute formule éprouvée permettant d'obtenir des élevages de daphnies qui répondent aux critères de

santé énoncés précédemment (Environnement Canada, 1990a). Le pH de cette eau doit être compris entre 7,0 et 8,0; des valeurs variant entre 7,4 et 7,8 sont fréquentes (Environnement Canada, 1990a). Il est nécessaire d'ajouter du sélénium et de la vitamine B₁₂ à l'eau reconstituée servant à l'élevage des organismes (Environnement Canada, 1990a). Ces nutriments peuvent aussi être ajoutés à de l'eau naturelle, mais uniquement si cela est requis pour assurer le respect des critères de santé.

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

2.3 Conditions physico-chimiques

L'éclairement ne devrait pas dépasser 800 lux à la surface de l'eau, et la lumière devrait tendre vers l'extrémité bleue du spectre (indice de rendu des couleurs supérieur ou égal à 90). Des appareils fluorescents blanc froid sont appropriés, et la photopériode doit correspondre à une séquence de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité.

La température de l'eau d'élevage doit être de 20 ± 2 °C pendant au moins deux semaines avant que les organismes servent à des essais.

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

Le pH de l'eau utilisée pour l'élevage et comme eau de contrôle/de dilution devrait

être compris entre 6,0 et 8,5 (de préférence, entre 6,5 et 8,5).

On devrait contrôler, de préférence chaque jour, la température, la teneur en oxygène et le pH de chaque milieu d'élevage, ainsi que la présence ou l'absence d'éphippiums; une vérification hebdomadaire ou plus fréquente est recommandée pour ce qui est de la dureté de l'eau et, s'il s'agit d'eau municipale, pour le chlore résiduel total.

Section 3

Installations

L'essai doit être réalisé dans un laboratoire distinct, dans une partie du laboratoire entourée d'un mur ou d'un rideau pour permettre de régler l'éclairage ou dans un simulateur d'environnement. L'installation doit être à l'écart de toute agitation; la poussière et les émanations devraient être réduites au minimum.

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

marque Whirl-Pak^{MC}), qui ne doivent pas être réutilisés. Il est recommandé de couvrir les récipients d'essai; si l'on soupçonne la présence de composés volatils dans l'effluent, on doit les fermer et laisser le moins possible de vide d'air. Les récipients et tout le matériel ou l'équipement pouvant entrer en contact avec les solutions d'essai ou l'eau de contrôle/de dilution ne doivent pas contenir de substances pouvant être entraînées dans les solutions d'essai ou absorber les produits toxiques qu'elles contiennent. Tous les récipients et appareils doivent être nettoyés et rincés à fond avec de l'eau de contrôle/de dilution ou de l'eau désionisée conformément à de bonnes pratiques de laboratoire.

Section 4

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

4.1 *Étiquetage, transport et stockage des échantillons*

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

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

Les échantillons ne devraient pas geler. Pendant le transport, ils devraient être conservés dans l'obscurité, à une température de 1 à 8 °C (de préférence, de 4 ± 2 °C) si le voyage dure plus de deux jours. À l'arrivée au laboratoire, ils peuvent être ramenés immédiatement ou pendant la nuit à 20 ± 2 °C, et les essais peuvent

ensuite être entrepris. S'ils sont stockés à l'installation d'essai, il faut les conserver dans l'obscurité et au frais (à moins de 8 °C et, de préférence, à 4 ± 2 °C).

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

4.2 *Conditions de l'essai*

Il s'agit d'un essai statique, c.-à-d. sans renouvellement des solutions, d'une durée de 48 h. La densité de chargement des daphnies ne doit pas dépasser un organisme par 15 mL. Il ne faut pas nourrir les daphnies pendant l'essai. Celui-ci n'est pas valable si plus de 10 % des organismes témoins meurent ou laissent apparaître un comportement stressé évident (p. ex., immobilité).

L'essai doit être mené à 20 ± 2 °C, la dureté des solutions étant supérieure ou égale à 25 mg/L. Les solutions ne sont pas aérées, ni leur pH corrigé. L'éclairage et la photopériode (16 ± 1 h de lumière, 8 ± 1 h d'obscurité) doivent être les mêmes que pendant l'élevage (section 2.3).

L'essai doit être réalisé sans correction du pH de l'échantillon ou des solutions. Toutefois, si l'on désire comprendre dans quelle mesure les valeurs extrêmes du pH (c.-à-d. les valeurs inférieures à 6,0 ou supérieures à 8,5) peuvent contribuer à la létalité aiguë de l'échantillon ou des solutions, on peut effectuer parallèlement un deuxième essai (avec correction du pH). Si deux essais sont ainsi menés, les résultats définitifs devraient être ceux obtenus à la suite de l'essai sans correction du pH. Environnement Canada (1990a) fournit des explications et des détails concernant la correction du pH. Celle-ci compte parmi les techniques d'évaluation d'identification de la toxicité qui permettent de définir la cause de la toxicité des échantillons (Mount et Anderson-Carnahan, 1988).

4.3 Préparation des solutions d'essai

La température de l'échantillon d'effluent et de l'eau de contrôle/de dilution doit être ramenée à 20 ± 2 °C si elle ne se situe pas déjà dans cet intervalle.

Comme il est possible que la dureté de l'échantillon d'effluent soit très faible, il faut la mesurer avant de préparer les solutions. Si elle est inférieure à 25 mg/L, il faut la ramener à 25 ± 5 mg/L en y ajoutant du bicarbonate de sodium (NaHCO_3), du sulfate de calcium ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), du sulfate de magnésium (MgSO_4) et du chlorure de potassium (KCl) dans les proportions suivantes : 1,6, 1,265, 1,0 et 0,0667 (voir les formules applicables à l'eau reconstituée : Environnement Canada, 1990a, tableau 2). Pour chaque augmentation de dureté de 5 mg/L, il faut ajouter les quantités suivantes de produits chimiques à chaque litre d'effluent : 5,11 mg de NaHCO_3 , 4,04 mg de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,19 mg de MgSO_4 et 0,213 mg de KCl.

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

Les récipients d'essai devraient être rincés avec de l'eau de contrôle/de dilution juste avant d'être utilisés. Les solutions d'essai doivent être préparées immédiatement avant leur utilisation; leur volume doit être suffisant pour faciliter l'échantillonnage et les premières mesures chimiques. Il faut bien les mélanger avec une baguette de verre, un agitateur en téflon ou un autre dispositif non réactif. Tous les béciers ou éprouvettes, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et contenants pour le transfert des daphnies doivent être nettoyés et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés.

On doit mesurer la teneur en oxygène dissous au moins dans la solution de la concentration la plus élevée (normalement, l'échantillon non dilué) au moment de sa préparation. Seulement lorsque cette valeur est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, il faut, avant l'exposition des daphnies, commencer à préaérer toutes les solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle, à raison d'au plus $7,5 \text{ mL/min} \cdot \text{L}^{-1}$ (Environnement Canada, 1990a). Cette période de préaération doit être limitée à 120 minutes ou, si cette durée est plus courte, au temps voulu pour obtenir 40 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation). On doit aussitôt interrompre l'aération, déposer les daphnies

dans les solutions et mettre en route l'essai, qu'on ait obtenu ou non de 40 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai. L'aération devrait être assurée par des bulles d'air comprimé passant par un diffuseur d'air propre en verre de silice ou par une pipette de verre jetable (Environnement Canada, 1990a). La taille des bulles d'air devrait être de 1 à 3 mm.

4.4 Mise en route de l'essai

Chaque récipient d'essai doit porter un code ou une étiquette précisant clairement la concentration de la solution ainsi que la date et l'heure du début de l'essai; de préférence, les concentrations à expérimenter devraient être placées selon un ordre aléatoire.

On doit utiliser des néonates pour l'essai. Pour les obtenir, on enlève des milieux d'élevage des femelles adultes portant des embryons dans leur cavité d'incubation, 24 h avant l'essai; elles sont transférées dans des bécchers de verre propres (de 400 à 1 000 mL) contenant de l'eau de contrôle/de dilution et un inoculum de nourriture préparé suivant la concentration utilisée pour l'élevage. La température de l'eau doit être de 20 ± 2 °C et sa teneur en oxygène dissous de 90 à 100 % de saturation en air avant l'introduction des adultes; il ne devrait pas y avoir d'aération. La densité de chargement devrait être d'environ 20 adultes ou moins par litre dans les bécchers. Les néonates que l'on retrouve le lendemain sont utilisées pour l'essai de toxicité.

Il est souhaitable, mais non absolument nécessaire, d'utiliser des femelles âgées de deux à quatre semaines et d'éviter ainsi celles qui sont trop jeunes ou sénescents. On peut remplir périodiquement des réservoirs d'élevage séparés avec des néonates, qui, de deux à quatre semaines

plus tard, seront devenues des adultes dont la progéniture pourra servir à des essais.

Pour mettre en route l'essai, on doit introduire dans chaque solution d'essai et de contrôle des nombres égaux de daphnies néonates, soit au moins dix par solution, sans dépasser la densité de chargement d'au plus un individu par 15 mL. L'ordre selon lequel on dépose les daphnies dans les récipients d'essai devrait être établi au hasard au préalable. Les néonates devraient être manipulées conformément aux instructions de la section 2.1; il faudrait remplacer celles qui flottent ou qui sont blessées immédiatement après leur transfert.

4.5 Observations et mesures

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

Au début et à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques, il faut mesurer le pH et la teneur en oxygène dissous de chaque solution d'essai, y compris les solutions de contrôle. On devrait mesurer la conductivité de chaque solution au moins au début de l'essai et, chaque jour, mesurer la température de solutions représentatives.

La dureté de la solution de contrôle et de la solution composée d'effluent non dilué doit être mesurée au début de l'essai. On doit se servir pour cela de volumes mélangés dans des bécchers, une fois toutes les corrections faites et juste avant qu'on s'en serve pour remplir les récipients servant à l'essai (section 4.3).

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

Certains produits toxiques narcotiques peuvent rendre les daphnies complètement immobiles et ralentir leur rythme cardiaque pour qu'il soit de seulement un ou deux battements à la minute. Dans ce cas, le battement cardiaque devient le critère définitif de la mort. Lorsqu'on soupçonne qu'il s'agit d'un tel cas de narcose et qu'on ne peut observer le cœur avec soin, on

devrait consigner le nombre de daphnies immobilisées à 48 h. L'immobilisation s'entend ici de l'inaptitude à la nage pendant 15 secondes après une légère agitation de la solution, même si les antennes bougent encore.

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

Section 5

Mode opératoire pour l'essai d'une concentration unique d'effluent

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

L'essai porte sur une seule concentration d'effluent, soit l'effluent non dilué, sauf indication contraire, et sur une solution de contrôle. On doit prévoir des répétitions (au moins trois pour l'effluent et trois pour la solution de contrôle), dix daphnies au moins étant déposées dans chacun des récipients.

Le résultat de cet essai est le pourcentage de mortalité à 48 h, consigné au procès-verbal pour chaque répétition ($n \geq 10$). Si l'immobilisation est le seul effet biologique observé (section 4.5), le résultat de l'essai est le pourcentage de daphnies immobilisées à 48 h, consigné lui aussi pour chaque

répétition. On utilise couramment une valeur de 50 %, car elle permet des mesures plus précises que des valeurs telles que 20 ou 80 %, plus proches des valeurs extrêmes de distribution des effets toxiques.

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

Section 6

Mode opératoire pour la détermination de la CL₅₀ d'un effluent

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

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

On devrait calculer la CL₅₀ à 48 h et ses limites de confiance à 95 % et indiquer la méthode utilisée pour ces calculs. Des programmes informatiques existent à cette fin (Environnement Canada, 1990a), et on devrait y avoir recours. Un programme particulier est recommandé; les personnes qui fournissent une disquette peuvent se le procurer auprès d'Environnement Canada (adresses à l'annexe), avec la permission de C.E. Stephan (1977). On devrait vérifier

toute CL₅₀ calculée par ordinateur en examinant, sur une échelle de probabilité logarithmique, la courbe des pourcentages de mortalité après 48 h pour les diverses concentrations d'effluent (Environnement Canada, 1990a).

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

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

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

Section 7

Mode opératoire pour l'essai d'un produit toxique de référence

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

On recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence un ou plusieurs des composés suivants : chlorure de sodium (NaCl), bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) ou sulfate de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). La CL_{50} à 48 h devrait être déterminée pour le ou les produits de référence utilisés et exprimée sous forme de mg/L de NaCl, de chrome (Cr^{+++}) ou de zinc (Zn^{++}) (Environnement Canada, 1990a). Les solutions mères devraient être préparées le jour même de leur utilisation ou entreposées dans l'obscurité; les solutions de bichromate de potassium devraient être conservées dans des bouteilles à bouchon de verre, et le pH des solutions de zinc devrait varier de 3 à 4.

Les concentrations des produits toxiques de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (APHA

et al., 1989). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on devrait prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CL_{50} 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 devraient être préservées avant d'être stockées. Les aliquotes stockées nécessitant une mesure chimique devraient être analysées aussitôt l'essai de toxicité terminé. Il est souhaitable, mais non nécessaire, de mesurer les concentrations dans les mêmes solutions à la fin de l'essai, une fois terminées les observations biologiques. Le calcul de la CL_{50} devrait être fondé sur les concentrations mesurées, si elles diffèrent appréciablement (c.-à-d. d'au moins 20 %) des concentrations nominales.

Une carte de contrôle (Environnement Canada, 1990b) ou un document semblable doit être établi et mis à jour pour chaque produit toxique de référence utilisé. On doit y inscrire les CL_{50} successives qui sont calculées, pour déterminer si elles s'inscrivent dans un intervalle de ± 2 fois l'écart type de la moyenne géométrique (ou de la moyenne arithmétique, lorsque les données ne sont pas réparties normalement) des CL_{50} calculées antérieurement. On recalcule la moyenne géométrique et ses limites de contrôle (± 2 fois l'écart type,

toujours calculé sur une base logarithmique) pour chaque CL_{50} successive jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EPA, 1985a; Environnement Canada, 1990b). Si une CL_{50} s'inscrit en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des organismes et la validité des essais récents portant sur des effluents sont douteuses. On doit alors vérifier toutes les conditions d'élevage; selon

les constatations faites, il se peut qu'on doive prolonger l'acclimatation de l'élevage et le soumettre à une nouvelle évaluation au moyen d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence, ou encore établir un nouvel élevage et le soumettre à des essais pour voir s'il convient à des essais de toxicité (section 2.1).

Section 8

Présentation des résultats

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

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

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

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

8.1 Données à consigner au procès-verbal

8.1.1 Effluent

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

8.1.2 Installations et conditions de l'essai

- Type et méthode d'essai (p. ex., «essai à concentration unique», «mode opératoire prévu dans la méthode de référence SPE 1/RM/14»).

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

- Indication de tout écart par rapport au mode opératoire prévu dans le présent document.
- Nom du laboratoire d'essai et ville où il se trouve.
- Espèce d'organisme soumis à l'essai.
- Date et heure de mise en route de l'essai définitif.
- Personnes ayant mené l'essai et vérifié les résultats.
- pH, température, teneur en oxygène dissous et conductivité de l'effluent non dilué et non corrigé, juste avant la préparation des solutions d'essai.
- Renseignements sur toute correction de la dureté de l'échantillon d'effluent et, le cas échéant, mesures effectuées avant et après la correction.
- Renseignements sur toute aération des solutions d'essai (débit, durée) avant l'introduction des daphnies.
- Concentration et volume des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle.
- Mesures de la teneur en oxygène dissous, du pH, de la température et de la conductivité de chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) effectuées pendant l'essai. Mesures de la dureté des solutions composées à 100 % d'effluent et d'eau de contrôle.

- Estimation la plus récente de l'âge à la naissance de la première couvée et du nombre moyen de néonates par couvée.
- Nombre de néonates par récipient d'essai et de millilitres de solution par daphnie.

8.1.3 Résultats

- Nombre de daphnies mortes ou immobilisées dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) après 48 h.
- Pour les essais à concentration unique, nombre de daphnies mortes (ou immobilisées, si la mort ne peut être confirmée) dans chacun des trois récipients d'effluent et des trois récipients de contrôle ($n \geq 10$) à la fin de l'essai. Valeur moyenne représentant le pourcentage de mortalité (ou d'immobilisation) pour l'effluent et pour la solution de contrôle.
- Pour les essais à concentrations multiples, CL_{50} à 48 h et limites de confiance à 95 %, calculées par ordinateur. Le cas échéant, CE_{50} d'inhibition de la mobilité à 48 h et limites de confiance à 95 %. Indication de la méthode statistique utilisée (p. ex., «probabilité logarithmique», «moyenne mobile»).
- Dernière valeur de la CL_{50} à 48 h (et de ses limites de confiance à 95 %) calculée pour le ou les produits toxiques de référence. Produit(s) en cause. Date de mise en route de l'essai. Moyenne géométrique des CL_{50} calculées antérieurement et limites de contrôle (± 2 fois l'écart type).

8.2 *Données à verser au dossier**

8.2.1 *Effluent*

- Description détaillée du lieu de prélèvement, de la source et du type d'effluent.
- Type de contenant(s) et d'étiquette ou de code utilisés.
- Volume ou poids de l'échantillon, ou les deux.
- Conditions de transport et de stockage (température, durée).
- Apparence et autres propriétés (observations sur la couleur, la turbidité, l'odeur et la présence de solides flottants ou décantables).
- Modification de la couleur, précipitation, floculation, rejet de substances volatiles et autres modifications survenues pendant la préparation des solutions d'essai.
- Mode opératoire et résultats de toute analyse chimique (p. ex., teneur en solides en suspension, dureté).

8.2.2 *Installations et conditions de l'essai*

- Adresse du laboratoire d'essai.
- Description des installations d'élevage et d'essai, y compris leur agencement général et leurs moyens d'isolation.
- Source et date d'obtention des organismes soumis à l'essai.

- Conditions normales d'élevage : contenants, emplacement, éclairage, températures, aération, fréquence du remplacement de l'eau, densité maximale, type de nourriture, ration et fréquence de l'alimentation.
- Bref résumé des conditions et modes opératoires propres à l'essai en ce qui touche l'élevage des daphnies, s'ils diffèrent de la pratique courante.
- Source de l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution. Prétraitement habituel, s'il y en a un (p. ex., correction de la température, aération, déchloration). Méthodes de préparation et de stockage de l'eau reconstituée, si l'on en utilise. Type et concentration de tout nutriment ajouté (p. ex., sélénium, vitamine B₁₂).
- Mesures (moyennes et intervalles) de la qualité de l'eau d'élevage/de contrôle/de dilution. Renseignements à fournir : dureté, pH, conductivité, teneur en oxygène dissous et chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau fournie par une municipalité). Renseignements à ajouter de préférence : gaz totaux dissous, alcalinité, solides, carbone organique, couleur, ions minéraux, métaux, ammoniac, nitrites et pesticides organophosphorés.
- Systèmes de réglage de l'éclairage et de la température.
- Source d'éclairage, photopériode et mesures antérieures de l'éclairage à la surface des réservoirs d'élevage et des récipients d'essai.

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

- Description des récipients d'essai (dimension, forme et matériau), des couvercles et de leurs méthodes courantes de nettoyage et de rinçage.
- Méthode d'obtention des néonates soumises à l'essai.
- Pourcentage de mortalité dans l'élevage au cours des sept jours ayant précédé l'essai.
- Apparence des solutions; toute modification survenue pendant l'essai.
- Concentrations d'essai des produits toxiques de référence, tant nominales que mesurés. Indication de l'ensemble de données utilisé pour estimer la CL₅₀.
- Toute mesure de la qualité de l'eau des solutions d'essai non consignée au procès-verbal (section 8.1.2).

8.2.3 Résultats

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

Références

- APHA (*American Public Health Association*) et al. «Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms». *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17^e éd. Washington, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 1989. Part 8000, p. 8-1 - 8-143.
- ASTM (*American Society for Testing and Materials*). «Standard Practice for Conducting Static Acute Toxicity Tests on Wastewaters with *Daphnia*». *Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.01, 1984, p. 27-39 (Designation D 4229).
- BHSC (*British Health and Safety Commission*). «Testing for Acute Toxicity to *Daphnia*». *Methods for the Determination of Ecotoxicity*. Londres, BHSC, 1982, p. 14-18.
- BNQ (Bureau de normalisation du Québec). «Eaux - Détermination de la toxicité». Méthode avec le microcrustacé *Daphnia magna*. Québec, BNQ, ministère de l'Industrie et du Commerce, 1990.
- Colombie-Britannique. «*Daphnia* 48-hr Acute Mortality Bioassay Procedure». Version préliminaire. Vancouver, ministère de l'Environnement et des Parcs, Laboratoire environnemental, 1988.
- Environnement Canada, Conservation et Protection. *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur *Daphnia spp.** Rapport SPE 1/RM/11. Ottawa, 1990. (1990a)
- Environnement Canada, Conservation et 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. (1990b)
- EPA (*Environmental Protection Agency*). «Daphnid Acute Toxicity Test». Document EG-1/ES-1. Washington, EPA, Office of Toxic Substances, 1982.
- EPA. «Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms». EPA/600/4-85/013. W.H. Peltier et C.I. Weber (éd.). Cincinnati, EPA, 1985. 215 p. (1985a)
- EPA. «Acute Toxicity Test for Freshwater Invertebrates». EPA-540/9-85-005. Washington, EPA, Hazard Evaluation Division, Office of Pesticide Programs, 1985. (1985b)
- GITA (Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique). «Acute Lethality/Immobility Testing Protocols and Procedures for the Water Flea, *Daphnia magna* ». Addendum 2, Part C. «Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection», par G. Sergy. Edmonton, Environnement Canada, 1987 (1986).
- Greene, J.C., C.L. Bartels, W.J. Warren-Hicks, B.P. Parkhurst, G.L. Linder, S.A. Peterson et W.E. Miller. «Protocols for Short-term Toxicity

- Screening of Hazardous Waste Sites». Corvallis, OR, EPA, 1988.
- ISO (Organisation internationale de normalisation). «Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, Crustacea*)», 1^{re} édition. Rapport n° ISO 6341-1982 (F). Genève, ISO, 1982.
- Mount, D.I. et L. Anderson-Carnahan. «Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures». Report EPA-600/3-88/034. Duluth, MN, EPA, 1988.
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). «*Daphnia* sp., 14-day Reproduction Test (Including an Acute Immobilization Test)». Document n° 202. Paris, OCDE, 1981.
- Pays-Bas. «Determination of Toxicity», chap. 5. *Degradability, Ecotoxicity and Bio-accumulation. The Determination of the Possible Effects of Chemicals and Wastes on the Aquatic Environment*. La Haye, Bureau des publications officielles, 1980.
- Plotkin, S. et N.M. Ram. «Acute Toxicity Tests: General Description and Materials and Methods Manual, II, *Daphnia*». Report No. Env.E.73-83-4. Amherst, University of Massachusetts, Department of Civil Engineering, 1983.
- Poirier, D.G., G.F. Westlake et S.G. Abernethy. «*Daphnia magna* Acute Lethality Toxicity Test Protocol». Rexdale, ministère de l'Environnement de l'Ontario, 1988.
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents*. Rapport EPS 1-WP-80-1. Ottawa, 1980.
- Stephan, C.E. «Methods for Calculating an LC₅₀». *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. F.L. Mayer et J.L. Hamelink (éd.). ASTM STP 634. Philadelphie, ASTM, 1977.

*Annexe***Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité aquatique******Gouvernement fédéral*****

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. Elliott
Edmonton (Alberta)

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

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

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

C. Kriz
Direction des programmes fédéraux
Ottawa (Ontario)

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

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

R. Scroggins
Direction des programmes industriels
Ottawa (Ontario)

G. Sergy
Direction du développement
technologique
Edmonton (Alberta)

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

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-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 de la
Colombie-Britannique
Vancouver (C.-B.)

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

* Au mois de juillet 1990.

** Environnement Canada, Conservation et Protection.

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
25, avenue St. Clair est, 6^e étage
Toronto (Ontario)
M4T 1M2

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

Région de l'Ouest et du Nord
Twin Atria n° 2, pièce 210
4999, 98^e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

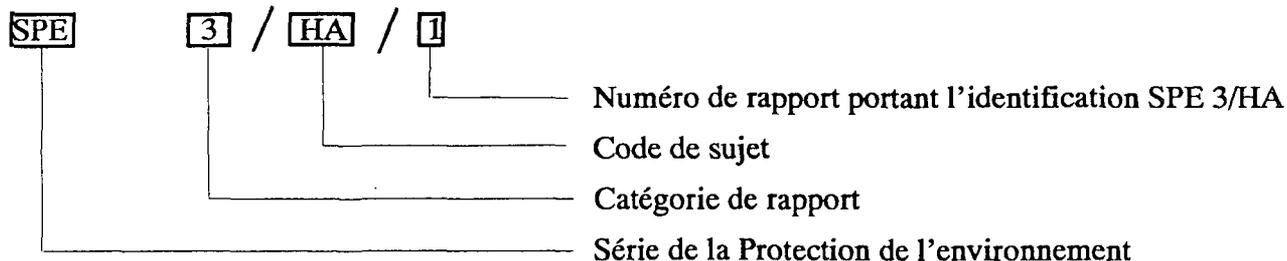
Région du Québec
1141, route de l'Église
C.P. 10100
Sainte-Foy (Québec)
G1V 4H5

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.

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation :



Catégories

- 1 Règlements/Lignes directrices/
Codes de pratiques
- 2 Évaluation des problèmes et
options de contrôle
- 3 Recherche et développement
technologique
- 4 Revues de la documentation
- 5 Inventaires, examens et enquêtes
- 6 Évaluations des impacts sociaux,
économiques et environnementaux
- 7 Surveillance
- 8 Propositions, analyses et
énoncés de principes généraux
- 9 Guides

Sujets

- | | |
|-----|---|
| AG | Agriculture |
| AN | Technologie anaérobie |
| AP | Polluants atmosphériques |
| AT | Toxicité aquatique |
| CC | Produits chimiques commerciaux |
| CE | Consommateurs et environnement |
| CI | Industries chimiques |
| FA | Activités fédérales |
| FP | Traitement des aliments |
| HA | Déchets dangereux |
| IC | Chimie inorganique |
| MA | Pollution marine |
| MM | Exploitation minière et
traitement des minéraux |
| NR | Régions du Nord et rurales |
| PF | Papier et fibres |
| PG | Production d'électricité |
| PN | Pétrole et gaz naturel |
| RA | Réfrigération et climatisation |
| RM | Méthodes de référence |
| SF | Traitements de surface |
| SP | Déversements de pétrole et de
produits chimiques |
| SRM | Méthodes de référence normalisées |
| TS | Systèmes de transport |
| TX | Textiles |
| UP | Pollution urbaine |
| WP | Protection/préservation du bois |

Des sujets et des codes additionnels sont introduits au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la SPE en s'adressant aux Publications de la Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3.

Think Recycling!



Pensez à recycler!

Cette publication est imprimée sur du papier contenant des rebuts recyclés.