



Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel



Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel

Section de l'élaboration des méthodes et des applications
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

Méthode de référence SPE 1/RM/13
DEUXIÈME ÉDITION
Décembre 2000

Données de catalogage avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique : Méthode de référence
pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents
chez la truite arc-en-ciel

Deuxième éd.

(Méthode de référence; SPE 1/RM/13)

Texte en anglais et en français disposé tête-bêche.

Titre de la p. de t. addit.: Biological test method :
Reference method for determining acute lethality
of effluents to rainbow trout.

Comprend des références bibliographiques.

ISBN 0-660-61615-7

No. de cat. En49-24/1-13-2001

1. Truite arc-en-ciel -- Mortalité -- Essais -- Normes -- Canada.
 2. Truite arc-en-ciel -- Microbiologie -- Normes -- Canada.
 3. Qualité effluents -- Essais -- Normes -- Canada.
 4. Toxicologie -- Méthodologie.
- I. Centre de technologie environnementale (Canada), Section de l'élaboration des méthodes et des applications.
II. Canada. Environnement Canada.
III. Coll.: Rapport (Canada. Environnement Canada); SPE 1/RM/13.

QH90.57B56 2001 597.5'7 C2001-980086-XF

Commentaires des lecteurs

Pour formuler des commentaires sur le contenu de la présente méthode de référence, s'adresser à:

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

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada et a été approuvé pour publication. La mention de marques de commerce ou de produits commerciaux ne constitue nullement une recommandation de la part d'Environnement Canada; d'autres produits de valeur semblable sont disponibles.

Résumé

*Ce rapport fournit des méthodes normalisées ou de référence explicites pour mesurer la létalité d'effluents pour la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Des instructions précises sont données pour exécuter des essais de toxicité létale avec des échantillons d'effluent. Les lignes directrices données dans la méthode générale "Essai de létalité aiguë chez la truite arc-en-ciel" (EC, 1990a, avec modifications apportées en mai 1996) ont été incluses.*

Le présent rapport est la deuxième édition de la Méthode de référence SPE 1/RM/13 publiée en juillet 1990, à laquelle des modifications ont été apportées en mai 1996 (EC, 1990b - comprend les modifications de mai 1996). Cette méthode remplace la version précédente et doit être appliquée comme la méthode de référence actuelle d'Environnement Canada pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel.

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. Le lecteur trouvera des instructions pour la détention des truites au laboratoire, 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.

Avant-propos

*Ce rapport fait partie de la collection des **méthodes de référence** pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets toxiques sur une seule espèce d'organismes aquatiques ou terrestres exposés à des échantillons de matières ou de substances d'essai dans des conditions de laboratoire définies et contrôlées.*

*Dans le présent document, une **méthode de référence** est définie comme une méthode d'essai biologique spécifique pour conduire un essai de toxicité, c'est-à-dire une méthode d'essai qui donne un ensemble d'instructions et de conditions détaillées dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes (générales) publiées par Environnement Canada, l'utilisation d'une méthode de référence se résume fréquemment aux exigences associées à des règlements précis.*

*Les **méthodes de référence** sont celles qui ont été développées et publiées par Environnement Canada (EC) et sont privilégiées :*

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

Table des matières

Résumé	v
Avant-propos	vi
Glossaire	ix
Remerciements	xii
 <i>Section 1</i>	
Introduction	1
 <i>Section 2</i>	
Organismes et détention	3
2.1 Espèce et source	3
2.2 Détention et acclimatation	3
2.3 Eau	4
2.4 Conditions physico-chimiques	5
 <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	8
4.3 Préparation des solutions d'essai	8
4.4 Mise en route de l'essai	9
4.5 Observations et mesures	10
 <i>Section 5</i>	
Mode opératoire pour la détermination du taux de mortalité après 96 h dans un essai à concentration unique	11
 <i>Section 6</i>	
Mode opératoire pour la détermination de la CL50–96 h dans un essai à concentrations multiples	12
 <i>Section 7</i>	
Mode opératoire pour les essais avec 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 de la toxicité environnementale et adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada	21
---	----

Glossaire

Toutes les définitions ci-après s'inscrivent dans le contexte des modes opératoires énoncés dans le présent rapport; les autres définitions figurant dans le document d'accompagnement détaillé (EC, 1990a, avec modifications apportées en mai 1996) s'y appliquent aussi.

Termes grammaticaux

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) et *il faut* sont utilisés pour exprimer une obligation absolue.

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

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

Termes techniques

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

Aigu - Survenant dans un bref délai, normalement ≤ 96 h dans le cas des poissons.

Alevin - Poisson éclos récemment, qui n'a pas commencé à se nourrir seul et dont le sac vitellin est évident (à des fins nutritives). L'alevin est souvent appelé «larve vésiculée».

Alevin nageant - Jeune poisson ayant dépassé le stade larvaire et ayant commencé à se nourrir seul activement.

CL50 (concentration létale médiane) - Concentration dans l'eau d'une substance (dans le cas qui nous occupe, un effluent) que l'on a estimée être létale pour 50 % des organismes soumis à l'essai. La CL50 et ses limites de confiance à 95 % sont généralement obtenues par l'analyse statistique des pourcentages de mortalité dans plusieurs concentrations d'essai, après une période fixe d'exposition qui doit être précisée (p. ex., CL50–96 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, une unité SI (système international), ou en $\mu\text{mho/cm}$ ($1 \text{ mS/m} = 10 \mu\text{mhos/cm}$).

Contrôle - Traitement reproduisant l'ensemble des conditions et facteurs qui pourraient

influencer les résultats d'une enquête ou d'une étude, à l'exception de la condition particulière faisant l'objet de cette étude. Dans les essais de toxicité aquatique, le contrôle doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais ne pas renfermer la substance à expérimenter. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence de toxicité mesurable en raison de conditions de base de l'essai, telles que la température, la qualité de l'eau de dilution, l'état de santé des organismes d'essai ou les effets dus à leur manipulation.

Dureté - Concentration des cations dans l'eau qui réagira avec un savon sodique pour précipiter un résidu insoluble. En général, la dureté est une mesure des concentrations d'ions calcium et magnésium dans l'eau, exprimée en mg/L de carbonate de calcium.

Eau de contrôle/de dilution - Eau utilisée pour diluer l'échantillon d'effluent et pour l'essai de contrôle.

Eau de dilution - Eau utilisée pour diluer la substance à expérimenter afin d'en préparer différentes concentrations pour l'essai de toxicité.

Eau déchlorée - Eau chlorée (généralement, eau potable du réseau d'alimentation municipale) qui a été traitée afin d'en éliminer le chlore et les composés chlorés.

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

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

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

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

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

Fingerling - Jeune poisson de moins d'un an se nourrissant seul.

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

Longueur à la fourche - Longueur du poisson, du museau (gueule fermée) jusqu'à la fourche de la queue.

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

Méthode de référence - Méthode d'essai biologique spécifique pour réaliser un essai de toxicité, c'est-à-dire une méthode d'essai comportant un ensemble d'instructions et de conditions explicites précisément décrites dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essais biologiques polyvalentes publiées par Environnement Canada, une *méthode de référence* est fréquemment utilisée aux seules fins de tester les exigences associées à des règlements précis; ou tester dans le but de déterminer s'il y a violation des dispositions générales de la Loi canadienne sur les pêches.

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

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

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

Produit toxique de référence - Étalon chimique utilisé pour évaluer la sensibilité des organismes soumis à l'essai afin d'établir le degré de confiance dans les données de toxicité obtenues pour une matière ou un produit soumis à un essai. Dans la plupart des cas, un essai de toxicité avec un produit de référence est exécuté pour évaluer la sensibilité des organismes au moment où l'on évalue la matière d'essai et la précision des résultats obtenus par le laboratoire avec ce produit chimique.

Salinité - Quantité totale, en grammes, de substances solides dissoutes dans 1 kg d'eau. 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 ou conductimètre ou par d'autres moyens (voir APHA *et al.*, 1998). Elle est habituellement rapportée en grammes par kilogramme ou en parties par mille (‰).

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

Toxicité - Potentiel ou capacité propre d'une substance de provoquer un ou des effets nocifs chez les poissons ou autres organismes vivants. Le (ou les) effet(s) peu(ven)t être léta(aux) ou subléta(aux).

Remerciements

La première édition de ce rapport, imprimée en juillet 1990 et à laquelle des modifications ont été apportées en mai 1996 (EC, 1990b), a été réalisée par D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., West Vancouver, C.-B.) et J.B. Sprague (Sprague Associates Ltd., Guelph, Ontario). M. R. Scroggins et M. G. Sergy (SPE, Environnement Canada) ont fait fonction de responsables scientifiques officiels et ont pourvu aux orientations et à l'aide technique. La première édition a été établie en fonction des objectifs, des besoins et des commentaires d'un sous-comité du Service de la protection de l'environnement (SPE) formé de: N. Bermingham (SPE, Montréal); C. Blaise (SPE, Longueuil); G. Coulombe (SPE, Montréal); K. Doe (SPE, Dartmouth); G. Elliott (SPE, Edmonton); D. MacGregor (SPE, Ottawa); J. MacLatchy (SPE, Ottawa); W. Parker (SPE, Dartmouth); D. Robinson (Pêches et Océans Canada, Ottawa); T. Ruthman (SPE, Ottawa); R. Scroggins (SPE, Ottawa); G. Sergy (SPE, Edmonton) et R. Watts (SPE, North Vancouver). Les représentants des provinces au sein du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique, en place en 1990, ont apporté à l'époque une contribution et des commentaires fort utiles (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 and G. van Aggelen, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique). Les personnes suivantes ont également revu les versions préliminaires de la première édition et contribué à sa publication : D. Vaughan (SPE, Dartmouth); S. Wade (SPE, Dartmouth); A. Beckett (SPE, Edmonton); F. Zaal (SPE, Edmonton); S. Yee (SPE, North Vancouver); D. Moul (SPE, North Vancouver); V. Zitko (Pêches et Océans Canada, St. Andrews); V. Cairns (Pêches et Océans Canada, Burlington); S. Samis (Pêches et Océans Canada, Vancouver); R. Martin (ministère de l'Environnement et des Terres de Terre-Neuve, St. John's); J. Lee (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) ainsi que 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 en annexe).

Les personnes suivantes ont contribué aux modifications apportées en mai 1996 à la première édition de cette méthode de référence (EC, 1990b), qui sont maintenant incorporées dans cette deuxième édition (avec des modifications si besoin était) : C. Bastien (ministère de l'Environnement du Québec, Sainte-Foy); B. Bayer (ministère de l'Environnement du Manitoba, Winnipeg); K. Doe (Service de la conservation de l'environnement - SCE - Moncton); G. Elliott (SPE, Edmonton); P. Jackman (SCE, St. John's); J. Miller (SPE, Ottawa); G. van Aggelen (SCE, North Vancouver); G. Westlake (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale); et R. Watts (SCE, North Vancouver).

Cette deuxième édition a été préparée par D.J. McLeay (McLeay Associates Ltd., Victoria) qui a reçu des conseils et de l'aide de R.P. Scroggins (Section de l'élaboration des méthodes et des applications, Environnement Canada, Ottawa). Les membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale (voir annexe) ont contribué aux modifications introduites dans cette édition et les ont appuyées. Nous tenons à remercier tout spécialement les personnes suivantes à qui nous devons certaines des modifications et ajouts : K. Doe (SCE, Moncton); G. Elliot (SPE, Edmonton) et J. Schroeder (ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale).

Introduction

Le présent document remplace la première édition de la *méthode de référence* SPE 1/RM/13 (EC, 1990b) publiée en juillet 1990 et à laquelle des modifications ont été apportées en mai 1996. Cette deuxième édition reprend les instructions d'analyse, les lignes directrices et le libellé du rapport SPE 1/RM/13 tel que modifié en mai 1996, à l'exception de modifications ou d'ajouts qui ont été jugés nécessaires ou qui constituaient des améliorations prudentes selon Environnement Canada.

Le présent document décrit les modes opératoires à employer pour les essais de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel, tels que précisés par les gouvernements canadiens impliqués dans la surveillance et le contrôle de la pollution des effluents industriels ou municipaux. La truite arc-en-ciel est utilisée depuis trois décennies au Canada pour les essais d'effluents prévus par une série de règlements et de lignes directrices (SPE, 1971, 1973, 1974, 1977a-c, 1984; Gouvernement du Canada, 1992). Cette *méthode de référence* devrait être utilisée conjointement avec le rapport d'Environnement Canada (EC, 1990a, incluant les modifications apportées en 1996) qui présente les raisons à l'appui et des détails additionnels.

Par bien des aspects, les modes opératoires exposés ci-après sont semblables à des méthodes établies par les provinces canadiennes (McGuinness, 1982; Rocchini *et al.*, 1982; Craig *et al.*, 1983; MEO, 1989), à des méthodes employées aux États-Unis (ASTM, 1980; USEPA, 1985a; 1985b; APHA *et al.*, 1998), et à des techniques

internationales (BHSC, 1982; UKWRC, 1983; OCDE, 1984). 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 dans la présente *méthode de référence* qu'on devrait appliquer.

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, auparavant *Salmo gairdneri*) doit être utilisée comme organisme d'essai lorsqu'on applique cette *méthode de référence*. Cette espèce, qui provient de l'Ouest de l'Amérique du Nord, fréquente maintenant les eaux de toutes les provinces canadiennes et est très répandue dans le monde entier. Elle prospère dans les eaux froides et douces, fréquente les eaux côtières de l'Atlantique et du Pacifique et est couramment élevée dans des écloseries et des établissements commerciaux d'aquiculture. Elle est devenue, dans le monde entier, le poisson d'eau froide étalon pour les essais de toxicité en eau douce, et on dispose à son sujet d'une banque de données toxicologiques d'une ampleur appréciable.

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) (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 avec un produit toxique de référence, qui permet d'évaluer la sensibilité des poissons soumis à l'essai à un produit toxique étalon ainsi que la précision des données produites par le laboratoire pour ce produit chimique.

L'essai doit 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 1400 mS/m à une température de 15° C. Les effluents de salinité supérieure à 10 ‰ qui sont rejetés dans des eaux douces devraient aussi faire l'objet d'essais effectués avec des truites arc-en-ciel acclimatées à l'eau douce. Pour les effluents de salinité supérieure à 10 ‰ qui sont rejetés directement dans des eaux réceptrices estuariennes ou marines, on devrait utiliser une espèce autorisée par le laboratoire régional d'Environnement Canada (adresses à l'annexe) et acclimatée à une eau de mer de salinité semblable à celle de l'effluent.

Organismes et détention

2.1 *Espèce et source*

La truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) doit être utilisée pour les essais. On peut se servir d'alevins ayant atteint le stade de l'alimentation active depuis au moins deux semaines ou de fingerlings. Le poids frais moyen des poissons doit être compris entre 0,3 et 2,5 g, et le plus gros poisson ne devrait pas être plus de deux fois plus long que le plus petit poisson soumis au même essai.

On peut se procurer les poissons aux stades de l'oeuf embryonné, d'alevin ou de fingerling. Chaque groupe de poissons devrait provenir d'une éclosure agréée, reconnue pour être exempte de maladies et dotée d'un programme continu de surveillance de la santé des organismes et de certification. Leur obtention et leur expédition devraient être approuvées par des représentants régionaux du comité fédéral-provincial de transplantations d'espèces de Pêches et Océans Canada, dans les provinces où ce comité contrôle les mouvements des stocks de poissons. Pour obtenir des conseils sur les sources de truites, on peut communiquer avec les bureaux régionaux d'Environnement Canada (adresses à l'annexe).

2.2 *Détention et acclimatation*

Les poissons devraient être élevés dans des réservoirs et d'autres installations fabriqués de matériaux non toxiques comme l'acier inoxydable, la porcelaine, le polyester armé de fibre de verre, l'acrylique, le polyéthylène ou le polypropylène. Les oeufs et les alevins

peuvent être incubés dans des plateaux d'alevinage à débit vertical ou dans des bassins à écoulement d'eau (Leitritz et Lewis, 1976). Les alevins et les fingerlings peuvent être élevés et acclimatés dans des bassins ou des réservoirs où l'eau peut s'écouler, à l'abri de toute perturbation physique et, de préférence, dans un endroit séparé des réservoirs d'essai.

Après livraison aux installations d'élevage ou d'acclimatation du laboratoire chargé des essais, les poissons doivent être détenus pour au moins deux semaines dans les conditions précisées à la section 2.4. Cette période d'acclimatation doit immédiatement précéder l'essai auquel ils vont être soumis. L'acclimatation des poissons peut se dérouler à l'intérieur ou à l'extérieur, dans des réservoirs dotés de couvercles munis d'appareils d'éclairage à réglage photopériodique. La publication d'Environnement Canada (EC, 1990a) donne de plus amples détails sur la détention et l'acclimatation des poissons devant être soumis à des essais de toxicité.

Les réservoirs devraient rester propres, la nourriture excédentaire et les excréments étant siphonnés aussi souvent que nécessaire. Il est recommandé d'utiliser des réservoirs dotés de colonnes d'alimentation doubles et centrales, qui assurent un autonettoyage partiel. Il faudrait désinfecter les réservoirs et les rincer à fond avec de l'eau ayant servi à la détention ou à l'acclimatation des poissons avant d'y déposer un nouveau lot de poissons. On devrait utiliser des désinfectants renfermant

des composés chlorés ou iodophores ou du chlorure de n-alkyldiméthylbenzylammonium.

Sauf indication contraire du fabricant, il faudrait nourrir les poissons une ou plusieurs fois par jour avec une nourriture en boulettes commerciale (standard) reconnue, la ration quotidienne variant entre 1 et 5 % du poids frais des poissons, selon la température de l'eau et leur taille (EC, 1990a). Le type et la taille des boulettes devraient être choisis en fonction de la taille et de l'âge des poissons, de la température de l'eau et des recommandations du fabricant. On devrait également suivre les recommandations du fabricant en ce qui touche la durée et la méthode de stockage de la nourriture.

Les poissons morts ou moribonds devraient être enlevés immédiatement après l'inspection quotidienne.

Les mortalités dans les réservoirs d'où proviendront les poissons soumis à l'essai devraient être surveillées et consignées quotidiennement, et doivent l'être au minimum cinq jours par semaine. Pendant la période de sept jours précédant le jour de mise en route de l'essai, le taux cumulatif de mortalité des poissons doit être inférieur à 2 %. Si le taux cumulatif de mortalité durant cette période est de 2 à 10 %, l'acclimatation doit être prolongée d'une période additionnelle d'au moins sept jours, et jusqu'à ce que le taux cumulatif de mortalité soit inférieur à 2 % pour la période de sept jours précédant la mise en route de l'essai. Si le taux de mortalité dépasse 10 % par semaine, pour une période quelconque de sept jours, le groupe de poissons est inadmissible pour utilisation ultérieure lorsque les mortalités sont causées par la maladie ou la présence de contaminants aquatiques; lorsqu'elles sont attribuables à

d'autres facteurs (p. ex., taux de mortalité initial élevé pendant le passage au stade de l'alimentation active ou à la suite du transfert des poissons), on peut utiliser les poissons pour des essais de toxicité à condition que le taux de mortalité dans les réservoirs d'où ils proviennent baisse à moins de 2 % pendant les sept jours précédant immédiatement le jour de mise en route de l'essai.

Il faudrait éviter de traiter les poissons malades à l'aide de produits chimiques. Si un tel traitement est inévitable, il faut attendre au moins deux semaines avant de pouvoir les utiliser pour des essais. L'essai portant sur un produit toxique de référence (section 7) permet d'évaluer dans une certaine mesure si les poissons conviennent pour des essais de toxicité.

2.3 Eau

L'eau pour la détention et l'acclimatation des poissons peut être de l'eau souterraine ou de surface non contaminée ou encore de l'eau potable déchlorée provenant du réseau municipal d'alimentation. Elle devrait favoriser de façon constante la survie, la santé et le développement de la truite arc-en-ciel. On devrait évaluer la qualité chimique de l'eau du laboratoire aussi souvent que nécessaire pour en consigner les variations. On devrait mesurer au moins la dureté, le pH, la conductivité, l'oxygène dissous et le chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau potable provenant du réseau municipal d'alimentation) et, au besoin, l'alcalinité, les matières solides en suspension, le carbone organique total, les gaz totaux dissous, l'ammoniac, les nitrites, les métaux et l'ensemble des pesticides organophosphorés. Toute sursaturation en gaz devrait être éliminée (voir EC, 1990a).

Si l'on utilise de l'eau déchlorée provenant du réseau municipal d'alimentation, on doit voir à ce qu'elle soit exempte de toute concentration nocive de chlore ou de composé chlorés au moment de l'exposition des poissons. L'objectif établi pour la concentration de chlore résiduel total dans les réservoirs de détention et dans l'eau de contrôle/de dilution des réservoirs d'essai est d'au plus 0,002 mg/L (voir EC, 1990a).

Le débit d'eau fraîche dans les réservoirs de détention et d'acclimatation doit être ≥ 1 L/min par kilogramme de poissons détenus (soit $1,4$ L/g poisson \cdot d ou $0,69$ g poisson \cdot d/L). De plus, les réservoirs doivent renfermer, en tout temps, ≥ 1 L d'eau par 10 g de poissons détenus. Le débit de l'eau dans chaque réservoir devrait être mesuré et consigné périodiquement (p. ex., quotidiennement ou, au minimum, hebdomadairement). De plus, il faudrait périodiquement (p. ex., chaque semaine) prélever au hasard dix poissons ou plus de chaque réservoir d'acclimatation/de détention pour déterminer les poids frais individuels et s'assurer que les exigences stipulées sont respectées. Le poids frais moyen individuel des poissons prélevés devrait être déterminé et consigné pour chacun de ces échantillons. Ces mesures devraient aussi servir d'indicateur lorsqu'on détermine le volume d'effluent nécessaire pour un essai et pour s'assurer de ne pas dépasser la densité maximale de 0,5 g de poisson/litre de solution dans chaque récipient d'essai au cours de l'essai de toxicité (voir section 4.2).

2.4 Conditions physico-chimiques

L'éclairage devrait être assuré par des appareils fluorescents à spectre continu et avoir une intensité comprise entre 100 et 500

lux à la surface de l'eau. Pendant au moins deux semaines avant l'essai, on doit maintenir une photopériode constante de 16 ± 1 h de lumière et 8 ± 1 h d'obscurité, préférablement avec une période de transition de 15 à 30 minutes.

La température de détention peut se situer entre 4 et 18° C, mais les poissons doivent être acclimatés pendant au moins deux semaines et, de préférence, pendant trois semaines ou plus, à une température de $15 \pm 2^\circ$ C avant d'être soumis à un essai. La température de l'eau peut être modifiée à raison d'au plus 3° C/d. La teneur en oxygène dissous de l'eau des réservoirs devrait être de 80 à 100 % de saturation en air. Au besoin, on devrait assurer une aération supplémentaire des réservoirs au moyen d'air comprimé filtré et exempt d'huile. Le pH de l'eau devrait être compris entre 6,0 et 8,5. On devrait contrôler, de préférence tous les jours, la température de l'eau de chaque bassin d'acclimatation ou de détention ainsi que sa teneur en oxygène dissous, son pH, son débit et le nombre de poissons morts. Il est aussi recommandé de contrôler chaque semaine, ou plus fréquemment, la teneur en ammoniac et en nitrites dans les réservoirs d'acclimatation/de détention. Si l'on utilise de l'eau déchlorée du réseau municipal d'alimentation, il est de plus recommandé de mesurer une fois par semaine, ou plus fréquemment, la teneur en chlore résiduel total dans ces réservoirs.

Installations

L'essai doit être réalisé dans une installation isolée des allées et venues générales du laboratoire, soit dans une pièce isolée ou dans une zone entourée d'un mur ou d'un rideau. La poussière et les émanations devraient être réduites au minimum. On peut maintenir la température d'essai ($15 \pm 1^\circ \text{C}$) au moyen d'un appareil de conditionnement de l'air réglé par thermostat ou en immergeant les réservoirs d'essai dans des bains-marie à température contrôlée.

Les réservoirs d'essai et tout l'équipement pouvant entrer en contact avec des 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. Les réservoirs d'essai doivent

être en verre ou en Plexiglas, en acrylique, en polypropylène, en polyéthylène, ou être revêtus de polyéthylène (non toxique). Si l'on utilise des revêtements, il faut les jeter à la fin de l'essai. Il est recommandé de couvrir les réservoirs d'essai au besoin pour éviter que les poissons ne s'en échappent (EC, 1990a). Tous les réservoirs utilisés pour un essai devraient être identiques et contenir au moins 15 cm d'eau.

L'équipement doit être nettoyé et rincé à fond conformément à de bonnes pratiques de laboratoire.

L'eau de contrôle/de dilution devrait correspondre à la description fournie à la section 2.3 et, de préférence, être identique à l'eau utilisée pour la détention et ou l'acclimatation des poissons.

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 de la taille des poissons, du nombre de poissons par 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 25 à 50 L ou plus pour les essais à concentration unique et de 50 à 100 L ou plus pour ceux visant à établir une CL50.

Les récipients utilisés pour le transport et le stockage des échantillons doivent être fabriqués de matériaux non toxiques (p. ex., bonbonnes ou seaux de polyéthylène ou de polypropylène). Ils doivent être neufs, ou encore nettoyés à fond et séchés, et on devrait les rincer avec de l'eau propre, puis avec l'échantillon à recueillir. Il faudrait les remplir afin de réduire les vides d'air, puis les fermer hermétiquement (p. ex., avec un couvercle-pression si le récipient utilisé est un seau). 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 du (des) préposé(s) à l'échantillonnage.

Les échantillons ne doivent pas geler. Pendant le transport, ils devraient être conservés dans l'obscurité, à une température de 1 à 8° C si le voyage dure plus de deux jours. À la réception du ou des échantillon(s) au laboratoire, il faudrait mesurer et consigner la température de l'effluent dans chaque récipient contenant les

échantillons. La température de la portion de chaque échantillon destinée à l'essai de toxicité doit être ajustée à $15 \pm 1^\circ \text{C}$, avant d'entreprendre l'essai de toxicité.

Pour permettre la mise en route de l'essai le jour de l'arrivée de l'échantillon au laboratoire, on peut ajuster rapidement la température de l'échantillon ou des échantillons d'effluent (voir section 4.3). Une autre option consiste à entreposer l'échantillon à l'obscurité à $4 \pm 2^\circ \text{C}$ pendant une brève période (p. ex., pendant la fin de semaine si les échantillons sont reçus le vendredi après-midi). Si l'on a recours à cette alternative, l'échantillon doit être entreposé dans des récipients remplis à capacité et hermétiquement fermés, et gardés à l'obscurité dans une installation réfrigérée. Une troisième option est de garder l'échantillon pendant la nuit dans une installation dont la température est ajustée à celle de la température d'essai (c'est-à-dire, $15 \pm 1^\circ \text{C}$); dans cette circonstance, l'essai peut être entrepris le lendemain. Si un échantillon est réchauffé ou refroidi à $15 \pm 1^\circ \text{C}$ au cours de la nuit, il faut dans ce cas le garder dans un ou plusieurs récipients remplis à capacité et hermétiquement fermés.

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. Le contenu de chaque récipient doit être agité vigoureusement just avant de verser des aliquotes pour préparer les solutions. Les

sous-échantillons (c.-à-d. les aliquotes réparties dans deux ou plusieurs récipients) doivent être combinés.

4.2 Conditions de l'essai

Il s'agit d'un essai statique, c'est-à-dire sans renouvellement des solutions, d'une durée de 96 h. La densité de chargement de poissons dans chaque réservoir d'essai ne doit pas dépasser 0,5 g/L. Le respect de cette exigence est basé sur le poids frais moyen des poissons témoins à la fin de l'essai (section 4.5). Il ne faut pas nourrir les poissons pendant l'essai ni pendant les 16 h qui le précèdent. L'essai n'est pas valable si plus de 10 % des poissons témoins meurent ou manifestent un comportement atypique ou stressé (EC, 1990a).

L'essai doit être mené à 15 ± 1 °C. Toutes les solutions doivent être aérées pendant l'essai à un débit contrôlé de $6,5 \pm 1$ mL/min • L. L'éclairement et la photopériode (16 ± 1 h de lumière, 8 ± 1 h d'obscurité) doivent être les mêmes que les conditions définies pour l'acclimatation (section 2.4).

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 5,5 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. L'ajustement du pH est également l'une des techniques d'approche expérimentale qui permettent de définir la cause de la toxicité des échantillons (USEPA, 1991).

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 15 ± 1 °C si elle ne se situe pas dans cet intervalle. L'échantillon peut être refroidi au moyen d'un bain d'eau froide ou d'un refroidisseur à immersion fait d'un matériau non toxique. Pour le réchauffer, utiliser un bain-marie. Ne pas utiliser de thermoplongeur pour réchauffer les échantillons ou les solutions d'essai.

Pour un essai donné, il faut utiliser la même eau pour préparer la ou les solutions de contrôle et toutes les concentrations d'essai inférieures à 100 %. Il s'agit presque toujours de la même eau qui a servi à l'acclimatation. 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 propres. Celles dont l'emploi est acceptable sont les suivantes : (i) Aqua Fizzz, 2,5 cm de longueur, 1,5 cm de diamètre, cylindriques (usage unique); ou (ii) AS1 en verre de silice, 3,8 cm de longueur, 1,3 cm de largeur, rectangulaires (réutilisables après un nettoyage adéquat; pour plus de détails, voir EC, 1990a, ainsi que les modifications connexes apportées en mai 2007).

Les réservoirs d'essai devraient être rincés avec de l'eau de contrôle/de dilution juste avant d'être utilisés, mais cela n'est pas nécessaire si l'on a recours à des revêtements de polyéthylène jetables. Chaque solution d'essai doit avoir le même volume et être bien mélangée avec une baguette de verre, un agitateur en téflon ou un autre dispositif fait d'un matériau non toxique, juste avant l'utilisation. Tous les réservoirs d'essai, dispositifs de mesure, appareils d'agitation et seaux pour le transfert des poissons doivent être nettoyés

et rincés à fond, conformément aux modes opératoires normalisés.

Chaque réservoir d'essai doit contenir au moins 15 cm de solution. Une fois préparée, chaque solution d'essai doit être aérée pendant 30 minutes à raison de $6,5 \pm 1$ mL/min • L. Par la suite, on doit mesurer la teneur en oxygène dissous au moins dans la solution de la concentration la plus élevée (normalement l'échantillon non dilué). Si, et seulement si, cette valeur est inférieure à 70 % ou supérieure à 100 % de saturation en air, il faut alors, avant l'exposition des poissons, continuer d'aérer toutes les solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle, à raison de $6,5 \pm 1$ mL/L • min. Il ne faut pas poursuivre l'aération au-delà de 90 minutes additionnelles. Si une période d'aération plus courte a permis d'obtenir 70 % de saturation en air dans la solution d'essai de la concentration la plus élevée (ou 100 % de saturation, s'il y avait sursaturation), l'aération est arrêtée au temps requis pour atteindre ces valeurs. Immédiatement après, on doit introduire les poissons dans chaque solution d'essai et mettre en route l'essai, qu'on ait obtenu ou non de 70 à 100 % de saturation dans toutes les solutions d'essai. L'aération **doit** être assurée par des bulles d'air comprimé passant par **des pierres de barbotage (voir les détails fournis ci-dessus)**. L'aération de chaque solution d'essai doit être maintenue tout au long de l'essai à raison de $6,5 \pm 1$ mL/L • min.

4.4 *Mise en route de l'essai*

Il faut préparer une ou plusieurs solutions de contrôle et les inclure dans chaque essai conduit avec chaque échantillon. L'utilisation d'une seule solution de contrôle et des poissons qu'elle contient pour plus

d'un essai de toxicité et (ou) pour plus d'un échantillon d'effluent est inacceptable.

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. Les récipients d'essai devraient être installés de façon à faciliter l'observation des poissons. Les concentrations à expérimenter devraient être placées selon un ordre aléatoire s'il s'agit d'un essai à concentrations multiples (section 6).

Les poissons en bonne santé qui ont été acclimatés pendant au moins deux semaines aux conditions de température et d'éclairage utilisées pour l'essai (voir sections 2.1, 2.2, 2.3, et 2.4), et qui sont destinés à l'essai, doivent être prélevés au hasard du (des) bassins(s) d'acclimatation. Les méthodes de manipulation et de transfert devraient minimiser le stress (EC, 1990a).

On doit introduire au moins dix poissons dans chaque concentration d'essai, y compris chaque solution de contrôle. Les poissons peuvent être répartis dans deux récipients d'essai ou plus de la même concentration, de façon à respecter la densité de chargement requise (voir section 4.2).

En plus de placer les récipients d'essai selon un ordre aléatoire dans l'aire d'expérimentation, il faudrait également introduire les poissons dans chaque solution d'essai selon un ordre aléatoire. Un ou deux poissons devraient être introduits tour à tour dans chaque solution d'essai, y compris la ou les solution(s) de contrôle, jusqu'à ce que dix poissons aient été introduits dans chaque récipient.

Si une ou plusieurs solutions d'essai sont fortement colorées, opaques ou mousseuses, on peut utiliser des paniers d'un matériau non toxique et non abrasif (p. ex., nylon, polyéthylène ou polypropylène) pour inspecter les poissons pendant l'essai. On devrait alors placer un de ces paniers dans chacun des récipients d'essai (y compris le ou les contrôle[s]). Avant usage, chaque panier doit être nettoyé et rincé à fond avec de l'eau de contrôle/de dilution.

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 matières solides flottantes ou décantables. Il faudrait aussi observer l'apparence des solutions d'essai, et consigner les modifications survenant au cours de l'essai.

La teneur en oxygène dissous, le pH et la température de chaque solution d'essai, y compris la ou les solutions de contrôle, doivent être mesurés au moins au début et à la fin de l'essai. Les dernières mesures devraient être effectuées une fois les observations biologiques terminées. La conductivité de chaque solution d'essai doit être mesurée au moins au début de l'essai.

Il faut procéder fréquemment à l'observation de routine des poissons dans chaque réservoir d'essai afin de préciser à quel moment la mort est survenue, identifier tout effet toxique sublétaux évident, et retirer les poissons morts qui autrement pourraient souiller la solution d'essai. Dans la mesure du possible, chaque réservoir d'essai devrait être inspecté au moins 24, 48, 72 et 96 h après le début de l'essai. Des observations plus fréquentes sont indiquées au cours du premier jour. Les poissons morts doivent être consignés et retirés lors de chaque

inspection. Les poissons sont réputés morts quand ils ne laissent apparaître aucun signe d'activité operculaire ou autre et qu'ils ne réagissent pas à une légère poussée. Il faudrait également consigner les effets toxiques sublétaux évidents (EC, 1990a). Si les solutions sont fortement colorées, opaques ou mousseuses, on peut inspecter les poissons au moyen d'une époussette (nettoyée et rincée avant usage) ou en les soulevant à la surface au moyen d'un panier approprié (section 4.4).

On doit déterminer et consigner, à la fin de l'essai, la longueur moyenne à la fourche des poissons témoins. Les mesures de la longueur à la fourche, pour chaque poisson témoin, devraient servir à évaluer si la taille des poissons soumis à l'essai correspond à la recommandation à l'effet que *"le plus gros poisson ne devrait pas être plus de deux fois plus long que le plus petit poisson soumis au même essai"* (section 2.1).

Le poids frais moyen de chaque poisson témoin doit être déterminé et consigné à la fin de l'essai. Cette mesure doit servir à confirmer que l'on a respecté la gamme de poids acceptable pour les poissons soumis à l'essai, précisée à la section 2.1 (c.-à-d., *"leur poids frais moyen doit se situer entre 0,3 et 2,5 g"*). Il doit aussi servir à confirmer que l'on a respecté la densité de chargement des poissons dans les solutions d'essai, précisée à la section 4.2 (c.-à-d., *"la densité de poissons dans chaque récipient d'essai ne doit pas dépasser 0,5 g/L"*).

Tous les poissons encore en vie (y compris les témoins) à la fin de l'essai doivent être éliminés de manière humanitaire. On recommande à cette fin une surdose d'un agent anesthésique comme le méthosulfonate de tricaine.

Mode opératoire pour la détermination du taux de mortalité après 96 h dans un essai à concentration unique

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. Pour cet essai, on recommande des répétitions (p. ex., trois répétitions de l'effluent non dilué et trois répétitions des solutions de contrôle, en utilisant dix poissons par solution répétée), afin d'avoir une plus grande confiance dans les résultats finaux et leur interprétation. Au moins dix poissons doivent être exposés à chaque solution d'essai et de contrôle. L'essai n'est

pas valide si plus de 10 % des poissons témoins (données combinées si l'on utilise des solutions répétées) meurent ou laissent apparaître un comportement atypique ou stressé.

Le résultat final de cet essai est le pourcentage de mortalité après 96 h. On utilise couramment une valeur de 50 %. Par exemple, en vertu du Règlement fédéral de 1992 sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers découlant de la *Loi sur les pêches* (Gouvernement du Canada, 1992), un effluent n'est pas acceptable si 50 % ou plus des poissons meurent après avoir été exposés à une concentration de 100 %.

Mode opératoire pour la détermination de la CL50–96 h dans un essai à concentrations multiples

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

Pour déterminer la CL50, il faut utiliser au moins cinq concentrations d'effluent et une solution de contrôle (entièrement composée d'eau de dilution). On doit exposer au moins dix poissons à chaque concentration d'essai, y compris la concentration de 100 % et la solution de contrôle. La concentration la plus élevée doit être l'effluent non dilué (100 %), et chaque concentration successive doit correspondre à au moins 50 % de la précédente. Il est avantageux d'utiliser une série géométrique (ou logarithmique), par exemple 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 (EC, 1990a, annexe D).

Du fait que cette CL50 doit inclure l'effluent non dilué comme la concentration la plus élevée, les résultats de cet essai peuvent aussi servir à déterminer le paramètre d'un essai avec une concentration unique, soit le pourcentage final de mortalité après 96 h dans l'effluent non dilué (voir section 5).

On peut prévoir des répétitions de chaque concentration, mais cela n'est pas une exigence. 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 de poissons exposés à chaque concentration d'essai, sans nécessairement en améliorer l'exactitude.

On devrait calculer la CL50 après 96 h et ses limites de confiance à 95 % et indiquer la méthode utilisée pour ces calculs. Des programmes informatiques existent à cette fin (EC, 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 96 h pour les diverses concentrations d'effluent (EC, 1990a).

L'essai n'est pas valide (les données étant combinées s'il y a des répétitions) plus de 10 % des poissons témoins meurent ou laissent apparaître un comportement atypique ou stressé.

Mode opératoire pour les essais avec un produit toxique de référence

On doit utiliser un produit toxique de référence pour évaluer la sensibilité relative de la population de poissons utilisée dans l'essai de toxicité ainsi que la précision et la fiabilité des données produites par le personnel du laboratoire pour ce produit toxique de référence dans des conditions d'essai normalisées. Le ou les produits chimiques de référence en cause doivent faire l'objet d'un essai au moins une fois par mois civil où l'on procède à des essais d'effluents, et au moment de l'acclimatation d'un nouveau lot de poissons. Les poissons utilisés pour l'essai du ou des produit(s) toxique(s) de référence mené conjointement avec un essai servant à déterminer la létalité aiguë d'un effluent doivent provenir du même groupe que ceux utilisés pour l'essai conduit avec l'effluent. Les méthodes et les conditions à respecter sont identiques à celles énoncées à la section 4 et déterminées par Environnement Canada (1990a, c), à ceci près que c'est un produit chimique de référence, et non un effluent, qui est soumis à l'essai. On doit utiliser pour ces essais l'eau de contrôle/de dilution qui sert couramment aux essais d'effluent.

On recommande d'utiliser comme produits toxiques de référence du phénol ou du sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) de qualité «reactif». La CL50 après 96 h devrait être déterminée pour le ou les produits toxiques de référence utilisés et exprimée sous forme de mg/L de phénol ou de zinc (Zn^{++}) (EC, 1990a). Les solutions mères de phénol doivent être préparées le jour même de leur utilisation; les solutions de zinc devraient être préparées le jour même de leur

utilisation ou alors être conservées à l'obscurité à un pH entre 3 à 4.

Les concentrations du produit toxique de référence dans toutes les solutions mères devraient être mesurées au moyen de méthodes chimiques appropriées (APHA *et al.*, 1998). Au moment de la préparation des solutions d'essai, on doit prélever des aliquotes au moins dans la solution de contrôle et dans les solutions à teneur inférieure, moyenne et supérieure; ces aliquotes devraient être analysées immédiatement ou stockées pour analyse future, au cas où la CL50 serait atypique (c.-à-d., à l'extérieur des limites de contrôle). Si elles sont stockées, on doit les garder à l'obscurité, à une température de $4 \pm 2^\circ \text{C}$. Un agent conservateur devrait être ajouté aux parties aliquotes de solutions de zinc et de phénol avant de les stocker (APHA *et al.*, 1998). Les aliquotes d'échantillon 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 les observations biologiques terminées. Le calcul de la CL50 devrait être fondé sur les concentrations mesurées, si elles diffèrent de façon appréciable (c.-à-d., d'au moins 20 %) des concentrations nominales.

Une fois que l'on a recueilli suffisamment de données (EC, 1990c), on doit établir et continuellement mettre à jour un diagramme de contrôle qui présente graphiquement les CL50 pour chaque produit toxique de

référence utilisé. Ce diagramme devrait rapporter la concentration logarithmique en ordonnée et la date ou le numéro de l'essai en abscisse. Chaque nouvelle CL50 pour le produit toxique de référence devrait être comparée aux limites d'avertissement établies; pour être acceptable, la CL50 doit s'inscrire à l'intérieur des limites. La moyenne et l'écart type doivent toujours être calculés sur une échelle logarithmique. La moyenne logarithmique et ses limites d'avertissement inférieure et supérieure (± 2 fois l'écart type) calculées en prenant les valeurs logarithmiques disponibles, sont recalculées pour chaque CL50 successive, jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (USEPA, 1985a; EC, 1990c).

Le diagramme de contrôle peut être établi en reportant simplement la moyenne et ± 2 fois

l'écart type comme logarithmes, ou si l'on préfère, en les convertissant en valeurs arithmétiques et en reportant la $CL_{50} \pm 2$ fois l'écart type sur une échelle logarithmique de concentration. Si une CL_{50} s'inscrivait en dehors des limites de contrôle, la sensibilité des poissons soumis à l'essai et la performance ainsi que la précision de l'essai seraient mises en doute. Dans de telles circonstances, on doit vérifier toutes les conditions de détention et d'essai; selon les constatations faites, il se peut qu'on doive prolonger l'acclimatation des poissons et les soumettre à une nouvelle évaluation au moyen d'un ou de plusieurs produits toxiques de référence, ou encore obtenir une nouvelle population de poissons et l'acclimater avant de l'utiliser pour des essais de toxicité avec un effluent et un ou des produits toxiques de référence.

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, on peut consulter les sections précédentes de cette méthode.

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 qui est entrepris. Ces renseignements doivent être fournis conformément aux règlements pertinents et dans la forme et les moyens précisés par Environnement Canada* (c.-à-d., présentation manuelle ou informatique; mode de transmission; forme et contenu).

Environnement Canada peut aussi exiger la communication d'informations autres que celles spécifiées en section 8.1, par exemple 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 un audit 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», «lixiviât»).
- 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.

8.1.2 Installations et conditions de l'essai

- Type et méthode d'essai (p. ex., «essai à concentration unique», «méthode décrite dans la deuxième édition (Décembre 2000) de la publication SPE 1/RM/13»).
- Indication de toute exigence, exprimée par «doit», «doivent» ou «il faut», stipulée dans les sections 2 à 7 de ce rapport, qui n'a pas été respectée, avec les détails relatifs au non-respect de la ou des exigences.

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

- Nom du laboratoire d'essai et ville où il se trouve.
- Pourcentage de mortalité des poissons dans le ou les réservoir(s) d'où proviennent les poissons soumis aux essais, tel qu'enregistré chaque jour (ou au minimum cinq jours sur les sept compris dans une période hebdomadaire), pour la période de sept jours précédant immédiatement l'essai.
- Espèce d'organisme soumis à l'essai.
- Date et heure de mise en route de l'essai définitif.
- Personne(s) 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 de solutions d'essai.
- Confirmation que le pH de l'échantillon ou de la solution d'essai n'a pas été corrigé. Indication de la méthode utilisée pour la correction du pH si des essais avec et sans correction du pH ont été conduits (voir section 4.2).
- Renseignements sur toute aération des solutions d'essai avant l'introduction des poissons (débit, durée). Débit d'aération pendant l'essai.
- Concentration et volume des solutions d'essai, y compris les solutions de contrôle, et mention de l'usage de répétitions, s'il y a lieu.
- Mesures de la teneur en oxygène dissous, du pH et de la température de chaque solution d'essai, y compris des

solutions de contrôle, au début et à la fin de l'essai. Mesure de la conductivité de chaque solution d'essai au début de l'essai.

- Nombre de poissons introduits dans chaque récipient d'essai.
- Longueur moyenne à la fourche des poissons témoins, à la fin de l'essai, avec intervalles de valeurs mesurées.
- Poids frais moyen individuel des poissons témoins à la fin de l'essai.
- Densité estimée de chargement (g/L) des poissons dans les solutions d'essai.

8.1.3 Résultats

- Nombre de poissons morts dans chaque solution d'essai (y compris les solutions de contrôle) après 96 h. Nombre de poissons témoins laissant apparaître un comportement atypique ou stressé.
- Taux moyen de mortalité dans les solutions d'effluent et l'eau de contrôle, s'il s'agit d'un essai à concentration unique ou à concentrations multiples conduit en utilisant des solutions répétées. Nombre moyen de poissons témoins montrant un comportement atypique ou stressé si on a utilisé des solutions de contrôle répétées.
- Pour les essais à concentrations multiples, estimation de la CL50 et ses limites de confiance à 95 %, si statistiquement possibles. Indication de la méthode statistique utilisée (p. ex., «probabilité logarithmique», «moyenne mobile»).
- Dernière valeur de la CL50 après 96 h (et de ses limites de confiance à 95 %)

calculée pour le(s) essai(s) avec le ou les produit(s) toxique(s) de référence conduit(s) avec le groupe de poissons utilisés dans les essais avec l'effluent.
Produit(s) chimique(s) de référence.
Date de mise en route de l'essai.
Moyenne géométrique des CL50 calculées antérieurement et limites d'avertissement (± 2 fois l'écart type).

8.2 *Données à verser au dossier***

8.2.1 *Effluent*

- Tout renseignement (p. ex., code, description de l'échantillon, date/heure d'échantillonnage) inscrit sur la ou les étiquettes du ou des récipients contenant l'échantillon.
- Volume de l'échantillon.
- Conditions de transport et de stockage à l'arrivée au laboratoire et durant l'entreposage. Mention si l'échantillon était gelé en tout ou en partie à l'arrivée.
- Apparence et autres propriétés (observations sur la couleur, la turbidité, l'odeur et la présence de solides flottants ou décantables).
- Modification de la couleur, précipitation, floculation, rejet de substances volatiles et autres modifications survenues pendant la préparation des solutions d'essai.
- Mode opératoire et résultats de toute analyse chimique (p. ex., teneur en

solides en suspension, dureté) effectuée sur l'effluent, si disponibles.

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.
- Conditions normales de détention et d'acclimatation : récipients, emplacement, éclairage, températures y compris le taux maximal de variation, aération, volume et débit de l'eau, mode utilisé pour le renouvellement de l'eau, nombre et densité des poissons, mode de manipulation, type de nourriture, ration et fréquence de l'alimentation, incidence et traitement éventuel de maladies, pourcentage hebdomadaire cumulatif de mortalité.
- Provenance des poissons soumis à l'essai.
- Bref résumé des conditions et modes opératoires propres à l'essai en ce qui touche la détention et l'acclimatation des poissons, s'ils diffèrent de la pratique courante (p. ex., durée, source et caractéristiques de l'eau employée telles que la température, le pH et la teneur en oxygène dissous, type de nourriture et ration, incidence et traitement de maladies, pourcentage hebdomadaire de mortalité).
- Description de la ou des source(s) de l'eau utilisée pour l'élevage et l'acclimatation des poissons et comme eau de contrôle/de dilution.
- Prétraitement de l'eau d'acclimatation et de l'eau de contrôle/de dilution, le cas

** Ces données doivent être conservées pendant cinq ans à l'installation d'essai ou dans les bureaux du responsable des rejets ou encore 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.

échant (p. ex., correction de la température, débit et durée de l'aération, quantité de tout produit chimique ajouté).

- Mesures (moyennes et intervalles) de la qualité de l'eau d'acclimatation et de l'eau de contrôle/de dilution effectuées sur l'approvisionnement en eau et dans les bassins de détention. Renseignements à fournir : dureté, pH, conductivité, teneur en oxygène dissous et chlore résiduel total (s'il s'agit d'eau déchlorée provenant du réseau d'alimentation municipal). Autre renseignements également souhaitables : gaz totaux dissous, alcalinité, matières 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 dans les bassins d'élevage ou d'acclimatation et à la surface des réservoirs d'essai.
- Description des réservoirs d'essai (dimension, forme et matériau), des couvercles, des paniers (si on utilise pour inspecter les poissons) et leurs méthodes courantes de nettoyage.
- Méthode utilisée pour l'introduction selon un ordre aléatoire des poissons dans les récipient d'essai.
- Méthodes et appareillage pour l'aération des solutions d'essai.

- Toutes les mesures individuelles de longueur à la fourche et du poids frais des poissons soumis à l'essai (avec les valeurs moyennes et la gamme de valeurs pour chaque échantillon).
- Hauteur de solution d'essai dans les récipients d'essai. Apparence des solutions, y compris toute modification évidente survenue pendant l'essai.
- Concentrations d'essai des produits toxiques de référence, tant nominales que mesurées. 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 poissons morts non consignées au procès-verbal (p. ex., après 24, 48, et 72 h) (section 8.1.3).
- Observations du comportement et de l'apparence des poissons dans chaque solution d'essai faites au cours de l'essai.
- Toutes représentation graphique manuelle des données utilisée pour vérifier une CL50 générée par ordinateur.

Références

- APHA, AWWA, et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20^e éd., L. Clesceri, A. Greenber et A. Eaton (éditeurs), APHA, AWWA et WEF, Washington, DC (1998).
- ASTM (American Society for Testing and Materials). *Standard Practice for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians*, ASTM, Philadelphie, PA, Rapport E729-80, 25 pages (1980).
- BHSC (British Health and Safety Commission). *Methods for the Determination of Ecotoxicity, Approved Code of Practice. Notification of New Substances Regulations*, BHSC, Londres, (R-U), Rapport COP 8, 13 pages (1982).
- Craig, G.R., K. Flood, J. Lee, et M. Thomson. *Protocol to Determine the Acute Lethality of Liquid Effluents to Fish*, ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale, Ontario, 9 pages (1983).
- EC (Environnement Canada). *Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel*. Conservation et Protection, Ottawa, Rapport SPE 1/RM/9, incluant les modifications apportées en mai 1996, 51 pages (1990a).
- EC (Environnement Canada). *Méthode d'essai biologique : Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel*. Conservation et Protection, Ottawa, Rapport SPE 1/RM/13 avec modifications apportées en mai 1996, 18 pages (1990b).
- EC (Environnement Canada). *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*. Conservation et Protection, Rapport SPE 1/RM/12, Ottawa, 1990 (1990c).
- Gouvernement du Canada. "Loi sur les pêches : Règlements sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers", *Gazette du Canada, Partie II, Vol. 126, No 11*, pp. 1967–2006 (1992).
- Leitritz, E. et R.C. Lewis. «Trout and Salmon Culture (Hatchery Methods)», *California Fish Bulletin, No. 164*, University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkley, CA, 197 pages (1976).
- McGuinness, E.J., *Procedures Manual, Aquatic Bioassay Service Projects*, Alberta Environmental Centre, Vegreville, Alberta, Rapport AECV-82M1, 56 pages (1982).
- MEO (ministère de l'Environnement de l'Ontario). *Protocol for Single Concentration Acute Lethality Tests on Liquid Effluent Samples using Rainbow Trout*, Rexdale, Ontario 10 pages, (1989).
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques). *Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques*. Paris, France, Document no. 203, 12 pages. (1984).
- Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts, and R.H. Young. *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish*, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria, C.-B., 18 pages (1982).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règlement sur les*

- effluents des fabriques de pâtes et papiers.* Rapport SPE 1-WP-72-1, Ottawa (1971).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règles d'emploi et d'admissibilité des dispersants pour traiter les nappes de pétrole.* Rapport SPE 1-DIU-73-1, Ottawa (1973).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règlement et directives sur les effluents des raffineries de pétrole.* Rapport SPE 1-WP-74-1, Ottawa, Ontario (1974).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règlement et directives sur les effluents liquides des mines de métaux.* Rapport SPE 1-WP-77-1, Ottawa, Ontario (1977a).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règlement et directives sur les effluents liquides de l'industrie de la viande et de la volaille.* Rapport SPE 1-WP-77-2, Ottawa, Ontario (1977b).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Règlement et lignes directrices sur les effluents des établissements de transformation de la pomme de terre.* Rapport SPE 1-WP-77-4, Ottawa, Ontario (1977c).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents.* Rapport SPE 1-WP-80-1, Ottawa, Ontario (1980).
- SPE (Service de la protection de l'environnement). *Lignes directrices concernant l'homologation des dispersants et leur utilisation pour traiter les nappes de pétrole.* 2^e éd. Rapport SPE 1-EP-84-1, Ottawa (1984).
- Stephan, C.E., «Methods for Calculating an LC50», Dans *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, F.L. Mayer et J.L. Hamelink (éd.), pp. 65-84, American Society for Testing and Materials, Philadelphie, PA (1977).
- UKWRC (United Kingdom Water Research Centre), *Acute Toxicity to Fish. Determination of the 96-hour LC50 of Test Substances to the Rainbow Trout Under Flow-through Conditions*, Water Research Center, Medmenham (R.-U.) Standard Operating Procedure, No. 120 02, 19 pages (1983).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*, W.H. Peltier et C.I. Weber (éd.), USEPA, Cincinnati, Rapport EPA/600/4-85-013, 216 pages (1985a).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. Standard Evaluation Procedure*, USEPA, Hazard Evaluation Division, Washington, DC, Rapport EPA-540/9-85-006, 12 pages (1985b).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations, Phase I. Toxicity Characterization Procedures*, 2^e éd., Duluth, MN, Rapport EPA/600/6-91/003 (1991).

Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale et adresses de l'administration centrale et des bureau régionaux d'Environnement Canada

Membres du Groupe intergouvernemental de la toxicité environnementale (au mois de décembre 2000)

Gouvernement fédéral (Environnement Canada)

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal (Québec)

M. Bombardier
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ontario)

U. Borgmann
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

J. Bruno
Pacific Environmental Science Centre
North Vancouver (Colombie-Britannique)

C. Buday
Pacific Environmental Science Centre
North Vancouver (Colombie-Britannique)

T. Corbin
Atlantic Environmental Science Centre
Moncton (Nouveau-Brunswick)

K. Doe
Atlantic Environmental Science Centre
Moncton (Nouveau-Brunswick)

G. Elliot
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alberta)

M. Fennell
Pacific Environmental Science Centre
North Vancouver (Colombie-Britannique)

F. Gagné
Centre Saint-Laurent
Montréal (Québec)

M. Harwood
Centre Saint-Laurent
Montréal (Québec)

P. Jackman
Atlantic Environmental Science Centre
Moncton (Nouveau-Brunswick)

N. Kruper
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alberta)

D. MacGregor
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ontario)

D. Moul
Pacific Environmental Science Centre
North Vancouver (Colombie-Britannique)

W. R. Parker
Service de la protection de l'environnement
Fredericton (Nouveau-Brunswick)

L. Porebski
Division du milieu marin
Hull (Québec)

D. Rodrigue
Direction générale de l'avancement des
technologies environnementales
Hull (Québec)

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ontario)

A Steenkamer
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ontario)

G. van Aggelen (Chairperson)
Pacific Environmental Science Centre
North Vancouver (Colombie-Britannique)

R. Watts
Pacific Environmental Science Centre
North Vancouver (Colombie-Britannique)

P. Wells
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)

Gouvernement fédéral
(Pêches et Océans Canada)

R. Roy
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (Québec)

Gouvernements provinciaux

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

B. Bayer
ministère de l'Environnement du Manitoba
Winnipeg (Manitoba)

D. Bedard
ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

M. Mueller
ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

D. Poirier
ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

J. Schroeder
ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ontario)

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada

Administration centrale

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

Région de l'Ontario

4905 rue Dufferin, 2^e étage
Downsview (Ontario)
M3H 5T4

Région de l'Atlantique

15^e étage, Queen Square
45, promenade Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région des Prairies et du Nord

Twin Atria No. 2, pièce 210
4999-98^e avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Région du Québec

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

Région du Pacifique et du Yukon*

224, rue Esplanade ouest
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7M 3H7

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