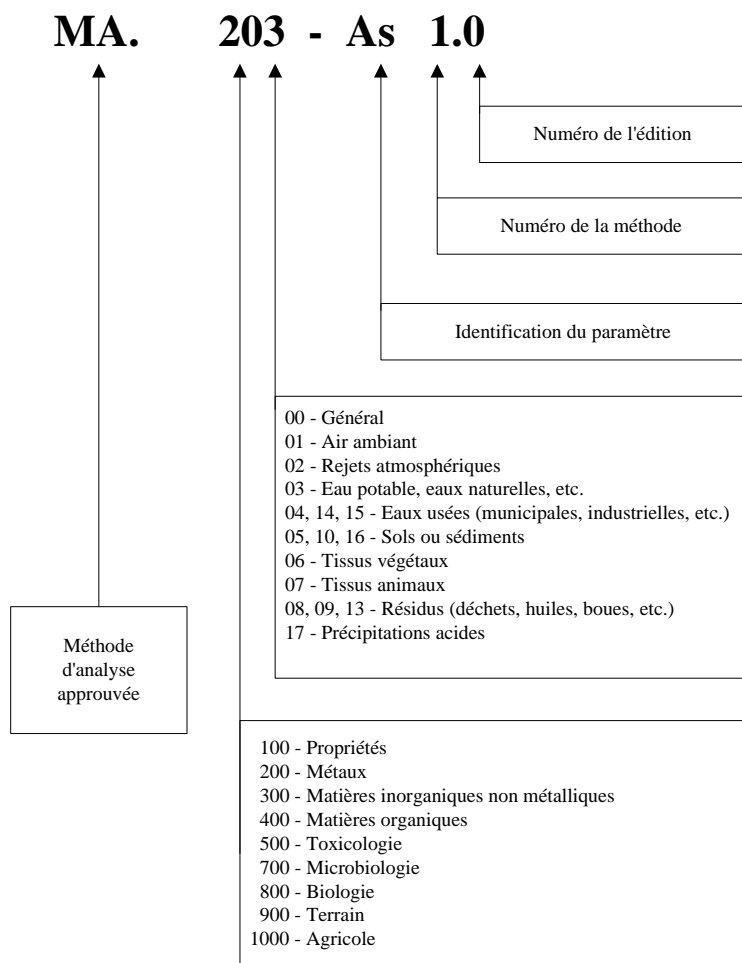


MA. 500 – D.mag 1.0
Édition : 2000-08-22
Révision : 2005-08-23 (4)

Méthode d'analyse
Détermination de la toxicité létale CL_{50} 48h
Daphnia magna

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est identifiée par l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. L'indice peut également être augmenté si une révision entraîne des modifications en profondeur. La date de révision d'une méthode est suivie d'un chiffre indiquant la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Détermination de la toxicité létale CL₅₀ 48h Daphnia magna. MA. 500 – D.mag. 1.0,
Rév. 4, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du
Québec, 2005, 25 p.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 5 |
| 1. DOMAINE D'APPLICATION | 5 |
| 2. PRINCIPE ET THÉORIE | 5 |
| 3. FIABILITÉ | 5 |
| 3.1. Interférence | 6 |
| 3.2. Seuil d'effet de la méthode | 6 |
| 3.3. Fidélité | 6 |
| 4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION | 7 |
| 4.1. Prélèvement | 7 |
| 4.2. Conservation | 7 |
| 5. APPAREILLAGE | 7 |
| 6. RÉACTIFS | 8 |
| 7. ORGANISMES BIOLOGIQUES | 8 |
| 7.1. Espèce et souche | 8 |
| 7.2. Manipulation des daphnies | 9 |
| 8. PROTOCOLE D'ANALYSE | 9 |
| 8.1. Préparation de l'échantillon | 9 |
| 8.2. Eau de dilution | 10 |
| 8.3. Conditions du test | 10 |
| 8.4. Choix des dilutions | 10 |
| PHOTOPÉRIODE : | 11 |
| 8.5. Test préliminaire | 11 |
| 8.6. Test définitif | 11 |
| 8.7. Essai avec toxique de référence | 13 |
| 8.8. Acceptabilité des résultats | 13 |
| 9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS | 14 |
| 9.1. Détermination de la CL ₅₀ 48h | 14 |
| 9.2. Expression des résultats | 14 |
| 10. VOCABULAIRE | 14 |
| 11. BIBLIOGRAPHIE | 15 |
| ANNEXE 1 - Procédure d'élevage des daphnies | 19 |
| ANNEXE 2 - Feuille de travail - létalité - mobilité avec la daphnie | 25 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 - Schéma du montage pour le prélèvement des néonates | 17 |
| Figure 2 -Schéma d'une installation pour le maintien d'un élevage de daphnies | 24 |

INTRODUCTION

La méthode d'analyse utilisant la daphnie (*Daphnia magna*) est employée pour déterminer la toxicité aiguë d'échantillons liquides. La daphnie est un microcrustacé d'eau douce de l'ordre des cladocères et est utilisée pour la détermination de la toxicité des effluents industriels depuis de nombreuses années. Cette espèce est sensible à une large gamme de contaminants et est relativement facile à conserver en laboratoire. Le test consiste à mesurer le pourcentage de mortalité après une période d'exposition de 48 heures.

Le test avec la daphnie est utilisé au Québec pour le suivi de la toxicité des effluents industriels ainsi que pour toute détermination de la toxicité sur des échantillons liquides incluant les lixiviats.

Une étude comparative (CEAEQ, 1997) entre la présente méthode et la méthode Env.Can. SPE 1 RM/14 (Env. Can., 1990; 2000) a démontré que les résultats obtenus avec des échantillons de papetières sont équivalents. Des données plus récentes (non publiées) de tests comparatifs avec un mélange de produits organiques purs ont également démontré l'équivalence des résultats pour les deux méthodes.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détermination de la toxicité dans les échantillons liquides tels les eaux usées industrielles, les eaux municipales ou agricoles, les eaux de lixiviation, les lixiviats de résidus solides, les eaux réceptrices, les substances chimiques solubles dans l'eau ou toutes autres solutions susceptibles de contenir des substances toxiques.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Ce test de toxicité consiste à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause 50 % de mortalité après 48 heures d'exposition (CL_{50} 48h) dans un système statique et dans des conditions contrôlées.

Pour déterminer la CL_{50} 48h, une série de dilutions de l'échantillon est effectuée et le pourcentage de mortalité est déterminé pour chacune des concentrations après 48 heures d'exposition (relation concentration-réponse). Le test inclut la mesure du pourcentage d'immobilité (CE_{50} 48h).

Les réponses mesurées incluent les effets additifs de toutes les composantes chimiques, physiques et biologiques de l'échantillon pouvant affecter le potentiel de survie de l'organisme.

3. FIABILITÉ

Les termes suivants sont définis dans le document DR-12-SCA-03, intitulé « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en toxicologie ».

3.1. INTERFÉRENCE

Un pH, une dureté ou une concentration d'oxygène dissous se situant hors des limites de tolérance de l'espèce peuvent affecter les organismes et rendre impossible le discernement des effets reliés aux substances toxiques présentes dans l'échantillon. Toutefois, le pH est considéré comme faisant partie intégrante de l'échantillon.

Les échantillons fortement colorés peuvent interférer avec la détermination du battement cardiaque. Si cette observation est impossible, l'immobilité est alors l'effet mesuré et est rapportée sous forme de CE₅₀ 48h.

3.2. SEUIL D'EFFET DE LA MÉTHODE

Le seuil d'effet varie en fonction de l'organisme utilisé, de la réponse biologique mesurée et du schéma expérimental (nombre d'organismes par replica, nombre de replica, etc.) et du niveau de signification choisi.

Pour *D. magna*, le seuil d'effet tel que défini pour $\alpha = 0,05$ a été déterminé à 6,5 % de mortalité à partir de 81 données de groupes contrôles. En d'autres termes, les mortalités observées à compter de 10 % sont significatives.

3.3. FIDÉLITÉ

La fidélité de la méthode analytique est déterminée en effectuant de façon régulière des essais avec un toxique de référence.

3.3.1. Répétabilité

La répétabilité d'une série de mesures (n = 31) avec le bichromate de potassium (K₂Cr₂O₇) a été de $\pm 0,011$ mg/l (CL₅₀ 48h moyenne = 0,21 mg Cr/l et l'écart type = 0,03 mg Cr/l).

3.3.2. Reproductibilité

La reproductibilité d'une série de mesures (n = 7) avec le bichromate de potassium (K₂Cr₂O₇) a été de $\pm 0,06$ mg/l (CL₅₀ 48h moyenne = 0,23 mg Cr/l et l'écart type = 0,07 mg Cr/l).

La reproductibilité de 5 séries de mesures (n = 6) avec différents échantillons complexes a été de :

- $\pm 4,79$ % V/V (CL₅₀ 48h moyenne = 16,56; écart type = 4,56)
- $\pm 0,36$ % V/V (CL₅₀ 48h moyenne = 1,23; écart type = 0,34)
- $\pm 5,31$ % V/V (CL₅₀ 48h moyenne = 24,56; écart type = 5,06)
- $\pm 1,60$ % V/V (CL₅₀ 48h moyenne = 17,23; écart type = 1,60)
- $\pm 2,92$ % V/V (CL₅₀ 48h moyenne = 15,54; écart type = 2,78)

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

4.1. PRÉLÈVEMENT

L'échantillon doit être prélevé dans un contenant non toxique (polypropylène ou autre) neuf ou qui a subi un lavage approprié. Le volume minimal d'échantillon est de 500 ml. Le contenant doit être préalablement rincé avec l'échantillon et rempli au maximum.

4.2. CONSERVATION

Aucun agent de conservation ne doit être ajouté. Pendant le transport, l'échantillon doit être conservé à une température se situant entre 1 °C et 8 °C. Au laboratoire, l'échantillon doit être conservé entre 1 °C et 4 °C. Le test devrait commencer le plus rapidement possible après le prélèvement. Le délai maximal de conservation entre le prélèvement et l'analyse est de 5 jours.

5. APPAREILLAGE

Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant organique, inorganique ou biologique. Une procédure de lavage adéquate est de rigueur.

- 5.1. Incubateur, chambre environnementale ou toute autre installation en mesure de fournir la température et l'éclairage appropriés
- 5.2. pH-mètre
- 5.3. Conductivimètre
- 5.4. Oxymètre
- 5.5. Loupe binoculaire
- 5.6. Système de purification d'eau (de type Milli-Q ou autre)
- 5.7. Tubes à essai de 25 ml (16 x 150 mm) munis de capuchons en verre ou en matière plastique
- 5.8. Tamis en nylon avec ouverture de mailles de 315 µm, 560 µm et 1 000 µm ou équivalents

6. RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire.

L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions toxiques de référence est de l'eau ultra-pure de type Milli-Q.

- 6.1. Bichromate de potassium, $K_2Cr_2O_7$ (CAS n° 7778-50-9)
- 6.2. Chlorure de magnésium hexahydraté, $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (CAS n° 7791-18-6)
- 6.3. Chlorure de calcium dihydraté, $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (CAS n° 10035-04-8)
- 6.4. Solution combinée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium pour l'ajustement de la dureté

Dissoudre 249,4 g de $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (ou 187,1 de $CaCl_2$) et 100,3 g de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ (55,8 de $MgCl_2$) dans environ 800 ml d'eau ultra-pure et compléter à 1 000 ml avec de l'eau ultra-pure. Cette solution peut se conserver six mois à 4 °C et à l'obscurité.

Cette solution est utilisée pour augmenter la dureté de l'eau d'élevage (eau déchlorée) et de dilution. Un ml dans 18 l augmente la dureté d'environ 10 mg/l $CaCO_3$.

Pour l'ajustement de la dureté des échantillons, cette solution est diluée 20 X avant usage.

- 6.5. Solution mère de toxique de référence de bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$)

Dissoudre 200 mg de $K_2Cr_2O_7$ dans environ 800 ml d'eau ultra-pure et compléter à 1 000 ml avec de l'eau ultra-pure. Cette solution peut se conserver six mois à 4 °C et à l'obscurité. Cette solution peut éventuellement être conservée au-delà de six mois si une analyse chimique démontre que la concentration est demeurée stable. Si la concentration mesurée est à l'extérieur de $\pm 10 \%$ de la valeur de préparation, la solution est rejetée et une nouvelle est préparée.

7. ORGANISMES BIOLOGIQUES

7.1. ESPÈCE ET SOUCHE

L'organisme utilisé est le microcrustacé *Daphnia magna* Strauss. Le stade néonate (≤ 24 h) est utilisé pour les tests. L'état de santé général de l'élevage et la productivité des organismes doivent être adéquats pour un usage en toxicologie. Un élevage adéquat doit présenter beaucoup de jeunes et peu d'adultes et les femelles devraient avoir au plus 12 jours à la première portée. Le nombre de néonates par portée peut être variable. Cependant, la moyenne devrait se situer à près de 15 pour les femelles âgées de 2 à 5 semaines.

La procédure d'élevage est définie à l'annexe 1.

7.2. MANIPULATION DES DAPHNIES

En tout temps, les daphnies doivent être manipulées avec soin. La technique suivante s'est avérée efficace pour sélectionner la classe d'organismes utilisés pour les tests de toxicité (néonates < 24 h).

- Utiliser un becher de 1 l placé à l'intérieur d'un becher de 2 l. Ces deux bechers sont placés dans un seau et remplis avec de l'eau de l'aquarium, laquelle est siphonnée à travers un tamis de 315 µm d'ouverture de maille (figure 1).
- Sur le becher de 1 l, placer trois tamis selon l'ordre suivant d'ouverture de maille : 1 000 µm sur le dessus, 560 µm au milieu et 315 µm en dessous.
- À l'aide d'un tube plastifié flexible de diamètre interne de 6 à 8 mm, siphonner des daphnies de l'aquarium. Le jet doit être dirigé près du niveau de l'eau des bechers sur les tamis de manière à ce que les daphnies ne soient jamais hors de l'eau. Il est préférable de vider l'aquarium au complet lors de ce prélèvement, de façon à conserver uniquement les femelles adultes.
- Enlever un peu d'eau dans les deux bechers en penchant légèrement ceux-ci dans le seau; enlever le tamis de 1 000 µm et le placer rapidement soit dans l'eau de l'aquarium, soit dans l'eau du seau pour y libérer les daphnies adultes.
- S'assurer qu'il reste un niveau d'eau suffisant dans les deux derniers tamis.
- Prélever une certaine quantité de daphnies dans le tamis de 315 µm au moyen d'une pipette Pasteur coupée et rodée à la flamme afin de favoriser le transfert des daphnies sans les blesser dans le becher de 1 l contenant environ 300 ml d'eau d'élevage.
- Les daphnies retenues sur le tamis de 315 µm (< 24 h) sont utilisées pour les tests de toxicité et sont transférées dans une boîte de Pétri contenant de l'eau de dilution. Les daphnies juvéniles retenues sur le tamis de 560 µm seront utilisées pour initier de nouveaux aquariums d'élevage (annexe 1, figure 2).

8. **PROTCOLE D'ANALYSE**

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en toxicologie », DR-12-SCA-03, sont suivies afin de s'assurer d'une fréquence d'insertion adéquate en ce qui concerne les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité. Tous ces éléments d'assurance et de contrôle de la qualité suivent les mêmes étapes du protocole analytique que les échantillons.

8.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

L'échantillon doit être homogénéisé avant le début du test et la température, le pH, l'oxygène dissous, la conductivité et la dureté doivent être mesurés et notés. Si la dureté est inférieure à

50 mg/l, elle est ajustée à 50 mg/l avec une solution concentrée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium (cf. 6.4). Si la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 40 % de saturation, l'échantillon est préaéré pour une période n'excédant pas 30 minutes à raison de 25 à 50 ml/min/l. Aucune autre modification ne doit être apportée à l'échantillon. Cependant, si le pH est extrême, un test supplémentaire peut être effectué avec l'échantillon à pH ajusté.

8.2. EAU DE DILUTION

L'eau de dilution peut être déchlorée, souterraine ou embouteillée. Cette eau doit avoir une dureté se situant entre 160 et 180 mg/l et un pH entre 6,5 et 8,5 (idéalement entre 7,8 et 8,0). Elle sert à effectuer les dilutions de l'échantillon et à préparer et transférer les organismes de l'aquarium d'élevage dans les contenants utilisés pour les tests.

La dureté de l'eau déchlorée peut être ajustée entre 160 et 180 mg/l CaCO₃ avec la solution concentrée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium (cf. 6.4).

NOTE – *D. magna* est une espèce d'eau dure qui ne se trouve en milieu naturel qu'à des duretés supérieures à 150 mg/l de CaCO₃. À noter que l'EPA (1991) recommande une eau d'élevage se situant entre 160 et 180 mg/l de dureté.

Une eau réceptrice peut être utilisée si les tests sont réalisés dans un contexte différent.

8.3. CONDITIONS DU TEST

Le tableau à la page suivante résume les conditions d'application pour le test de toxicité avec la daphnie.

8.4. CHOIX DES DILUTIONS

Le choix de la gamme de dilution devrait être basé sur le comportement de l'échantillon plutôt que sur un choix préétabli.

L'expérience démontre qu'une gamme préétablie entraîne souvent l'absence de réponse partielle ayant pour conséquence l'impossibilité de déterminer la CL₅₀ avec précision.

Une série de cinq concentrations est généralement utilisée avec un facteur de dilution géométrique. Toutefois, le facteur de 0,5 couramment utilisé amène fréquemment l'absence de mortalité partielle.

Il est souvent préférable de procéder à un test préliminaire afin de choisir la gamme de dilutions appropriée ou d'utiliser plus de cinq concentrations et une gamme de dilutions plus serrée de façon à obtenir des réponses partielles.

Dans un contexte réglementaire, on doit analyser l'effluent non dilué (100 % V/V), soit lors du prétest ou lors du test définitif, de façon à ce que la présence ou l'absence de toxicité dans l'effluent non dilué soit sans équivoque.

| Résumé des conditions pour le test de toxicité <i>Daphnia magna</i> CL ₅₀ 48h | |
|---|---|
| Type de test : | Statique |
| Température : | 20 °C ± 2 °C |
| Intensité de la lumière : | 500 à 1100 lux |
| Oxygène dissous : | 40 à 100 % de saturation |
| Photopériode : | 16 heures de lumière, 8 heures d'obscurité |
| Capacité des récipients : | 25 ml |
| Volume de solution : | 10 ml |
| Âge des daphnies : | ≤ 24 heures (néonates) |
| Nombre de tubes par concentration : | 4 |
| Nombre de daphnies par tube : | 5 |
| Régime alimentaire : | Aucune alimentation |
| Eau de dilution : | Eau déchlorée, souterraine ou embouteillée (pH 6,5 – 8,5; dureté 160 - 180 mg/l CaCO ₃); ou réceptrice selon l'étude (voir sections 6.6 et 8.2) |
| Durée du test : | 48 heures |
| Effet mesuré : | Mortalité et immobilité |
| Expression des résultats : | CL ₅₀ 48h (et CE ₅₀ 48h) |
| Volume d'échantillon requis : | 500 ml |

8.5. TEST PRÉLIMINAIRE

Si le niveau de toxicité de l'échantillon est inconnu, il est utile de procéder à un test préliminaire sur une large gamme de concentrations (100 et 0,01 %) dans le but de déterminer la gamme qui permettra l'obtention de mortalités partielles lors du test définitif.

Le test préliminaire est d'autant plus important lorsque la relation concentration-réponse se manifeste dans un faible écart de concentrations.

De façon à réduire l'effort au minimum, on peut utiliser seulement cinq daphnies par concentration et mesurer l'immobilité après 24 heures plutôt que la mortalité. Toutefois, la mortalité après 48 heures devra être mesurée pour la concentration 100 % V/V.

8.6. TEST DÉFINITIF

Ce test permet de déterminer la CL₅₀ 48h.

- Choisir la gamme de concentrations appropriées.
- Préparer, pour chaque concentration et pour le témoin, quatre tubes à essai de 25 ml en introduisant des volumes croissants de l'échantillon et compléter à 8 ml avec de l'eau de dilution.

- Transférer dans les quatre tubes cinq néonates par tube à l'aide d'une pipette Pasteur coupée et rodée à la flamme. Les néonates sont transférées en prenant soin de minimiser l'apport d'eau de culture et en s'assurant qu'elles ne sont pas piégées par la tension de surface. Remplacer les individus blessés lors des manipulations.
- Pour le témoin, une concentration faible, une concentration moyenne et une concentration élevée, préparer deux autres tubes dans lesquels il n'y aura pas de daphnie; ces tubes serviront pour les mesures physico-chimiques.

NOTE – Pour chaque concentration et pour le témoin, on utilise 20 daphnies. L'utilisation d'un nombre plus élevé d'organismes permet d'obtenir une meilleure précision sur l'estimation de la CL₅₀. De même, la répartition des daphnies dans quatre tubes facilite l'observation des organismes.

- La charge maximale d'organismes vivants est de 0,65 g/l de solution. Une détermination de la charge réelle a démontré que ce facteur n'est pas critique, même avec cinq néonates par 10 ml.

NOTE – La charge s'exprime en g/l de poids vivants et des restrictions y sont appliquées pour éviter la déplétion en oxygène dissous, l'accumulation et l'intoxication par les déchets métaboliques ainsi que le stress causé par une densité de population trop élevée. Selon l'EPA (1991), la charge à respecter pour un test statique à 20 °C est de 0,65 g/l.

Une étude réalisée dans notre laboratoire sur trois groupes de 100 néonates a démontré que le poids vivant moyen d'une néonate est de 226 µg (écart type = 19 µg).

À partir de ce poids moyen, nous avons déterminé la charge à 0,11 g/l alors que le critère est de 0,65 g/l. Le critère de charge est donc largement respecté. L'expérience démontre que ce facteur est beaucoup plus limitant pour le test de létalité avec la truite arc-en-ciel dont la charge est fréquemment à une valeur près du niveau recommandé, ce qui n'est jamais le cas pour le test avec daphnie.

Les méthodes ISO et AFNOR (1974) recommandent une densité de chargement équivalente au présent protocole, soit cinq daphnies par 10 ml, et la méthode EPA recommande une densité de cinq daphnies par 25 ml.

- Pour chaque tube à essai, compléter le volume de liquide à 10 ml avec de l'eau de dilution.
- Mettre un bouchon non hermétique. La présence de bouchons permet de limiter la perte de substances volatiles.
- Pour les trois concentrations et le témoin, mesurer le pH et l'oxygène dissous dans le cinquième et le sixième tube à essai n'ayant pas reçu de daphnies. Ces tubes pourront par la suite être éliminés. Mesurer également la température dans le témoin et dans une concentration faible, moyenne et élevée.
- Incuber pendant 48 heures à 20 °C ± 2 °C à une intensité lumineuse entre 500 et 1100 lux.

- Après 48 heures d’incubation, dénombrer les daphnies immobiles et mortes. La mortalité est déterminée par l’absence de mouvement des appendices et l’absence de battements cardiaques.
- Immédiatement après le dénombrement, mesurer la concentration en oxygène dissous, le pH et la température dans une concentration faible, une moyenne et une élevée ainsi que dans le témoin.

Un exemple de feuille de travail est fourni à l’annexe 2 et peut être utilisé pour colliger les données.

8.7. ESSAI AVEC TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

Le toxique de référence recommandé est le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) (cf. 6.5). D’autres produits de référence peuvent être utilisés.

Des essais avec toxiques de référence doivent être effectués au moins deux fois par mois ou une fois par 10 analyses, si le laboratoire effectue plus de 10 analyses par deux semaines. Les résultats issus de ces essais sont compilés sous forme de diagramme de contrôle.

Des limites inférieures de contrôle (- 2S et - 3S) et supérieures (+ 2S et + 3S) sont calculées et les résultats situés à l’extérieur de ces limites indiquent des problèmes potentiels dans le système d’essai. Au maximum, un essai sur 20 devrait se situer à l’extérieur des limites de $\pm 2S$ (seuil de probabilité de 95 %).

8.8. ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats du test sont acceptables si :

- le pourcentage de mortalité dans les groupes contrôles est égal ou inférieur à 5 %;
- le pourcentage de comportement atypique dans les groupes contrôles est égal ou inférieur à 5 %;
- les autres conditions du test (température, éclairage, etc.) ont été respectées;
- les résultats du test avec toxique de référence effectué selon la fréquence requise se situent à l’intérieur des limites de $\pm 2S$; tous les résultats se situant à l’extérieur des limites de $\pm 3S$ doivent être rejetés. Si le résultat se situe entre les limites de - 2S et - 3S ou + 2S et + 3S, il pourrait, selon le cas, être acceptable. Une note doit toutefois être inscrite au rapport d’analyse afin de préciser la situation.

9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. DÉTERMINATION DE LA CL₅₀ 48H

La CL₅₀ 48h (ou CE₅₀) et son intervalle de confiance à 95 % sont déterminés à l'aide de la méthode probit, de la moyenne mobile, Spearman-Kärber ou binomiale. Toutefois, le résultat calculé par la méthode binomiale ne devrait être utilisé que dans les cas où aucune mortalité partielle n'a été observée, même après l'usage d'une gamme de dilutions serrée.

La CL₅₀ est la mesure principale du test. Il arrive cependant que la coloration de l'échantillon rende la carapace des daphnies opaque et que la détermination des battements cardiaques à la loupe binoculaire soit impossible. Dans ces cas, la CE₅₀ est utilisée en remplacement de la CL₅₀.

9.2. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats et leur intervalle de confiance à 95 % doivent être exprimés comme suit :

- en pourcentage (% V/V);
- pour les produits purs le résultat est exprimé en P/V.

10. VOCABULAIRE

CE₅₀ : concentration efficace qui inhibe 50 % d'une réponse biologique de type binaire (tout ou rien : mobile-immobile).

CL₅₀ : concentration d'une substance qui cause 50 % de mortalité dans la population testée.

Contrôle : le groupe contrôle doit reproduire toutes les conditions expérimentales, à l'exception de la présence de l'échantillon à tester. Le contrôle est utilisé pour établir l'absence d'effet mesurable reliée aux conditions de base du test de toxicité (ex. : qualité de l'eau de dilution, manipulation et état de santé des organismes soumis au test de toxicité, etc.).

Fidélité : à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime pour les tests de toxicité sous forme de répétabilité ou de reproductibilité.

Immobilité : inaptitude à la nage pendant les 15 secondes qui suivent une légère agitation de la solution d'essai.

Néonates : daphnie au premier stade larvaire et âgée de 24 heures ou moins.

Répétabilité : à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins un des éléments suivants est différent : l'analyste, le jour et le système d'essai.

Reproductibilité : à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, système d'essai différent, jour différent ou même jour.

Seuil d'effet : niveau d'effet minimal qui peut être quantifié lors d'un test de toxicité avec une fiabilité définie. Le seuil d'effet est défini comme étant la valeur de t de la table de Student ($\alpha = 0,05$) multipliée par l'écart type de n mesures sur des groupes témoins. Le seuil d'effet correspond à la limite de détection du test et s'exprime en pourcentage d'effet comme suit :

$$\frac{St \times 100}{Moy.}$$

Test de toxicité : procédure par laquelle une réponse biologique est utilisée pour détecter et quantifier la toxicité d'une substance, d'un groupe de substances ou de facteurs environnementaux.

Toxicité : capacité propre d'une substance de provoquer des effets nocifs, ou de troubler ou d'interrompre les fonctions vitales d'un organisme.

Toxique de référence : produit chimique utilisé pour déterminer la précision des essais et les variations de sensibilité des organismes utilisés.

11. BIBLIOGRAPHIE

AFNOR, Essais des eaux : détermination de l'inhibition de la mobilité *Daphnia magna* Strauss (Crustacé, Cladocère), Association française de normalisation, T 90-301, 1974.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. MA. 500 – P.sub. 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Édition courante.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en toxicologie, Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse environnementale, DR-12-SCA-03, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Comparaison des protocoles provincial et fédéral pour le test de létalité avec la daphnie, Ministère de l'Environnement du Québec, Septembre 1997.

ENVIRONNEMENT CANADA, 1990a, Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur *Daphnia spp.*, Série de protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/11, Juillet 1990.

ENVIRONNEMENT CANADA, 1990b, Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*. Rapport SPE 1 RM/14 avec modifications apportées en mai 1996. Conservation et protection, Ottawa, Ontario, 18 p.

- ENVIRONNEMENT CANADA, 1990c, Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence, Série de protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/12, Août 1990.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 2000, Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*. Rapport SPE 1 RM/14, Centre de technologie environnementale, Ottawa, Ontario, 23 p.
- EPA, Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms, EPA-600/4-90-027, C.I. Weber (Ed.), Cincinnati. 293 p., 1991.
- ISO, Qualité de l'eau – Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (*Cladocera, crustacea*) – Essai de toxicité aiguë, ISO-6341, 1996.
- PENNAK, R.W., Fresh-water invertebrates of the United States. 3th edition, Protozoa to Mollusca, John-Wiley and Sons, New York. N.Y., 1989.
- POIRIER, D.G., G.F. WESTLAKE et S.G. ABERNETHY, *Daphnia magna* acute lethality toxicity test protocol, Ontario Ministry of the Environment, 1988.
- USEPA, Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 4th edition, EPA-600/4-90-027, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 1991.

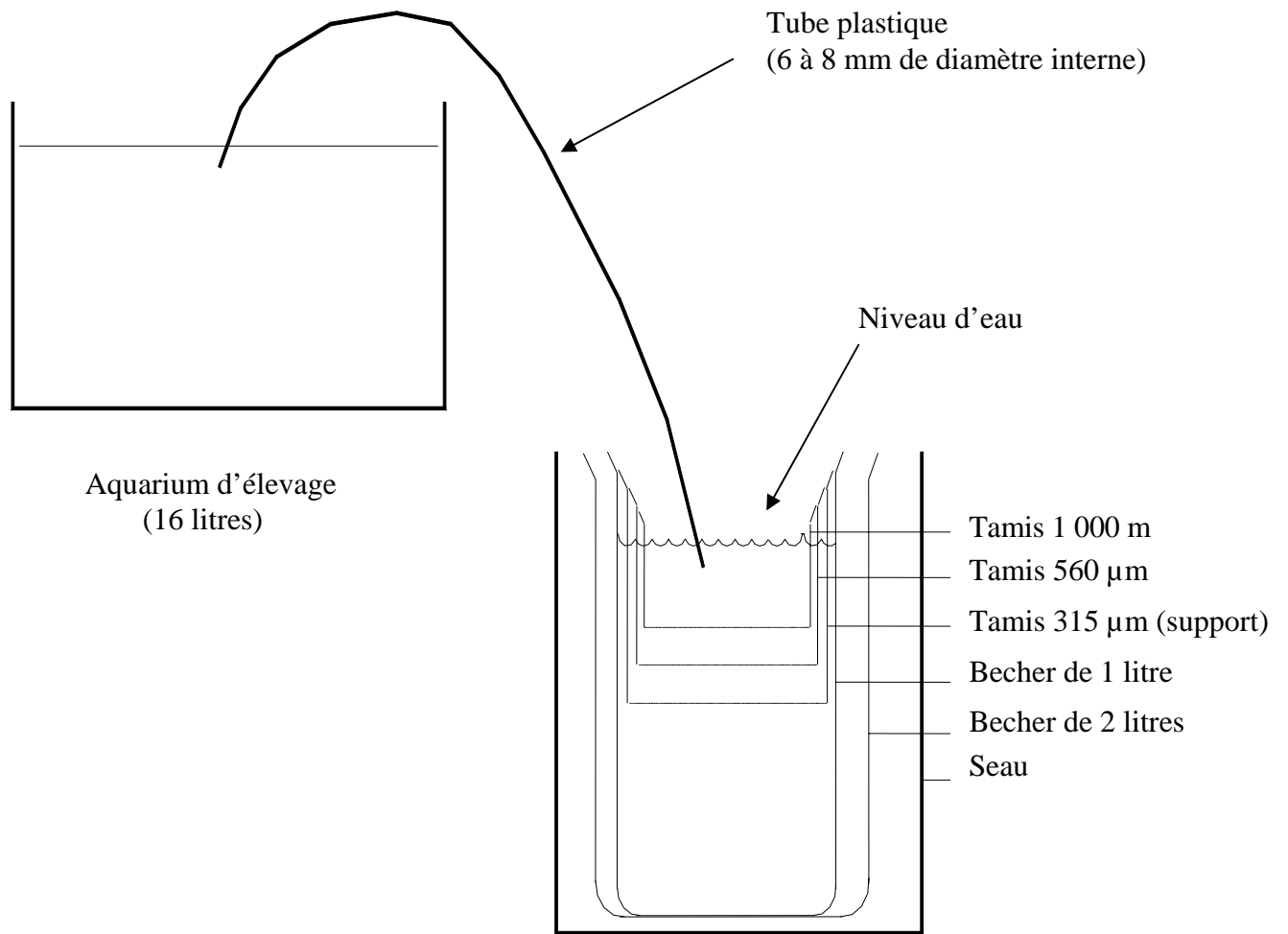


Figure 1 - Schéma du montage pour le prélèvement des néonates

ANNEXE 1 - PROCÉDURE D'ÉLEVAGE DES DAPHNIES

Plusieurs protocoles d'élevage sont répertoriés dans la littérature (AFNOR, 1974, EPA, 1991; Poirier *et al.*, 1988, Env. Can. 1990a). La méthode en vigueur au CEAEQ utilise de l'eau déchlorée comme eau d'élevage et une culture concentrée d'algues vertes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) comme unique source d'alimentation. Une séquence contrôlée de renouvellement des aquariums permet d'obtenir une production abondante d'organismes issus de femelles âgées d'au maximum trois semaines. L'âge moyen des femelles est crucial puisque la fécondité diminue rapidement chez les génitrices de plus de trois semaines d'âge. Cette méthode s'est avérée simple, efficace et fiable.

La qualité et la quantité de nourriture, un suivi sévère de la densité et de la taille des individus de même que de la fréquence des renouvellements de l'eau d'élevage sont des facteurs déterminants de succès. Dans certains cas, il peut y avoir apparition d'éphyppies dans les aquariums, ce qui est indicateur d'un mauvais état de santé des organismes. Ces aquariums devront être éliminés de façon à ne pas altérer la qualité de l'élevage.

CONDITIONS D'ÉLEVAGE

Les élevages sont réalisés dans des aquariums de 16 l contenant un volume d'eau de 10 l et maintenus à température adéquate en les disposant dans une chambre environnementale à 20 °C. Un bain thermostaté peut également être utilisé pour le maintien de la température.

La température des élevages est maintenue à 20 °C ± 2 °C et la photopériode à 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

L'éclairage est obtenu à l'aide de tubes fluorescents Cool White et l'intensité lumineuse est maintenue entre 500 et 1 100 lux à la surface de l'eau.

La dureté de l'eau d'élevage est maintenue entre 160 et 180 mg/l de CaCO₃. Elle doit se situer en tout temps à une dureté de ± 20 % des valeurs exigées pour l'eau de dilution. Si l'eau provient du réseau d'aqueduc, elle doit être déchlorée par filtration sur charbon activé suivie d'une forte aération pendant 24 heures ou par un vieillissement de trois à sept jours avec aération constante par barbotage à la température de la pièce.

L'oxygène dissous devrait être maintenu à une valeur près de la saturation. Elle doit au moins être égale ou supérieure à 60 % de saturation en tout temps.

L'élevage peut bien fonctionner à un pH se situant entre 6,5 et 8,5. Toutefois, il doit se situer à une valeur de ± 20 % des valeurs exigées pour l'eau de dilution.

Des contrôles physico-chimiques doivent être effectués sur l'eau des élevages une fois par jour pour la température, deux fois par semaine pour l'oxygène dissous et le pH ainsi qu'une fois par semaine pour la dureté, si elle n'est pas ajustée préalablement (en accord avec les exigences du DR-12-SCA-03 (*cf.* 11)). Si l'eau d'approvisionnement est une eau municipale déchlorée ou si elle provient d'une autre source, des contrôles physico-chimiques doivent être effectués sur un ensemble de paramètres, selon les fréquences précisées dans le document.

NOUVEL ÉLEVAGE

L'élevage est issu d'une seule femelle se reproduisant par parthénogénèse.

La procédure utilisée pour initier un nouvel élevage est la suivante :

- prendre 10 bechers de 250 ml en verre et introduire 200 ml d'eau d'élevage;
- à l'aide d'une pipette Pasteur coupée et rodée (ou d'un compte-gouttes), transférer dans chacun des 10 bechers une seule néonate issue d'un élevage en voie de reproduction;
- ajouter une culture concentrée d'algues pour atteindre environ 40 000 cell./ml comme source de nourriture dans chacun des bechers;
- incuber à $20\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ sous un cycle de lumière-obscurité 16 h - 8 h;
- renouveler quotidiennement les 2/3 du volume d'eau et ajouter de la culture concentrée d'algues comme source de nourriture;
- dès la première ponte, sélectionner le becher ayant la meilleure production et éliminer la première génération de néonates. Conserver la deuxième génération et retirer la femelle adulte;
- transférer les daphnies juvéniles dans un aquarium de 16 l contenant 6 l d'eau d'élevage. Ajouter 100 ml de culture concentrée d'algues;
- après environ une semaine ou dès la première ponte, éliminer les néonates de la première génération en sélectionnant ces dernières à l'aide des tamis de 1 000, 560 et 315 μm (figure 1). Seules les daphnies adultes retenues sur le tamis de 1 000 μm sont conservées. Ramener le volume à 10 l et ajouter 100 ml de culture concentrée d'algues.

MAINTIEN D'UN ÉLEVAGE FONCTIONNEL

Les daphnies de la deuxième génération retenues sur le tamis de 560 μm à partir de l'élevage initial seront utilisées pour l'ensemencement de deux aquariums qui seront les premiers éléments d'une série constituant un élevage fonctionnel et amplement productif pour la réalisation d'essais sur une base régulière.

- Introduire 10 l d'eau d'élevage dans chacun des deux aquariums de 16 l.
- Ajouter environ 100 ml de culture concentrée d'algues (20 à 30 x 10⁶ cell./ml) dans chaque aquarium comme source de nourriture jusqu'à l'obtention d'une coloration légèrement verdâtre.
- Introduire 20 à 30 daphnies juvéniles/l de deux jours d'âge.
- Maintenir les aquariums dans une chambre environnementale ou dans une installation qui permet de respecter les conditions d'élevage précisées plus haut.

- Aérer délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur introduite environ au 3/4 de la profondeur de l'aquarium; de l'air comprimé filtré est utilisé.

La culture concentrée d'algues constitue l'unique source de nourriture et la quantité ne doit pas excéder la consommation quotidienne de façon à éviter une prolifération des algues, ce qui serait néfaste à la productivité. Il est suggéré d'utiliser environ 50 ml de culture concentrée d'algues par aquarium matin et soir. Après sept jours, compter et conserver 250 daphnies adultes, renouveler 1/3 du volume de 10 l et ajouter jusqu'à 200 ml de concentré d'algues matin et soir.

Il est recommandé de sacrifier la première génération de jeunes daphnies.

Les néonates produites par les femelles de 10 à 24 jours (aquariums 3, 4, 5 et 6; figure 2) seront utilisées pour les tests de toxicité.

Les élevages de plus d'une semaine (aquariums 3 à 6) sont alimentés avec environ 200 ml de culture concentrée d'algues, matin et soir.

Un élevage constitué de six aquariums, dont deux sont renouvelés (élimination des aquariums 5 et 6) chaque semaine selon la procédure décrite ci-dessus, permet une production très abondante de néonates.

Pour une production optimale et une bonne stabilité des élevages, les organismes doivent être alimentés sept jours sur sept. Cependant, ils peuvent tolérer l'absence de nourriture pendant deux jours consécutifs. Dans ce cas, les organismes ne sont pas utilisés le troisième jour pour la réalisation d'essais définitifs. Il est important que les organismes ne soient pas privés de nourriture plus de deux jours consécutifs.

Les élevages doivent être localisés dans des espaces séparés de ceux utilisés pour les essais. L'air comprimé utilisé pour l'oxygénation des aquariums doit être filtré pour éviter l'introduction de contaminants provenant des pompes lubrifiées. Un filtre de type Millipak et un piège à eau sont recommandés pour pallier à ce problème.

La productivité de l'élevage est évaluée de façon continue en isolant des daphnies dans des contenants de 30 ml munis d'un couvercle en tamis permettant à l'eau de l'aquarium de circuler librement dans le contenant. Une daphnie de neuf jours est insérée dans plusieurs de ces contenants et ces derniers sont déposés dans chacun des aquariums de production pour une durée de deux semaines (généralement quatre portées). Chaque jour, les néonates sont dénombrées et retirées du contenant. Lors de cette opération, quelques gouttes de culture d'algues sont ajoutées dans les contenants étant donné que les daphnies captives ont un accès plus limité aux algues distribuées dans l'aquarium.

Cette procédure permet de déterminer l'âge de la femelle à la première portée ainsi que le nombre moyen de jeunes par portée. Les caractéristiques d'un élevage en santé sont les suivantes :

- absence d'éphippie;

- présence de femelles qui ont une première portée au plus tard à 12 jours;
- nombre moyen de néonates par femelle d'environ 15 pour les daphnies âgées de 10 à 24 jours (aquariums 3 à 6);
- absence de mortalité chez les femelles.

CULTURE CONCENTRÉE D'ALGUES

Milieu de culture

Les cultures de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* sont maintenues dans un milieu Bristol.

Ajouter à 900 ml d'eau distillée ou déminéralisée les quantités suivantes de solutions mères :

A) 5 ml de chacune des solutions mères de macroéléments suivantes :

| Composés | Concentration |
|---------------------------------------|---------------|
| NaNO ₃ | 25,00 g/l |
| CaCl ₂ •2 H ₂ O | 2,50 g/l |
| MgSO ₄ •7 H ₂ O | 7,50 g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 7,50 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 17,50 g/l |
| NaCl | 2,50 g/l |

B) 0,5 ml de chacune des solutions mères suivantes :

| Composés | Concentration |
|---|---------------|
| EDTA-Na ₂ | 50,00 g/l |
| KOH | 31,00 g/l |
| FeCl ₃ •6 H ₂ O + 1 ml H ₂ SO ₄ | 4,84 g/l |
| H ₃ BO ₃ | 11,42 g/l |

C) 0,5 ml de la solution de microéléments suivante :

| Composés | Concentration |
|---|---------------|
| MnCl ₂ •4 H ₂ O | 1,44 g/l |
| ZnSO ₄ •7 H ₂ O | 8,82 g/l |
| MoO ₃ | 0,71 g/l |
| CuSO ₄ •5 H ₂ O | 1,57 g/l |
| Co(NO ₃) ₂ •6 H ₂ O | 0,49 g/l |

- Jauger à 1 000 ml avec de l'eau distillée ou déminéralisée.

- Le pH de ce milieu de culture est d'environ 7,5.

Le milieu de culture reconstitué est autoclavé (121 °C, 1,06 - 1,20 kg/cm²) 10 min/l ou un minimum de 30 minutes pour les volumes inférieurs à 3 l. Laisser refroidir. Ces solutions peuvent se conserver six mois à 4 °C et à l'obscurité.

CULTURE DES ALGUES

- Inoculer un volume approprié (1 - 3 l) de milieu de culture, de façon à obtenir une densité cellulaire de 10 000 cell/ml. La méthode de conservation et de culture de la souche pure et axénique de *Pseudokirchneriella subcapitata* est précisée dans le document MA. 500 – P.sub 1.0 (Édition courante).
- Incuber à 24 °C ± 2 °C pour une durée maximum de sept jours avec un barbotage d'air continu pour éviter une déplétion en CO₂ et une sédimentation des algues. Des « pièges à eau » ou des filtres à air sont recommandés pour réduire les risques de contamination pour les contaminants issus des pompes lubrifiées. L'éclairage est continu à une intensité de 4 300 ± 10 %.
- La densité cellulaire de la culture concentrée d'algues utilisée pour l'alimentation des daphnies est approximativement de 20 x 10⁶ cell/ml.

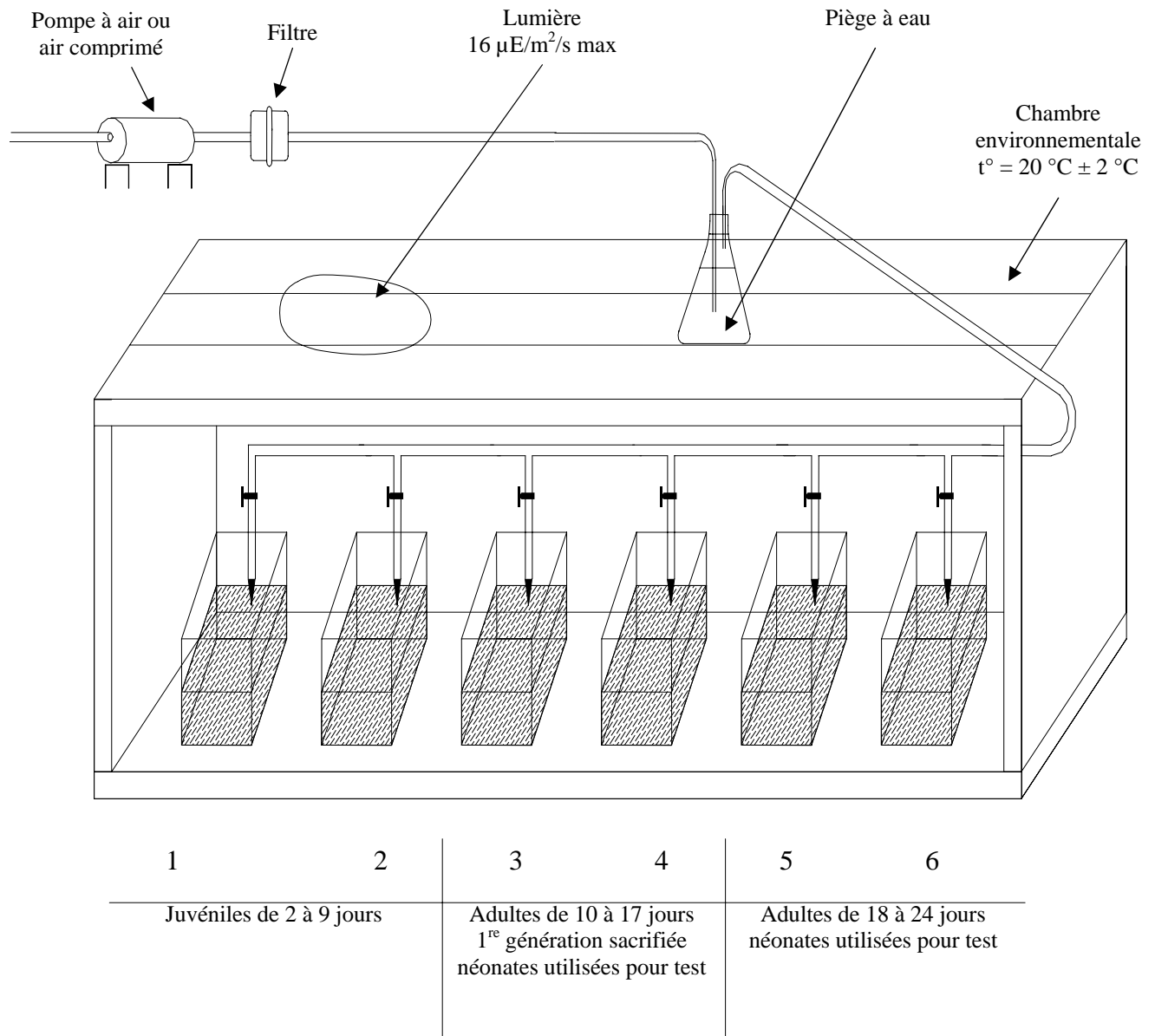


Figure 2 -Schéma d'une installation pour le maintien d'un élevage de daphnies

