

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT

ET DE LA LUTTE CONTRE

LES CHANGEMENTS CLIMATIQUES

MA. 500 – D.mag 1.1

Détermination de la toxicité : létalité
(CL50 48h) chez la daphnie *Daphnia magna*

2021-09-21 (révision 3)

Coordination et rédaction

Cette publication a été réalisée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) du ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MELCC). Elle a été produite par la Direction des communications du MELCC.

Renseignements

Pour tout renseignement complémentaire :

le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques

Complexe scientifique

2700, rue Einstein, bureau E.2.220

Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301

Télécopieur : 418 528-1091

Courriel : ceaeq@environnement.gouv.qc.ca

Pour obtenir un exemplaire du document :

Visitez notre site Web : www.environnement.gouv.qc.ca

Section « CEAEQ », ou au www.ceaeq.gouv.qc.ca

Référence à citer

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Détermination de la toxicité : létalité (CL₅₀ 48h) chez la daphnie *Daphnia magna*. MA. 500 – D.mag. 1.1, Rév. 3, Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, 2021, 18 p.

<https://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA500Dmag11.pdf>

(page consultée le jour/mois/année).

Table des matières

1. Domaine d'application	1
2. Principe et théorie	1
3. Interférence	1
4. Conservation	2
5. Matériel et appareillage	2
6. Réactifs et solutions	3
6.1 Réactifs	3
6.2 Eau d'élevage et de dilution	3
6.3 Solutions	3
6.4 Toxique de référence	4
7. Organismes biologiques	4
7.1 Espèces et souches	4
7.2 Méthode d'élevage	4
7.3 Manipulation des daphnies	5
8. Protocole d'analyse	6
8.1 Préparation des échantillons	6
8.2 Conditions d'essai	6
8.3 Sélection des concentrations d'essai	7
8.4 Réalisation de l'essai	7
8.5 Essai avec toxique de référence	8
9. Calcul et expression des résultats	9
9.1 Détermination de la CL ₅₀ 48h et de la CE ₅₀ 48h	9
9.2 Expression des résultats	9
10. Critères d'acceptabilité	9
Bibliographie	11
Annexe I – Procédure d'élevage de <i>Daphnia magna</i>	12

1. Domaine d'application

Cette méthode utilisant la daphnie *Daphnia magna* sert à la détermination de la toxicité d'échantillons liquides tels que 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 toute autre solution susceptible de contenir des substances toxiques¹.

2. Principe et théorie

L'essai consiste à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause 50 % de mortalité après 48 heures d'exposition (CL₅₀ 48h). Pour ce faire, une série de dilutions de l'échantillon est effectuée et le pourcentage de mortalité est déterminé pour chacune des concentrations de l'échantillon après 48 heures d'exposition (relation concentration-réponse). L'essai inclut également la mesure de la concentration qui cause 50 % d'immobilité après 48 heures d'exposition (CE₅₀ 48h).

L'incubation est effectuée dans un système statique (sans renouvellement)² et dans des conditions contrôlées de température et de luminosité.

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. Interférence

Un pH, une dureté ou une concentration d'oxygène dissous se situant hors des limites de tolérance de l'espèce peuvent rendre impossible le discernement des effets reliés aux substances toxiques présentes dans l'échantillon en affectant les organismes exposés. Un ajustement de la dureté et une aération de l'échantillon peuvent être nécessaires et sont alors effectués avant le départ de l'essai. Toutefois, le pH est considéré comme faisant partie intégrante de l'échantillon. Selon les besoins de l'étude, un ajustement du pH de l'échantillon peut être justifiable.

Les échantillons fortement colorés ou turbides peuvent interférer avec la détermination de l'immobilité et de la mortalité. Il est alors recommandé d'utiliser un fond opaque blanc et une source lumineuse pour faciliter la visualisation des organismes. L'utilisation d'une loupe binoculaire et le transfert des organismes dans un plat de Petri à la fin de l'essai sont aussi des options pour faciliter cette tâche.

Il peut arriver que des organismes vivants (daphnies, copépodes, autres cladocères, etc.) se retrouvent dans l'échantillon. Les organismes doivent être retirés avant le départ de l'essai pour éviter toute confusion. Il est préférable de les retirer manuellement avec une pipette ou, si le nombre est élevé, d'utiliser un tamis

¹ Une étude comparative (CEAEQ, 1997) entre la présente méthode et la méthode d'Environnement Canada SPE 1 RM/14 (2^e édition, 2000) a démontré que les résultats obtenus avec des échantillons de papetières sont équivalents. Des données plus récentes obtenues lors d'essais comparatifs avec un mélange de produits organiques purs ont également démontré l'équivalence des résultats pour les deux méthodes.

² Les caractères en rouge représentent les parties de texte qui ont été modifiées ou ajoutées depuis la version précédente du document.

correspondant à la taille des organismes. Dans tous les cas, la filtration est à éviter pour ne pas affecter la nature de l'échantillon.

4. Conservation

Les échantillons doivent être prélevés et conservés selon les recommandations décrites aux Guides d'échantillonnage à des fins d'analyse environnementale du site internet du CEAeq.

L'échantillon doit être prélevé dans un contenant de polypropylène (ou autre) non toxique, neuf ou ayant subi un lavage approprié. Un échantillon représentatif de 500 ml est requis pour réaliser l'analyse. Le contenant doit être préalablement rincé avec l'échantillon et rempli au maximum.

Pendant leur transport, les échantillons doivent être conservés à l'obscurité et refroidis au moyen d'agents réfrigérants tout en étant maintenus au-dessus du point de congélation. Au laboratoire, les échantillons doivent être conservés au réfrigérateur, à environ 4 °C, jusqu'à leur utilisation. Les échantillons doivent être acheminés au laboratoire dans le plus court délai possible. L'essai devrait commencer le plus rapidement possible après le prélèvement.

Les échantillons sont conservés selon les modalités suivantes:

Nature de l'échantillon	Conditions de conservation	Délai de conservation
Eau usée, eau de lixiviation, lixiviat de résidus solides, eau réceptrice	environ 4 °C, obscurité, aucun agent de conservation	5 jours

5. Matériel et appareillage

Les marques de commerce qui apparaissent ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Un modèle équivalent d'un autre fabricant peut également être utilisé.

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant et une procédure de lavage adéquate est de rigueur.

- Incubateur, chambre environnementale ou toute autre installation en mesure de fournir la température et l'éclairage appropriés;
- Loupe binoculaire;
- Tubes à essai de 25 ml (16 x 150 mm) munis de capuchons **non étanches** en verre ou en plastique
- **Système d'aération calibré permettant une aération entre 25 à 50 ml/min·l;**
- Tamis en nylon avec ouverture de mailles d'environ 250 µm, 590 µm et 1 000 µm ou **système équivalent permettant la séparation adéquate des néonates et des adultes.**

6. Réactifs et solutions

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

L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions est de l'eau ultrapure.

6.1 Réactifs

Nom	Formule chimique	Cas no
Acide chlorhydrique	HCl	7647-01-0
Chlorure de magnésium hexahydraté	MgCl ₂ •6 H ₂ O	7791-18-6
Chlorure de calcium dihydraté	CaCl ₂ •2 H ₂ O	10035-04-8
Dichromate de potassium	K ₂ Cr ₂ O ₇	7778-50-9
Hydroxyde de sodium	NaOH	1310-73-2, 497-19-8

6.2 Eau d'élevage et de dilution

L'eau d'élevage et de dilution peut être déchlorée, souterraine, embouteillée **ou reconstituée**. Cette eau sert à la fois pour l'élevage et pour effectuer les dilutions de l'échantillon lors de l'essai. Elle doit avoir une dureté se situant entre 160 et 180 mg/l de carbonate de calcium (CaCO₃), un pH entre 6,5 et 8,5 (recommandé entre 7,0 et 8,0) et une teneur en oxygène dissous entre 90 % et 100 % de saturation à une température de 20,0 ± 2,0°C. **Peu importe la source utilisée, l'eau d'élevage et de dilution doit posséder des caractéristiques chimiques adéquates pour le maintien d'organismes vivants. Pour l'eau reconstituée, elle peut être préparée à partir de toute formule éprouvée permettant de respecter l'ensemble des critères de santé de l'élevage et les valeurs cibles de dureté, pH et oxygène dissous mentionnées précédemment. La recette de l'eau reconstituée ainsi que sa méthode de préparation et de stockage doivent être documentées.**

La dureté de l'eau **doit** être ajustée entre 160 et 180 mg/l CaCO₃ avec **une** solution concentrée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium (cf. 6.3.1).

Une eau réceptrice peut également être utilisée lorsque le besoin de l'étude le requiert.

6.3 Solutions

6.3.1 Solution pour l'ajustement de la dureté

Une solution concentrée de chlorure de calcium (CaCl₂•2 H₂O) et de chlorure de magnésium (MgCl₂•6 H₂O) est utilisée pour augmenter la dureté de l'eau d'élevage, de l'eau de dilution et de l'échantillon, au besoin.

- Dans environ 800 ml d'eau ultrapure, dissoudre 249,4 g de CaCl₂•2 H₂O (ou 187,1 de CaCl₂) et 100,3 g de MgCl₂•6 H₂O (ou 55,8 de MgCl₂). Le volume doit ensuite être complété à 1 000 ml avec de l'eau ultrapure.

Un volume d'un millilitre de cette solution ajouté à un volume total de 18 litres permet d'augmenter la dureté d'environ 10 mg/l de CaCO_3 . Dans le cas où les volumes à ajuster sont plus petits, il est nécessaire de diluer cette solution de 20X avant son usage.

Cette solution se conserve six mois à environ 4,0 °C et à l'obscurité.

6.3.2 Solution pour l'ajustement du pH

Un ajustement du pH de l'eau d'élevage, de l'eau de dilution ou de l'échantillon peut être effectué avec un ajout de quelques millilitres de solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl) préparés à des concentrations de 0,1 M ou 1 M.

6.4 Toxique de référence

Différents produits peuvent être utilisés comme toxique de référence pour l'essai de létalité chez la daphnie. Le principal en usage, et celui qui est recommandé dans le cadre de cette méthode, est le dichromate de potassium.

7. Organismes biologiques

7.1 Espèces et souches

La daphnie (*Daphnia magna*) est un microcrustacé (4 à 6 mm) présent dans de nombreux milieux d'eau douce. Son cycle de vie court, la facilité de son élevage en laboratoire ainsi que son mode de reproduction contribuent à son intérêt pour les essais de toxicité. En condition favorable, la daphnie se reproduit de façon asexuée (parthénogenèse) ce qui permet la production d'organismes clones.

Le stade utilisé pour les essais est le stade néonate, c'est-à-dire les daphnies au premier stade larvaire (âgées de 24 h ou moins). Les néonates doivent provenir d'un élevage dont l'état de santé général et la productivité des organismes sont adéquats pour un usage en toxicologie. L'élevage doit être composé de beaucoup de néonates et de peu d'adultes. Les femelles doivent avoir au plus 12 jours à leur première ponte. Le nombre de néonates par ponte peut être variable; cependant, la moyenne doit se situer à 15 ou plus, pour les femelles âgées entre 12 et 37 jours. Il n'est pas recommandé d'utiliser, pour les essais, les néonates de la première couvée ou des couvées de femelles sénescents. L'utilisation des néonates provenant des femelles âgées de 12 à 37 jours permet de cibler les couvées « intermédiaires ».

Les génitrices d'où proviennent les néonates utilisées pour l'essai doivent présenter 15 % ou moins de mortalité dans les 7 jours précédant l'essai. En tout temps, il doit y avoir absence d'éphippies et de mâles dans les récipients d'où proviennent les néonates utilisés.

Lorsque des organismes sont obtenus de l'externe, un certificat validant l'identification taxonomique et la source de l'espèce doit être disponible. De plus, un essai avec le toxique de référence doit avoir été complété et réussi préalablement à l'utilisation des organismes pour un essai avec un échantillon.

7.2 Méthode d'élevage

Les conditions d'élevage prescrites par la présente méthode sont exposées dans le tableau 1. Les élevages doivent être situés dans des espaces séparés de ceux qui sont utilisés pour les essais.

Lors de l'élevage des daphnies, il peut y avoir apparition de mâles ou d'éphippies, ce qui est indicateur d'un mauvais état de santé des organismes ou de perturbations dans leur environnement. Les récipients ainsi « contaminés » doivent être éliminés immédiatement et les néonates ne peuvent pas servir aux départs d'essai ou au démarrage de nouvelles enceintes d'élevage. Pour une production optimale et une bonne stabilité des élevages, les organismes doivent être alimentés tous les jours. Cependant, ils peuvent tolérer l'absence de nourriture pendant deux jours consécutifs au maximum. Dans ce cas, les organismes ne peuvent pas être utilisés le troisième jour pour la réalisation d'essais définitifs.

Une procédure d'élevage éprouvée est suggérée dans l'annexe I.

Tableau 1. Résumé des conditions d'élevage

Espèce :	<i>Daphnia magna</i>
Source :	Fournisseur reconnu d'organismes vivants ou laboratoire d'écotoxicologie, avec confirmation taxinomique
Eau :	Eau déchlorée, souterraine, embouteillée, reconstituée ou réceptrice (cf. 6.2)
pH :	6,5-8,5; recommandé entre 7,0 et 8,0
Dureté :	160-180 mg/l CaCO ₃
Température :	20,0 ± 2,0 °C
Intensité lumineuse :	500 à 1000 lux
Photopériode :	16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité
Oxygène dissous dans l'élevage et aération :	80 % à 100 % de saturation; légère aération au besoin
Suivi de la qualité de l'eau dans l'élevage :	Température : 1 fois par jour Oxygène dissous et pH : 2 fois par semaine Dureté : 1 fois par semaine ³ Intensité lumineuse : 1 fois par 2 semaines
Charge maximale :	Entre 10 à 25 daphnies par litre
Alimentation :	Algues, avec ou sans suppléments
Fréquence d'alimentation :	Quotidienne
Renouvellement d'eau :	Minimum une fois par semaine, recommandé aux deux jours
Suivi de la productivité :	En continu, idéalement 1 fois par semaine

7.3 Manipulation des daphnies

En tout temps, les daphnies doivent être manipulées avec soin, les néonates étant particulièrement vulnérables à l'emprisonnement d'air sous leur carapace. Ces dernières doivent donc être manipulées le

³ Si la dureté n'est pas ajustée préalablement à l'utilisation de l'eau.

moins possible et, lorsqu'elles sont pipetées, elles doivent être libérées sous la surface de l'eau. La récupération des néonates de ≤ 24 h est faite au maximum quelques heures avant le départ des essais. Les néonates sont conservées dans l'eau d'élevage d'où elles proviennent jusqu'au départ de l'essai.

Différentes techniques de tamisage peuvent s'avérer efficaces pour sélectionner la classe d'organismes utilisés pour les essais de toxicité (néonates ≤ 24 h). Une technique éprouvée est présentée dans l'annexe I.

8. Protocole d'analyse

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie*, [DR-12-SCA-03](#), sont suivies pour s'assurer d'une fréquence d'insertion adéquate en ce qui concerne les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité (groupe contrôle, toxique de référence, etc.). Tous ces éléments d'assurance et de contrôle de la qualité suivent les mêmes étapes du protocole analytique que les échantillons.

8.1 Préparation des échantillons

L'échantillon doit être homogénéisé avant le début de l'essai et sa température doit être ramenée à $20,0 \pm 2,0$ °C, à l'aide d'un bain-marie ou en le laissant tempérer dans l'incubateur ou à la température de la pièce. Par la suite, la température, la conductivité, la dureté, l'oxygène dissous et le pH doivent être mesurés et notés.

La mesure de la dureté peut être faite de différentes façons. Une méthode par titration, comme le suggère le *Standard Methods*, est adéquate. Si la dureté est inférieure à 50 mg/l, elle doit être ajustée à 50 ± 5 mg/l avec une solution concentrée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium (cf. 6.3.1).

Si, et seulement si, la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 40 % ou supérieure à 100 % de saturation, l'échantillon est préalablement aéré pour une période n'excédant pas 30 minutes à raison de 25 à 50 ml/min·l. Une mesure de l'oxygène dissous est reprise après la période d'aération. Qu'on ait atteint ou non la concentration d'oxygène entre 40 % et 100 % de saturation, l'essai est mis en route immédiatement après cette préaération.

Aucune autre modification ne doit être apportée à l'échantillon. Cependant, si le pH est extrême, un essai supplémentaire peut être effectué avec l'échantillon à pH ajusté.

8.2 Conditions d'essai

Tableau 2. Résumé des conditions d'essai

Type d'essai :	Statique
Température :	$20,0 \pm 2,0$ °C
Intensité de la lumière :	500 à 1000 lux
Photopériode :	16 heures de lumière, 8 heures d'obscurité
Oxygène dissous :	40 à 100 % de saturation
Volume des tubes :	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
Charge maximale :	0,65 g/l ⁴
Alimentation :	Aucune alimentation
Eau de dilution :	Eau déchlorée, souterraine, embouteillée, reconstituée ou réceptrice selon l'étude (cf. 6.2) pH 6,5 – 8,5; recommandé entre 7,0 et 8,0 ; dureté 160 - 180 mg/l CaCO ₃ ; oxygène dissous entre 90 et 100 % de saturation
Durée de l'essai :	48 heures ± 1 heure
Effet mesuré :	Mortalité et immobilité
Expression des résultats :	CL ₅₀ 48h et CE ₅₀ 48h
Acceptabilité de l'essai :	Mortalité et comportement atypique ou stressé (ex. immobilité) des contrôles ≤5 %; toxique de référence à l'intérieur de ±2S
Volume d'échantillon :	500 ml

8.3 Sélection des concentrations d'essai

Une série d'au moins cinq concentrations doit être utilisée. Un facteur de dilution de 0,5 à 0,7 est généralement approprié. Il peut être souhaitable de procéder à un essai préliminaire afin de choisir la gamme de dilutions appropriée si le délai de conservation le permet ou d'utiliser plus de cinq concentrations de façon à obtenir des réponses partielles.

Dans un contexte réglementaire, l'échantillon non dilué (100 % V/V) doit être analysé.

8.4 Réalisation de l'essai

8.4.1 Départ de l'essai

- Choisir la gamme de concentrations appropriées.

⁴ 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 USEPA (2002), la charge à respecter pour un test statique à 20 °C est de 0,65 g/l. Une détermination de la charge réelle a démontré que ce facteur n'est pas critique, même avec cinq néonates par 10 ml.

- Tamiser les daphnies pour récupérer des néonates de 24h et moins.
- Compléter la préparation de l'échantillon (cf. 8.1).
- Préparer, pour chaque concentration et pour le groupe contrôle, quatre tubes à essai de 25 ml en introduisant des volumes croissants de l'échantillon. Compléter le volume des tubes à 8 ml avec de l'eau de dilution.
- Pour le groupe contrôle, une concentration faible, une concentration moyenne et la concentration la plus élevée, préparer des volumes d'environ 20 ml supplémentaires dans lesquels il n'y aura pas de néonate; ces volumes serviront pour les mesures physico-chimiques.
- Transférer, dans chaque tube d'essai, cinq néonates à l'aide d'une pipette. Les néonates sont transférées en prenant soin de minimiser l'apport d'eau d'élevage et en s'assurant qu'elles ne sont pas piégées par la tension de surface. Les individus blessés lors des manipulations doivent être remplacés. **Introduire les néonates de la concentration la plus faible à la concentration la plus élevée afin d'éviter la contamination entre les concentrations.**
- Pour chaque tube à essai, compléter le volume de liquide à 10 ml avec de l'eau de dilution **immédiatement après l'introduction des néonates.**
- Mettre un bouchon non hermétique pour limiter la perte de substances volatiles.
- **Noter l'heure du début de l'essai et les lots de néonates utilisés.**
- Pour les trois concentrations (faible, moyenne et haute) et le groupe contrôle, mesurer la température, le pH et l'oxygène dissous dans les volumes supplémentaires préparés et n'ayant pas reçu de néonates.
- Incuber pendant 48 **heures $\pm$ 1** heure à $20,0 \pm 2,0$ °C, à une intensité lumineuse entre 500 et 1000 lux et une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

8.4.2 Fin de l'essai

- Après la période d'incubation, dénombrer et noter les daphnies immobiles et mortes. L'immobilité se définit par l'inaptitude à la nage pendant 15 secondes suivant une légère agitation de la solution. La mortalité est déterminée par l'absence de mouvement des appendices et des antennes et par l'absence de battements cardiaques. **Il faut également noter tout autre comportement atypique ou stressé.**
- **Noter l'heure de la fin de l'essai.**
- Immédiatement après le dénombrement, mesurer la concentration en oxygène dissous, le pH et la température dans une concentration faible, une moyenne et une élevée (les mêmes qu'utilisées pour la physico-chimie de départ) ainsi que dans le **groupe contrôle en combinant doucement l'ensemble des tubes d'une même concentration.**

8.5 Essai avec toxique de référence

Des essais avec toxiques de référence doivent être effectués au moins deux fois par mois ou une fois par **semaine**, si le laboratoire effectue plus de 10 analyses par deux semaines. **Lors de la saison creuse ou si le laboratoire effectue peu d'analyses (moins d'une analyse par deux semaines), un essai avec toxique de référence par série d'essais suffit.** Les résultats issus de ces essais sont compilés sous la forme d'un 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, 1 essai sur 20 devrait se situer à l'extérieur des limites de $\pm 2S$ (seuil de probabilité de 95 %). **Un résultat se situant à l'extérieur des limites de $\pm 3S$ doit faire l'objet d'une investigation et les essais associés sont rejetés.**

De plus, le laboratoire doit être attentif aux tendances lors de l'étude de ses diagrammes de contrôle. La détection précoce d'une tendance permettrait d'éviter la production de données aberrantes. Une tendance se définit comme la présence, du même côté de la ligne de la moyenne, de 5 points consécutifs ou plus (Environnement Canada, 1990). La détection d'une tendance devrait mener à une investigation afin d'en trouver la cause.

9. Calcul et expression des résultats

9.1 Détermination de la CL₅₀ 48h et de la CE₅₀ 48h

Lorsque la mortalité ou l'immobilité dépasse 50 % dans un essai de toxicité, une analyse statistique est effectuée. La CL₅₀ 48h (ou CE₅₀ 48h) et son intervalle de confiance à 95 % sont déterminés à l'aide de la méthode probit, de la moyenne mobile, Spearman-Kärber, ou binomiale (interpolation linéaire à deux points). Toutefois, le résultat calculé par la méthode binomiale ne devrait être utilisé que dans les cas où aucun effet partiel n'a été observé. Un effet partiel se définit par la manifestation de l'effet chez une partie seulement des organismes (≥ 1 mortalité ou immobilité par concentration). Il se différencie d'un effet nul (0 %) et total (100 %).

9.2 Expression des résultats

Les résultats de la CL₅₀ et de la CE₅₀ sont exprimés comme suit avec leur intervalle de confiance à 95 %:

- en pourcentage (% V/V);
- en P/V pour les produits purs;
- les résultats de CL₅₀ peuvent également être exprimés en unité toxique aiguë (UTa) pour les effluents, soit $100/CL_{50}$.

10. Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité sont définis dans le document [DR-12-SCA-03](#) et sont appliqués comme suit :

Éléments de contrôle	Critères d'admissibilité
Acceptabilité des groupes contrôles	Le pourcentage de mortalité ou de comportement atypique (immobilité ou autre) dans les groupes contrôles est égal ou inférieur à 5 %.
Conformité du résultat de l'essai avec toxique de référence	Les résultats de l'essai avec toxique de référence effectué selon la fréquence requise se situent à l'intérieur des limites de $\pm 2S$. Les résultats se situant à l'extérieur des limites de $\pm 3S$ entraînent le rejet du résultat d'essai; si le résultat se situe entre les limites de $+2S$ et $+3S$ ou $-2S$ et $-3S$, le résultat d'essai peut être acceptable selon le cas s'il est démontré qu'il ne s'agit pas d'une tendance hors contrôle.

Qualité de la relation concentration-réponse	La gamme de dilution devrait permettre la présence d'effet partiel. Une gamme de dilution offrant seulement les effets « nul » et « total » est généralement signe que le facteur de dilution est trop grand entre les concentrations.
État de santé et de conformité de l'organisme	Daphnie utilisée dans les essais : néonates âgées de ≤ 24 h; Âge moyen des femelles à la première ponte : ≤ 12 jours; Taux moyen de ponte des femelles âgées de 12 et 37 jours : ≥ 15 néonates; Mortalité des génitrices dans les 7 jours précédant l'essai : ≤ 15 %; Absence d'éphippie et de mâle.
Respect des conditions d'essai	Température, luminosité et autres paramètres à l'intérieur des exigences de la méthode.

Bibliographie

NOTE: Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique.

APHA, AWWA et WEF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23^e édition. American Public Health Association, Washington, D.C., 2017.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Détermination de la toxicité: inhibition de la croissance chez l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Raphidocelis subcapitata*). MA. 500 – P.sub. 1.0

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie, DR-12-SCA-03
[http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA03_lignes_dir_toxico.pdf]

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. 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. Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité. Rapport SPE 1/RM/46, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes. Ottawa, Ontario, 2005.

ENVIRONNEMENT CANADA. Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez *Daphnia magna*. Rapport SPE 1 RM/14, 2^e édition, Centre de technologie environnementale, Ottawa, Ontario, 2000 (modification février 2016), 23 p.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, Rapport EPA-821-R-02-012, 5th edition, Washington, DC., 2002

Annexe I - Procédure d'élevage de *Daphnia magna*

Plusieurs protocoles d'élevage sont répertoriés dans la littérature (USEPA, 2002; Environnement Canada, 2000) et peuvent être adéquats pour maintenir un élevage de *Daphnia magna*. 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 tous des facteurs déterminants de succès. Dans certains cas, il peut y avoir apparition de mâles ou d'éphippies dans l'élevage, ce qui est indicateur d'un mauvais état de santé des organismes. Les organismes des récipients ainsi « contaminés » doivent être éliminés.

La méthode en vigueur au Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) utilise de l'eau déchlorée comme eau d'élevage. Les organismes sont maintenus dans des aquariums de 16 litres doublés de sacs plastiques de qualité alimentaire. L'alimentation est constituée d'une culture concentrée d'algues vertes (*Raphidocelis subcapitata*) et d'une solution d'extrait de bœuf et de dextrose.

MATÉRIEL ET APPAREILLAGE

Les marques de commerce qui apparaissent ci-dessous, le cas échéant, ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Un modèle équivalent d'un autre fabricant peut également être utilisé.

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant et une procédure de lavage adéquate est de rigueur.

- Incubateur, chambre environnementale ou toute autre installation en mesure de fournir la température et l'éclairage appropriés;
- pH-mètre;
- Conductivimètre;
- Oxygène;
- Thermomètre;
- Système de purification d'eau (de type Milli-Q ou autre);
- Système d'aération exempt d'huile (des « pièges à eau » ou des filtres à air sont requis pour réduire les risques de contamination si des pompes lubrifiées sont utilisées);
- Aquarium de 16 litres ou autre contenant pouvant contenir un minimum de 10 litres d'eau;
- Sac de plastique transparent de qualité alimentaire;
- Siphon;
- Tamis de tailles approximatives de 1000 µm, 590 µm et 250 µm;
- Contenant pour la préparation d'eau d'élevage en grand volume (environ 70 litres);
- Matériel pour faire le suivi du chlore, ex. : HANNA instruments (HI 9761C);
- Matériel et solution pour faire le suivi et l'ajustement de la dureté (cf. 6.3.1);
- Matériel pour faire la culture d'algue.

RÉACTIFS ET SOLUTIONS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS, à moins d'indication contraire. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Les réactifs équivalents d'un autre fabricant peuvent également être utilisés.

L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions est de l'eau ultrapure.

Réactifs

Nom	Formule chimique	Cas no
Dextrose anhydre	$\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{CHO}$	50-99-7
Extrait de bœuf en pâte	N/A	68990-09-0
Nitrate de sodium	NaNO_3	7631-99-4
Chlorure de calcium dihydraté	$\text{CaCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	10035-04-8
Sulfate de magnésium heptahydraté	$\text{MgSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$	10034-99-8
Phosphate de potassium dibasique	K_2HPO_4	7758-11-4
Phosphate de potassium monobasique	KH_2PO_4	7778-77-0
Chlorure de sodium	NaCl	7647-14-5
Sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique dihydraté	$\text{Na}_2\text{EDTA} \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	6381-92-6
Hydroxyde de potassium	KOH	1310-58-3
Chlorure ferrique hexahydraté	$\text{FeCl}_3 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$	10025-77-1
Acide sulfurique	H_2SO_4	7664-93-9
Acide borique	H_3BO_3	10043-35-3
Chlorure de manganèse tetrahydraté	$\text{MnCl}_2 \bullet 4 \text{H}_2\text{O}$	13446-34-9
Sulfate de zinc heptahydraté	$\text{ZnSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$	7446-20-0
Molybdate de sodium dihydraté	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	10102-40-6
Sulfate de cuivre pentahydraté	$\text{CuSO}_4 \bullet 5 \text{H}_2\text{O}$	7758-99-8
Nitrate de cobalt hexahydraté	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$	10026-22-9

Solutions

Eau d'élevage

L'eau d'élevage utilisée au CEAQ est l'eau déchlorée et traitée aux UV du système de traitement de l'eau de Sainte-Foy (ville de Québec). Un ajustement de sa dureté est effectué pour obtenir une dureté se situant entre 160 et 180 mg/l de carbonate de calcium (CaCO_3). Avant d'être utilisée, l'eau est barbotée vigoureusement à l'aide de bulleurs pendant près d'une semaine pour en extraire toute trace résiduelle de chlore.

Milieu de culture des algues

Les algues constituent l'alimentation principale de l'élevage des daphnies et elles peuvent être achetées en culture ou produites en laboratoire. Dans le cas où une culture est maintenue en laboratoire, il est fortement suggéré d'avoir des cultures souches stériles produites en continu servant au départ de culture dans un milieu similaire à celui présenté ci-dessous.

Le milieu de culture suggéré est une version modifiée du milieu Bristol.

- Préparer les solutions mères 1 à 10 décrites au tableau 3. Ces solutions se conservent 6 mois à **environ 4 °C**.
- Dans un volume d'environ 900 ml, ajouter successivement les 10 solutions mères, dans l'ordre, selon les volumes inscrits dans le tableau 3.
- Compléter à 1 litre avec de l'eau ultrapure et agiter légèrement.
- Autoclaver le milieu reconstitué (121°C, 1,06 – 1,20 kg/cm²) pendant 10 min/l ou un minimum de 30 minutes pour les volumes inférieurs à 3 litres.
- Entreposer le milieu à la température de la pièce et à l'obscurité pour une période maximale de 6 mois.

Tableau 3. Préparation du milieu pour la culture des algues servant de nourriture pour les daphnies

No. de la solution mère	Produits et formule chimique	Préparation (dans de l'eau ultra pure)	Volume à ajouter pour 1 litre de milieu
1	NaNO ₃	50 g/l	2,5 ml
2	CaCl ₂ •2 H ₂ O	5 g/l	2,5 ml
3	MgSO ₄ •7 H ₂ O	15 g/l	2,5 ml
4	K ₂ HPO ₄	15 g/l	2,5 ml
5	KH ₂ PO ₄	35 g/l	2,5 ml
6	NaCl	5 g/l	2,5 ml
7	Na ₂ EDTA•2 H ₂ O KOH	25 g/500 ml 15,5 g/500 ml	0,5 ml
8	FeCl ₃ •6 H ₂ O (+ 1 ml H ₂ SO ₄)	2,42 g/500 ml	0,5 ml
9	H ₃ BO ₃	5,71 g/500 ml	0,5 ml
10	MnCl ₂ •4 H ₂ O ZnSO ₄ •7 H ₂ O Na₂MoO₄•2 H₂O CuSO ₄ •5 H ₂ O Co(NO ₃) ₂ •6 H ₂ O	0,36 g/l 2,21 g/l 0,30 g/l 0,39 g/l 0,12 g/l	2 ml

Culture des algues

La méthode de conservation et de culture de la souche pure et axénique de *Raphidocelis subcapitata* est précisée dans la méthode MA. 500 – P.sub 1.0 (Édition courante).

- Inoculer un volume approprié de milieu de culture de façon à obtenir une densité cellulaire d'environ 10 000 cell./ml à partir d'une culture pure et axénique de *Raphidocelis subcapitata*.
- Incuber à $24,0 \pm 2,0$ °C pour une durée maximale de sept jours avec un barbotage d'air continu pour éviter une déplétion en CO₂ et une sédimentation des algues.
- L'éclairage est continu à une intensité de $4\,300 \text{ lux} \pm 10\%$ ($58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \pm 10\%$).
- La densité cellulaire de la culture concentrée d'algues utilisée pour l'alimentation des daphnies est approximativement de 20×10^6 cell./ml.

Solution d'extrait de bœuf et de dextrose

- Dissoudre 0,75 g d'extrait de bœuf et 0,75 g de dextrose dans 50 ml d'eau ultrapure.
- Une nouvelle solution doit être préparée chaque semaine et conservée à environ 4 °C.

MÉTHODE D'ÉLEVAGE

Démarrage d'un nouvel élevage

L'élevage est issu d'une seule femelle se reproduisant par parthénogenèse. La procédure utilisée pour débiter un nouvel élevage est la suivante :

- Prendre 10 béchers de 250 ml en verre et y introduire 200 ml d'eau d'élevage;
- À l'aide d'une pipette Pasteur coupée et rodée (ou d'un autre dispositif adéquat d'une ouverture de 5 mm minimum), transférer, dans chacun des 10 béchers, 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 béchers;
- Incuber à $20,0 \pm 2,0$ °C sous un cycle de lumière-obscurité 16 h - 8 h; et une intensité lumineuse entre 500 à 1000 lux;
- Renouveler quotidiennement 2/3 du volume d'eau et ajouter de la culture concentrée d'algues comme source de nourriture, **comme précédemment**;
- Dès la première ponte, sélectionner le bécher ayant la meilleure production et éliminer la première génération de néonates. Conserver la deuxième génération de néonates et retirer la femelle adulte;
- Transférer ces daphnies juvéniles dans un aquarium de 16 litres contenant 6 litres d'eau d'élevage. Ajouter entre 75 et 100 ml de culture concentrée d'algues;
- Après environ une semaine, ou dès la première ponte, éliminer les néonates de la première **ponte** en sélectionnant ces dernières à l'aide des tamis d'environ 1 000, 590 et 250 µm. Seules les daphnies adultes sont conservées. Ramener le volume à 10 litres et ajouter entre 75 et 100 ml de culture concentrée d'algues et 0,8 ml solution d'extrait de bœuf et de dextrose.

Maintien d'un élevage fonctionnel

Les daphnies de la deuxième génération retenues sur le tamis d'environ 250 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 pour la réalisation d'essais sur une base régulière. Un élevage constitué de quatre à six aquariums d'âges différents permet une production très abondante et régulière de néonates.

- Introduire 10 litres d'eau d'élevage dans chacun des deux aquariums de 16 litres, doublés de sacs de plastique.
- Ajouter entre 75 et 100 ml de culture concentrée d'algues ($20 \text{ à } 30 \times 10^6 \text{ cell./ml}$) dans chaque aquarium comme source de nourriture jusqu'à l'obtention d'une coloration légèrement verdâtre. Ne pas ajouter de solution d'extrait de bœuf et de dextrose à cette étape.
- Introduire approximativement entre 10 et 25 daphnies juvéniles/l.
- Maintenir les aquariums dans une chambre environnementale ou dans une enceinte d'élevage qui permet de respecter les conditions de température et de luminosité précisées plus haut.
- Aérer délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur introduite environ au $\frac{3}{4}$ de la profondeur de l'aquarium.
- Après environ une semaine, compter et conserver entre 100 et 250 daphnies adultes par aquarium.
- Renouveler tous les deux ou trois jours environ 40 % du volume de 10 litres d'eau d'élevage. Changer également le sac pour éviter une accumulation d'algue dans le fond.
- Ajouter quotidiennement entre 75 et 100 ml de culture concentrée d'algues. Ne pas excéder la consommation quotidienne d'algues de façon à éviter une prolifération qui serait nuisible aux daphnies.
- À partir du 8^e jour environ (qui équivaut au stade adulte), ajouter également 0,8 ml de la solution d'extrait de bœuf et de dextrose.

Tableau 4. Résumé des conditions d'élevage de *Daphnia magna* au CEAEQ

Espèce :	<i>Daphnia magna</i>
Eau :	Eau déchlorée sur filtre au charbon activé, traitée aux UV et barbotée pendant 3 à 7 jours
pH :	6,5-8,5; recommandé entre 7,0 et 8,0
Dureté :	160-180 mg/l CaCO_3
Température :	$20,0 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$
Type de lumière :	Fluorescent Cool White ou DEL équivalent
Intensité lumineuse :	500 à 1000 lux, mesurée à la surface de l'eau
Photopériode :	16 heures de lumières et 8 heures d'obscurité
Oxygène dissous dans l'élevage et aération :	80 % à 100 % de saturation, léger bullage à l'aide d'une pipette en verre
Capacité des aquariums :	16 litres
Volume d'eau d'élevage :	10 litres
Âge des daphnies :	Différents stades de juvénile et adultes (entre 0 et 37 jours)
Nombre de daphnies par aquarium :	100 (à partir du stade adulte)

Fréquence et type d'alimentation :	Quotidiennement, entre 75 à 100 ml d'algue pour tous les aquariums et 0,8 ml de solution d'extrait de bœuf et de dextrose pour les aquariums adultes (âgée de 8 jours ou plus)
Fréquence de renouvellement de l'eau et des sacs :	Aux deux jours; renouvellement de 40 % de l'eau des aquariums adultes et changement de sac

Méthode de tamisage

- Le tamisage des daphnies dans les aquariums est effectué dans l'objectif de renouveler l'eau d'élevage, de changer le sac lorsqu'il y a un dépôt d'algue et d'obtenir des néonates pour les essais. En tout temps, les daphnies doivent être manipulées avec soin et conservées dans l'eau. La technique de tamisage suivante s'est avérée efficace pour sélectionner la classe d'organismes utilisés pour les essais de toxicité (néonates ≤ 24 h).
- Tout le matériel doit être rincé avec de l'eau d'élevage ou déminéralisée avant son utilisation et entre les différents aquariums.
- Utiliser un contenant de 1 litre placé à l'intérieur d'un contenant de 2 litres. Ces deux contenants sont placés dans un seau et remplis avec de l'eau de l'aquarium, laquelle est siphonnée à travers un tamis d'environ 250 μm d'ouverture de maille pour ne siphonner que l'eau dans un premier temps.
- Sur le contenant de 1 litre, placer trois tamis selon l'ordre suivant d'ouverture de maille : environ 1 000 μm sur le dessus, environ 590 μm au milieu et environ 250 μm en dessous.
- À l'aide d'un tube plastifié flexible de diamètre interne de 6 à 8 mm, siphonner les daphnies de l'aquarium. Le jet doit être dirigé près du niveau de l'eau, 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 maximum par cette technique. L'aquarium est ensuite vidé au complet sur les tamis afin de récupérer toutes les femelles adultes et les néonates.
- Sortir du seau le contenant de 2 litres rempli d'eau et qui contient toujours les tamis dans le contenant de 1 litre.
- Changer le sac de l'aquarium qui vient d'être vidé.
- Remplir l'aquarium à 60 % avec l'eau provenant du seau.
- Comptabiliser la mortalité, les comportements atypiques et toutes autres observations pertinentes.
- Enlever un peu d'eau dans les deux contenants en penchant légèrement ceux-ci dans le seau; enlever le tamis d'environ 1 000 μm et le placer rapidement dans l'eau de l'aquarium pour y libérer les daphnies adultes. S'assurer qu'il reste un niveau d'eau suffisant dans les deux derniers tamis.
- Compléter le volume en ajoutant 40 % de nouvelle eau.
- Nourrir l'aquarium et réinstaller le système d'aération.
- Jeter les daphnies intermédiaires qui se retrouvent sur le tamis d'environ 590 μm .
- Les daphnies retenues sur le tamis d'environ 250 μm (néonates ≤ 24 h) sont utilisées pour les essais de toxicité et pour démarrer de nouveaux élevages. Prélever les néonates dans le tamis de 250 μm au moyen d'une pipette **ou d'un siphon**, en prenant soin de ne pas les blesser, et les transférer dans un récipient de 1 litre contenant environ 300 ml d'eau d'élevage.

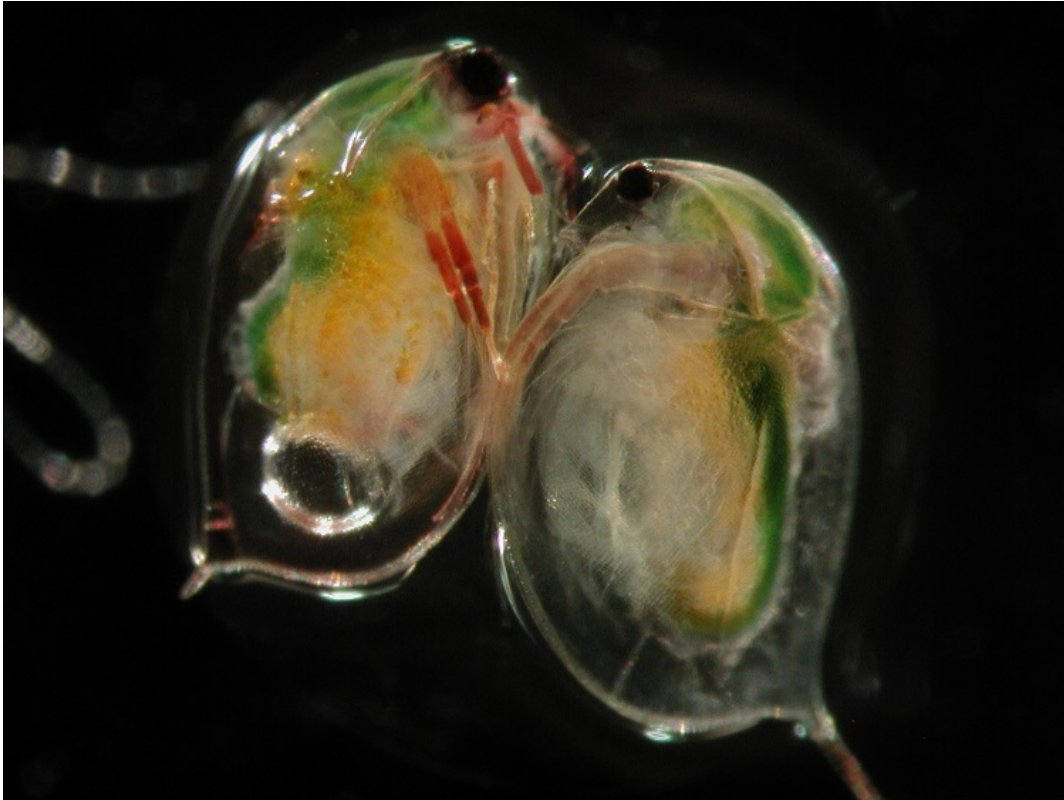
Suivi de la productivité

La productivité de l'élevage est évaluée de façon continue en isolant une fois par semaine une daphnie mère (pour valider la grosseur des portées) et cinq néonates (pour valider l'âge à la première portée) dans des béchers de 200 ml. Un volume d'environ 150 ml d'eau d'élevage est utilisé par bécher et environ 1 ml de

culture concentrée d'algues est ajouté au besoin. Cette procédure permet de déterminer l'âge de la femelle à la première portée ainsi que le nombre moyen de jeunes par portée.

Voici à titre indicatif une photo de daphnies mâle et femelle.

Figure 1. Photo d'une daphnie mâle (à gauche) et d'une daphnie femelle (à droite).





**Environnement
et Lutte contre
les changements
climatiques**

Québec

