

Programme d'accréditation
des laboratoires d'analyse
environnementale

**LIGNES DIRECTRICES CONCERNANT
L'APPLICATION DES CONTRÔLES
DE LA QUALITÉ
EN TOXICOLOGIE**

DR-12-SCA-03
Édition : 2004-06-07

Pour information, vous pouvez communiquer avec

Le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec

Téléphone : (418) 643-1301

Télécopieur : (418) 528-1091

Courriel : ceaeq@menv.gouv.qc.ca

Internet : www.menv.gouv.qc.ca/ceaeq

ISBN 2-550-42669-X

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Québec, 2004

Dépôt légal – Bibliothèque nationale du Canada, 2004

ENVIRODOQ : ENV/2004/0154

AVANT-PROPOS

Ce document s'adresse à tous les laboratoires accrédités en toxicologie par le ministère de l'Environnement du Québec (MENV). Il précise les lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en toxicologie, lesquelles sont passées en revue lors de l'audit des procédures de contrôle de qualité effectué dans le cadre du *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse environnementale* basé sur la norme internationale ISO/CEI 17025.

Tous les éléments qui figurent dans ce document sont vérifiés au cours de l'audit et font l'objet d'un rapport de conformité. Le laboratoire doit, par la suite, soumettre un rapport de correction des éléments non conformes établis lors de l'audit et démontrer l'application effective de son programme d'assurance et de contrôle de la qualité.

La correspondance entre les sections présentées dans ce document et celles apparaissant au chapitre III du document intitulé *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse environnementale* est indiquée entre parenthèses au début de chacune des sections.

Les domaines visés par ces lignes directrices sont mentionnés dans le document intitulé *Champs et domaines d'accréditation en vigueur* (DR-12-CDA).

TABLE DES MATIÈRES

1	LOCAUX ET ENVIRONNEMENT (section 5.3)	7
1.1	Aménagement	7
1.2	Sécurité	8
1.3	Propreté	9
1.4	Conditions ambiantes	9
2	EAU DE LABORATOIRE ET RÉACTIFS (sections 4.6 et 5.9)	9
2.1	Eau déminéralisée	9
2.2	Eau pour la détention, l'élevage et les essais de toxicité	10
2.3	Toxique de référence (section 5.6)	12
2.4	Autres réactifs	13
3	ÉQUIPEMENTS (sections 5.5 et 5.6)	13
3.1	Inventaire des équipements	14
3.2	Entretien et réparation	14
3.3	Oxymètre	14
3.4	pH-mètre	14
3.5	Conductivimètre	14
3.6	Balances	15
3.7	Thermomètres	15
3.8	Luxmètre	15
3.9	Réfrigérateurs	15
3.10	Équipements pour le traitement et le conditionnement de la température de l'eau	15
3.11	Autres équipements	16
3.12	Lavage de la verrerie	17
4	MÉTHODES D'ANALYSE (section 5.4)	17
4.1	Préparation des échantillons	17
4.2	Validation des méthodes	18
4.2.1	Interférence	18
4.2.2	Variabilité des groupes de contrôle	18
4.2.3	Détermination du seuil d'effet de la méthode	18
4.2.4	Répétabilité et reproductibilité	19
4.2.5	Critères d'acceptabilité	21

4.3	Gamme de dilutions et calcul des paramètres d'effet (CI ₅₀ , CI ₂₀ , CI ₁₅ , CSEO-CMEO)	21
4.4	Organismes vivants	22
4.4.1	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	22
4.4.2	Daphnie (<i>Daphnia magna</i>)	23
4.4.3	Tête-de-boule (<i>Pimephales promelas</i>)	24
4.4.4	Algue verte (<i>Selenastrum capricornutum</i>)	25
4.4.5	Cériodaphnie (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	26
4.5	Conditions d'essai	27
4.6	Échantillonnage et conservation des échantillons (section 5.7)	27
4.7	Système informationnel (section 5.4.7)	27
5	TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (sections 4.12, 5.8 et 5.10)	28
5.1	Demande d'analyse et enregistrement des échantillons au laboratoire	28
5.2	Feuilles de travail	29
5.3	Certificat d'analyse	32
5.4	Transcription et suivi des données pour les échantillons	33
6	ASSURANCE DE LA QUALITÉ (sections 5.6 et 5.9)	33
6.1	Éléments de contrôle de qualité	33
6.1.1	Essais avec toxique de référence ou échantillon de référence	33
6.1.2	Diagramme de contrôle	34
6.1.3	Groupes de contrôle	35
6.1.4	Critères d'acceptabilité	35
	DÉFINITIONS	37
	BIBLIOGRAPHIE	39

1 LOCAUX ET ENVIRONNEMENT (section 5.3)

Dans le but de favoriser le travail analytique, il est important d'assurer un aménagement fonctionnel du laboratoire, d'appliquer des règles de sécurité et de maintenir l'ordre et la propreté en tout temps.

1.1 Aménagement

L'aménagement du laboratoire et la disposition des différents appareils et équipements doivent être adéquats pour faciliter le travail des analystes. Les secteurs d'activité de chimie, microbiologie et toxicologie doivent être aménagés dans des locaux distincts. Une séparation efficace doit exister entre les zones avoisinantes lorsque des activités incompatibles s'y déroulent.

Une surveillance efficace qui limite l'accès aux aires du laboratoire doit être mise en place. Les espaces destinés aux élevages, aux cultures et aux essais doivent être maintenus dans un état adéquat de propreté, exempts de poussière, sans bruit excessif et sans vibration.

L'aménagement des locaux doit prévoir des espaces séparés pour les activités suivantes :

- travail analytique;
- réception des échantillons;
- réfrigération des échantillons;
- détention et élevage des organismes;
- essais sur les organismes.

Les élevages de têtes-de-boule, de daphnies, de cériodaphnies et de truites arc-en-ciel sont préférablement maintenus dans des salles séparées. Toutefois, il peut être acceptable de regrouper dans une même salle plus d'une espèce si l'aménagement est adéquat. Il ne doit pas y avoir de surcharge. Les risques de contamination (bactérienne, virale ou fongique) doivent être réduits et les exigences de température de l'eau spécifique à chacune des espèces doivent être respectées en tout temps.

Les espaces destinés aux essais doivent être différents de ceux utilisés pour l'élevage et la détention des organismes. Dans certains cas (algues et cériodaphnies particulièrement), les cultures, les élevages et les essais peuvent avoir lieu dans une même pièce à condition qu'il y ait confinement des différentes activités dans des espaces séparés (incubateur ou présence d'une cloison mobile efficace entre les élevages et les essais, etc.).

Les essais avec le tête-de-boule et avec la cériodaphnie doivent être effectués dans une salle différente de celle utilisée pour les essais avec la truite arc-en-ciel. Toutefois, il peut-être acceptable de regrouper les essais avec le tête-de-boule et la cériodaphnie dans un espace commun si l'aménagement est adéquat étant donné que les volumes

d'échantillons utilisés sont beaucoup plus faibles par rapport aux essais avec la truite arc-en-ciel. Les risques de contamination entre les différents essais doivent être réduits au minimum.

De plus, les services suivants doivent être disponibles pour le bon déroulement des activités analytiques :

- hotte d'évacuation;
- source adéquate d'approvisionnement en eau pour la détention, l'élevage et les tests de toxicité;
- système de traitement et de conditionnement d'eau (si nécessaire selon la nature de la source d'eau) pour la détention et l'élevage des organismes et pour les tests de toxicité. Les équipements de filtration et de traitement UV doivent être en mesure d'éliminer le chlore résiduel à un niveau non détectable (0,01-0,1 mg/l selon la méthode de mesure utilisée) ainsi que les contaminants organiques. De même, le système doit être en mesure de réduire le dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA) inférieur à 2000 UFC/ml;
- système d'air comprimé exempt d'huile;
- système de ventilation;
- système d'éclairage adéquat avec photopériode.

1.2 Sécurité

La sécurité doit être une priorité dans les activités quotidiennes du laboratoire. Le laboratoire doit être pourvu de l'équipement de sécurité nécessaire et se conformer à un programme de prévention en milieu de travail afin de minimiser les risques d'accidents et d'améliorer la sécurité.

Les éléments nécessaires pour assurer la sécurité des personnes sont les suivants :

- **système de protection contre les incendies :**
 - alarme ou détecteur de chaleur ou de fumée;
 - extincteurs;
- **signalisation des endroits dangereux;**
- **plan d'évacuation affiché dans les endroits stratégiques;**
- **équipements d'urgence :**
 - trousse de premiers soins;
 - douche oculaire;
 - douche d'urgence;
 - éclairage de secours;
- **équipement de protection :**
 - vêtements de laboratoire;
 - lunettes de protection ou protecteur pour le visage;
 - gants.

L'installation électrique doit être compatible avec le travail en présence d'eau. Le rangement doit être adéquat et permettre un accès sécuritaire au lieu de travail.

1.3 Propreté

La personne responsable du laboratoire doit prendre les dispositions pour maintenir la propreté des équipements, des tables de travail et du laboratoire en général afin d'assurer un travail de qualité en toxicologie.

La personne responsable du laboratoire doit également prendre les dispositions pour favoriser l'ordre à l'intérieur des locaux, le rangement en général et la libre circulation dans les allées, le corridor d'accès au laboratoire et l'accès à chaque poste de travail.

Les espaces de détention ou d'élevage d'organismes vivants doivent être maintenus dans un état adéquat de propreté de façon à éviter la contamination.

1.4 Conditions ambiantes

Une température adéquate doit être maintenue dans l'espace utilisé pour les travaux analytiques. Les conditions environnementales (température, photopériode, etc.) spécifiées dans les protocoles analytiques pour les besoins d'élevage ou de détention d'organismes vivants ainsi que pour les essais doivent être respectées afin d'assurer l'obtention de résultats fiables.

2 EAU DE LABORATOIRE ET RÉACTIFS (sections 4.6 et 5.9)

2.1 Eau déminéralisée

L'eau déminéralisée utilisée pour la préparation d'eau de dilution synthétique ou pour la préparation des réactifs utilisés dans les méthodes d'analyse doit être vérifiée régulièrement. L'efficacité du système de purification doit être vérifiée à intervalles réguliers et les mesures correctives nécessaires doivent être appliquées lorsque requises.

Il faut vérifier et enregistrer les résultats des paramètres suivants selon les fréquences établies dans le tableau qui suit.

Paramètre	Fréquence	Résultat attendu
Conductivité	1/semaine	< 2 µmhos/cm à 25 °C
pH	1/semaine	5,5-7,5
Chlore résiduel	1/mois	< 0,1 mg/l
Métaux ⁽¹⁾	1/année	< 1 µg/l individuel
BHAA	1/4 mois	< 1000 UFC/ml

(1) Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Pb, Ni, Zn.

2.2 Eau pour la détention, l'élevage et les essais de toxicité

L'eau utilisée pour la détention ou l'élevage des organismes vivants et pour les essais doit être exempte de contaminants et posséder des caractéristiques chimiques adéquates pour le maintien d'organismes vivants.

Elle peut provenir de différentes sources (eau municipale déchlorée, eau souterraine, eau de source embouteillée, eau reconstituée, etc.).

L'eau utilisée doit satisfaire à des conditions particulières qui sont spécifiées dans les méthodes pour chacune des espèces (ex. : dureté pour la daphnie).

Les paramètres suivants doivent être vérifiés pour l'eau d'approvisionnement traitée (pour l'eau synthétique, voir la section 2.1) et enregistrés aux fréquences établies et selon les limites de détection spécifiées. La qualité chimique de l'eau d'approvisionnement doit être constante dans le temps. Une fréquence de vérification plus élevée est suggérée et peut être exigée dans les cas où la qualité de l'eau ne répond pas aux critères spécifiés.

À noter que la température, l'oxygène dissous et le pH doivent également être mesurés directement dans les bassins de détention et les récipients d'élevage à une fréquence plus élevée. Il en est de même pour l'azote ammoniacal et les nitrites ainsi que pour la dureté selon le cas (voir la section 4.4).

Paramètre	Fréquence	Critère de qualité ⁽¹⁾	Limite de détection ⁽²⁾ requise ou précision
Alcalinité (mg CaCO ₃ /l)	1/6 mois	20-200	2
Aluminium (mg/l)	1/6 mois	< 0,09	0,01
Argent (mg/l)	1/6 mois	< 0,0001	0,0001
Arsenic (mg/l)	1/6 mois	< 0,05	0,001
Azote ammoniacal (mg N/l)	1/6 mois	--- ⁽³⁾	0,02
BHAA (UFC/ml)	1/6 mois	< 2000	1
Cadmium (mg/l)	1/6 mois	< 0,001	0,001
Carbone organique total (mg C/l)	1/6 mois	< 30	3
Chlore résiduel (mg Cl/l)	1/semaine	Non détectable ⁽⁴⁾	0,01-0,1 ⁽⁴⁾
Chlorures (mg Cl/l)	1/6 mois	< 230	20
Chrome (mg/l)	1/6 mois	< 0,002	0,002
Cobalt (mg/l)	1/6 mois	< 0,005	0,001
Conductivité (µmhos/cm à 25 °C)	1/6 mois	100-400	10
Cuivre (mg/l)	1/6 mois	< 0,002	0,001
Cyanures (mg CN/l)	1/6 mois	< 0,005	0,003
Dureté (mg CaCO ₃ /l)	1/6 mois	50-200	5
Fer (mg/l)	1/6 mois	< 0,3	0,03
Fluorures (mg F/l)	1/6 mois	< 2	0,2
Mercure (mg/l)	1/6 mois	< 0,0001	0,0001
Nickel (mg/l)	1/6 mois	< 0,16	0,01
Nitrates (mg N/l)	1/6 mois	< 40	4
Nitrites (mg N/l)	1/6 mois	< 0,02	0,02
Phosphore total (mg P/l)	1/6 mois	< 0,2	0,02
Plomb (mg/l)	1/6 mois	< 0,003	0,001
Potassium (mg/l)	1/6 mois	< 10	1
Sodium (mg/l)	1/6 mois	< 25	0,1
Sulfates (mg SO ₄ /l)	1/6 mois	< 80	8
Zinc (mg/l)	1/6 mois	< 0,005	0,001

(1) Critère de qualité pour la toxicité chronique ou concentration maximale généralement mesurée dans les eaux de surface de l'est du Canada (MENV, 2001; CCME, 1999).

(2) La limite de détection de l'analyse doit permettre de quantifier au moins la concentration spécifiée.

(3) Le critère de toxicité pour l'azote ammoniacal varie beaucoup en fonction du pH et de la température. Les critères sont spécifiques aux types d'essais et précisés plus loin. De façon générale, l'eau déchlorée doit avoir une concentration d'azote ammoniacal inférieure à 0,5 mg N/l.

(4) Meilleure limite de détection disponible. L'ensemble de dosage de la compagnie Hach permet le dosage dans une plage de basse concentration équivalente à 0-0,7 mg/l. Le fabricant ne rapporte pas la limite de détection, mais elle se situerait entre 0,01 et 0,1 mg/l.

2.3 Toxique de référence (section 5.6)

Les objectifs principaux liés à l'usage des toxiques de référence sont de déterminer la précision des méthodes utilisées (avec de véritables échantillons), d'effectuer un suivi dans le temps de façon à détecter les séquences d'analyses non conformes et de faire un suivi des variations de sensibilité des organismes vivants. Le toxique de référence agit, d'une part, comme un élément de validation de la méthode en permettant de déterminer la répétabilité et, d'autre part, comme un élément de contrôle de qualité. Il est souhaitable que les substances ou les échantillons de référence utilisés soient représentatifs des échantillons réels et qu'ils se comportent comme des substances toxiques. À cet égard, l'usage du chlorure de sodium (NaCl) et du chlorure de potassium (KCl) ne fait que mesurer les limites de tolérance des organismes à des constituants trouvés normalement dans le milieu aquatique à des concentrations relativement élevées. Ces substances ne sont pas représentatives du comportement d'une substance toxique ni représentatives de la nature des effluents pour lesquels la précision des essais doit être déterminée. En conséquence, l'usage de ces deux substances n'est pas recommandé.

Au cours des dernières années, à l'intérieur des laboratoires du Québec, l'application de contrôles de la qualité avec les toxiques de référence a démontré que les coefficients de variation mesurés peuvent varier du simple au triple en fonction de la substance utilisée. Les coefficients de variation typiques sont les suivants pour les essais de létalité avec la truite arc-en-ciel et la daphnie. Quelques données sont également rapportées pour les essais avec l'algue verte *Selenastrum* et le tête-de-boule.

Toxique de référence	Coefficient de variation typique (%)	Méthode
Sulfate de zinc	32	Létalité avec la truite arc-en-ciel
Pentachlorophénol	20	Létalité avec la truite arc-en-ciel
Mélange de 4 chlorophénols et 2 acides résiniques	18	Létalité avec la truite arc-en-ciel
Phénol	12	Létalité avec la truite arc-en-ciel
Chlorure de sodium	10	Létalité avec la truite arc-en-ciel
Bichromate de potassium	16	Létalité avec la daphnie
Mélange de 4 chlorophénols et 2 acides résiniques	25	Inhibition de la croissance avec l'algue verte <i>Selenastrum</i>
Phénol	30	Inhibition de la croissance avec l'algue verte <i>Selenastrum</i>
Mélange de 4 chlorophénols et 2 acides résiniques	35	Inhibition de la croissance larvaire avec le tête-de-boule

Une série de 16 essais réalisés avec un mélange de contaminants représentatifs d'un effluent de pâtes et papiers a démontré que le coefficient de variation typique pour ce type d'échantillon se situe autour de 18 % pour l'essai de létalité avec la truite arc-en-ciel. Les coefficients de variation observés pour le sulfate de zinc et le chlorure de sodium ne sont pas représentatifs des vrais échantillons.

Également, le coefficient de variation pour des échantillons de nature inorganique (industries des mines et métaux) est sans doute plus élevé que 20 %, particulièrement avec la truite arc-en-ciel. La détermination de la précision et le suivi par diagramme de contrôle pour ce type d'effluent devraient se faire à l'aide de toxiques de référence inorganiques.

Par ailleurs, une approche basée sur l'usage d'échantillons de référence (effluents artificiellement reconstitués) est recommandée.

La concentration des solutions mères préparées doit être vérifiée par analyse chimique. La concentration de la solution mère, la date de préparation et les initiales de l'analyste doivent être consignées dans un registre. Dans le cas où des solutions mères seraient conservées, le laboratoire doit s'assurer que la concentration demeure stable dans le temps en réalisant des mesures à intervalle approprié.

2.4 Autres réactifs

Tous les réactifs commerciaux utilisés doivent être de bonne qualité et entreposés correctement. Le laboratoire a la responsabilité de maintenir un registre des réactifs qui contient les renseignements suivants :

- nom du fournisseur;
- nom du produit et numéro de lot;
- date de réception;
- date d'expiration.

Les renseignements suivants relatifs aux solutions préparées au laboratoire doivent figurer sur le contenant de la solution de même que dans un registre :

- identification du contenu;
- concentration de la solution;
- date de préparation;
- initiales de l'analyste.

3 ÉQUIPEMENTS (sections 5.5 et 5.6)

Les équipements de laboratoire doivent être en bon état et conformes aux méthodes d'analyse utilisées. Chaque équipement doit posséder un registre d'entretien et de réparation et faire l'objet d'un programme de vérification périodique de la performance. Toutes les activités d'entretien et de réparation doivent être consignées par écrit. Les instructions du

fabricant, si elles sont disponibles, doivent être rendues accessibles dans le laboratoire. Les instruments et équipements défectueux ou non performants doivent être retirés et clairement identifiés jusqu'à la résolution du problème. De façon générale, tous les équipements doivent satisfaire aux spécifications du fabricant et du laboratoire et être vérifiés avant d'être mis en service.

3.1 Inventaire des équipements

Le registre d'inventaire des équipements doit contenir les renseignements suivants :

- type d'équipement (nom, modèle);
- numéro d'inventaire;
- modèle et numéro de série;
- nom du fabricant;
- emplacement actuel, le cas échéant;
- date de réception;
- état à la réception (neuf, usagé, reconditionné);
- date de la mise en service.

3.2 Entretien et réparation

Tous les instruments et équipements nécessaires à l'exécution des analyses doivent être entretenus correctement. Les activités de maintenance, de réparation, de calibration et d'étalonnage doivent être consignées dans des registres. Les instruments et équipements défectueux ou non performants sont retirés et sont clairement identifiés jusqu'à la résolution du problème.

3.3 Oxymètre

Cet instrument doit être calibré chaque journée qu'il est utilisé, selon la procédure qui convient au type d'instrument utilisé. Cet appareil doit être capable de détecter entre 0 et 100 % de saturation en oxygène.

3.4 pH-mètre

Le pH-mètre doit mesurer des variations d'au moins 0,1 unité de pH. Chaque fois qu'il est utilisé, l'électrode est vérifiée pour s'assurer qu'elle est saturée d'électrolytes. Le pH-mètre doit être étalonné à l'aide de deux tampons différents dont les pH se situent de part et d'autre du pH de la solution à mesurer. La valeur de la pente doit être vérifiée afin d'assurer qu'elle est conforme pour le type d'électrode utilisé.

3.5 Conductivimètre

L'appareil doit être calibré avec une solution de référence de chlorure de potassium (KCl).

3.6 Balances

Les balances doivent être placées à l'abri des courants d'air, dans un endroit peu fréquenté du laboratoire et sur une table à l'épreuve des vibrations. Les balances doivent être calibrées aux trois mois avec des poids de référence. Ces poids doivent être étalonnés au minimum une fois tous les trois ans par un laboratoire reconnu. Le laboratoire doit pouvoir fournir un certificat d'étalonnage. La précision des balances doit être adéquate pour les usages requis. Pour le test d'inhibition de la croissance avec le tête-de-boule, une balance avec une précision de 0,00001 g est requise pour la détermination du poids sec des larves.

3.7 Thermomètres

La graduation des thermomètres ne doit pas excéder 1 °C et la colonne de mercure doit être continue. L'étalonnage est vérifié annuellement avec un thermomètre certifié (graduation 0,1 °C). Ce thermomètre doit être étalonné, à chacune des températures d'utilisation, au minimum une fois tous les trois ans par un laboratoire reconnu, qui doit pouvoir fournir un certificat d'étalonnage. Le laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité qui respecte les exigences des méthodes d'analyse. Une inscription doit figurer sur le thermomètre pour certifier qu'il a été vérifié.

3.8 Luxmètre

Cet appareil doit être capable de détecter l'intensité de la lumière ambiante dans la gamme 0-200 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$ (0-10 560 lux).

3.9 Réfrigérateurs

Les réfrigérateurs doivent être bien disposés de façon à éviter les risques de contamination croisée. Il faut s'assurer que le contrôle de la température est bien calibré et qu'il maintient la température entre 1 °C et 4 °C. Les thermomètres sont à l'intérieur et préférablement plongés dans un contenant d'eau ou de glycérol. La température doit être enregistrée au moins une fois par semaine.

3.10 Équipements pour le traitement et le conditionnement de la température de l'eau

Les équipements et les systèmes utilisés pour le traitement et le conditionnement de la température de l'eau pour la détention et l'élevage des organismes vivants ainsi que pour les tests de toxicité doivent être adéquats et permettre de satisfaire en tout temps aux exigences spécifiées dans les protocoles.

Le mode de fonctionnement du système de traitement d'eau doit être documenté par écrit et connu du personnel de laboratoire. Le laboratoire doit posséder une procédure documentée d'entretien du système précisant la nature et la fréquence de l'entretien.

Le laboratoire doit s'assurer d'un approvisionnement d'eau de qualité adéquate en tout temps (voir la section 2.2). Les systèmes avec filtre biologique et ceux de type « recirculation » ne sont pas acceptés.

3.11 Autres équipements

D'autres équipements spécifiques à certaines méthodes d'analyse doivent être disponibles au laboratoire :

- **essai de létalité avec la truite arc-en-ciel :**
 - bassin de détention pour les truites;
 - système de conditionnement de la température permettant la détention à 15 ± 2 °C;
 - salle à température contrôlée à 15 ± 1 °C ou système de bain-marie pour la réalisation des essais;

- **essai de létalité avec la daphnie :**
 - salle à température contrôlée ou incubateur ou système de bain-marie pour l'élevage à 20 ± 2 °C;
 - salle à température contrôlée, incubateur ou système de bain-marie pour la réalisation des essais à 20 ± 2 °C;

- **essai de létalité avec le tête-de-boule et
essai d'inhibition de la croissance larvaire avec le tête-de-boule :**
 - salle à température contrôlée, incubateur ou système avec bain-marie permettant l'élevage du tête-de-boule entre 23 et 27 °C (sauf si le laboratoire s'approvisionne en œufs chez un fournisseur externe);
 - salle à température contrôlée, incubateur ou système avec bain-marie permettant la réalisation des essais de létalité et d'inhibition de la croissance larvaire à une température moyenne de 25 ± 1 °C (valeurs extrêmes de 23 à 27 °C);
 - étuve permettant le séchage des larves à 100 ± 5 °C pour la détermination du poids sec;

- **inhibition de la croissance avec l'algue verte *Selenastrum* (domaine 193, méthode MA 500 - S.cap. 2.0) et
inhibition de la croissance avec l'algue verte *Selenastrum* (domaine 194, méthode SPE 1/RM/25) :**
 - incubateur permettant une température contrôlée de 24 ± 2 °C et une intensité lumineuse de 4300 lux ± 10 % (domaine 193) ou de 60 à 80 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (3170 à 4225 lux) (domaine 194);
 - centrifugeuse de laboratoire;
 - équipement de filtration;
 - agitateur orbital permettant une agitation à 100 tours/minutes (domaine 193 seulement);
 - compteur de particules permettant le dénombrement cellulaire dans une classe de tailles de particule variant entre 2 et 10 μm ou cuvette de comptage Palmer-Maloney, Sedgwick-Rafter ou hémacymètre si le dénombrement microscopique est utilisé;
 - microscope conventionnel permettant des grossissements d'au moins 40X, 100X et 400X ou l'équivalent; le microscope à contraste de phase est recommandé pour le domaine 194;

- thermoscelleuse (domaine 194 seulement);
- micropipettes à multicanaux de capacités de 10 à 100 µl et 100 à 1000 µl (domaine 194 seulement);
- **inhibition de la reproduction et de la survie avec la cériodaphnie :**
 - salle à température contrôlée, incubateur ou système avec bain-marie permettant l'élevage des cériodaphnies à 25 ± 1 °C;
 - salle à température contrôlée, incubateur ou système avec bain-marie permettant la réalisation des essais d'inhibition de la reproduction à une température de 25 ± 1 °C;
 - stéréomicroscope à dissection;
 - table lumineuse (recommandée).

3.12 Lavage de la verrerie

Le lavage de la verrerie doit être effectué selon une procédure adéquate pour les usages en toxicologie environnementale.

La procédure suivante est recommandée :

- rinçage et brossage s'il y a lieu pour enlever les dépôts;
- lavage au lave-vaisselle avec un détergent et rinçage;
- rinçage à l'acide chlorhydrique 10 % V/V;
- deux rinçages à l'eau déminéralisée;
- rinçage à l'acétone;
- deux rinçages à l'eau déminéralisée;
- séchage.

4 MÉTHODES D'ANALYSE (section 5.4)

Le laboratoire doit utiliser les méthodes d'analyse identifiées dans la demande d'accréditation. Les utilisateurs doivent documenter les méthodes et les appliquer conformément. Les exigences supplémentaires de ces lignes directrices doivent également être appliquées.

4.1 Préparation des échantillons

Les exigences de préparation des échantillons sont précisées dans la plupart des méthodes.

De façon générale, les échantillons doivent être modifiés le moins possible avant l'essai. Toutefois, certaines considérations biologiques ou méthodologiques peuvent exiger des traitements.

4.2 Validation des méthodes

La validation des méthodes en toxicologie environnementale est déterminée à l'aide de l'identification des éléments d'interférence, des données de répétabilité (intra-laboratoire) et de reproductibilité (interlaboratoires) de la méthode, de la variabilité des groupes de contrôle et du seuil d'effet de la méthode (essais sous-létaux) ainsi que de la définition claire et adéquate des critères d'acceptabilité.

4.2.1 Interférence

La notion d'interférence comprend les facteurs susceptibles de biaiser le résultat ou de nuire à sa détermination. Un ensemble de facteurs peut interférer ou moduler le résultat de toxicité tels que le pH, l'oxygène dissous, la dureté, les matières en suspension, la couleur, la présence d'azote et de phosphore dans les essais de phytotoxicité, l'introduction de contaminants par des mauvaises pratiques de laboratoire, etc.

Il faut toutefois mentionner que la chimie propre à un échantillon en fait partie intégrante et que dans certains cas la toxicité observée peut être causée par des facteurs chimiques (pH extrême, DBO élevée, etc.) se situant hors des limites de tolérance de l'organisme.

Les facteurs d'interférence doivent être identifiés et pris en compte dans la réalisation des essais et l'interprétation des résultats, le cas échéant.

4.2.2 Variabilité des groupes de contrôle

Le suivi historique des groupes de contrôle permet de documenter la variabilité des réponses biologiques pour une méthode spécifique et les conditions d'application propres au laboratoire.

Ce suivi permet par la suite de déterminer le seuil d'effet de la méthode (pour les essais sous-létaux essentiellement) et d'établir les critères d'acceptabilité en fonction de la variabilité des réponses biologiques dans les contrôles.

4.2.3 Détermination du seuil d'effet de la méthode

Le seuil d'effet devrait figurer dans la méthode comme un élément de validation au même titre que la limite de détection pour les méthodes d'analyse chimique. Ce seuil démontre la capacité de l'essai à détecter un effet significatif en fonction du paramètre d'effet utilisé dans un contexte de gestion.

Il faut bien distinguer les expressions *seuil d'effet analytique*, *seuil d'effet réglementaire* et *seuil d'effet écologique*.

Le *seuil d'effet analytique* est le niveau d'inhibition le plus faible décelable en laboratoire à l'aide d'une méthode spécifique et standardisée et qui est significativement différent des groupes de contrôle pour un niveau de confiance donné. Il varie selon l'espèce utilisée, la réponse biologique mesurée

et le schéma expérimental (nombre de replica, durée d'exposition, etc.) et correspond à la limite de détection (statistique) de la méthode.

Le calcul du seuil d'effet est basé sur la variabilité des réponses dans les groupes de contrôle et se calcule comme suit :

$$\frac{s_x t}{\bar{x}} \times 100$$

où s_x : écart type de n valeurs de contrôle recueillies la même journée exprimées en réponses biologiques (ex. : densité cellulaire);

t : valeur de la table de Student pour $n-1$ degrés de liberté et $\alpha = 0,05$;

\bar{x} : moyenne arithmétique d'une série de mesures.

Le seuil d'effet doit être déterminé à plusieurs reprises à des jours différents et sur une période de temps suffisamment longue de façon à obtenir un seuil d'effet moyen représentatif de la méthode. La valeur de n doit être égale ou supérieure à 10. Une valeur de n se situant entre 10 et 20 semble optimale, puisque la valeur de t diminue rapidement quand l'effectif s'accroît entre 2 et 20 et plus particulièrement entre 2 et 10. Au-delà de 20, la valeur de t ne diminue que très lentement.

Le seuil d'effet doit être documenté de façon à bien connaître le niveau de signification des réponses d'inhibition. Une CI_p correspondant au niveau du seuil d'effet (ou arrondie près de cette valeur) doit être utilisée en remplacement de la CSEO.

Le *seuil d'effet réglementaire* correspond essentiellement au niveau d'effet toléré en fonction de considérations de nature écologique, économique, technologique et sociale. Il peut être fixé à une valeur supérieure au seuil analytique, mais ne doit jamais être fixé à une valeur inférieure.

Le *seuil d'effet écologique* est le niveau de réponse biologique pour les populations et les communautés; il est significativement différent de la variabilité naturelle. Le seuil d'effet analytique peut, le cas échéant, être plus faible ou plus élevé que le seuil d'effet écologique. Ceci est également vrai pour la CSEO. Le seuil d'effet écologique est important dans les contextes d'évaluation du danger et du risque écotoxicologique associés à une contamination.

4.2.4 Répétabilité et reproductibilité

La *répétabilité* se définit comme suit : pour un niveau donné, l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour 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 ou le système d'essai.

La répétabilité doit donc indiquer la variabilité obtenue dans un même laboratoire pour des échantillons représentatifs des analyses généralement effectuées dans ce laboratoire. La notion de répétabilité présente un intérêt plus limité si elle n'est pas en relation directe avec le type de matrice analysée.

Également, la variabilité d'un paramètre d'effet donné (CI₁₅ 96 h; CI₅₀ 96 h; CI₉₀ 96 h; etc.) présentera une ampleur différente selon sa position sur la relation concentration-réponse. L'intervalle de confiance de la mesure de la CI₅₀ située au milieu de la courbe concentration-réponse sera plus réduit que celui de la mesure de la CI₁₅ située au début de la relation. Dans un contexte de validation de méthode, la répétabilité doit être déterminée pour le paramètre d'effet principal de l'essai.

Pour les essais de toxicité, la répétabilité est déterminée à l'aide de toxiques de référence ou d'effluents artificiels et est généralement appliquée sur des jours différents. Un minimum de 10 données est nécessaire avant d'établir la répétabilité.

La *reproductibilité* se définit comme suit : pour un niveau donné, l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour 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. La reproductibilité est déterminée en participant à des études inter-laboratoires ou des études de performance avec des tiers. Les laboratoires n'ont pas l'obligation de déterminer la reproductibilité. Les évaluations de la performance analytique effectuées à l'intérieur du programme d'accréditation peuvent entre autres être utilisées à cet effet.

La répétabilité et la reproductibilité s'expriment à l'aide de l'intervalle de confiance de la moyenne arithmétique, en fonction de l'écart type (s), à un niveau de confiance donné (95 %) et pour un nombre de mesures (n).

Cet intervalle est défini comme suit :

$$\bar{x} - \frac{t_{(0,975;n-1)}S}{\sqrt{n}} < m < \bar{x} + \frac{t_{(0,975;n-1)}S}{\sqrt{n}}$$

où

- n : nombre de mesures;
- m : espérance mathématique de la moyenne de la population;
- \bar{x} : moyenne arithmétique d'une série de mesures;
- s : écart type d'une série de mesures;
- $t_{(0,975;n-1)}$: variable de la distribution de Student au niveau de confiance 95 % pour $n-1$ degrés de liberté.

4.2.5 Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité sont, pour la plupart, spécifiés dans les méthodes d'analyse. Ces critères doivent être élaborés en tenant compte des cinq éléments suivants :

- acceptabilité des groupes de contrôle;
- conformité du résultat de l'essai avec toxique de référence;
- état de santé et conformité des organismes vivants;
- qualité de la relation concentration-réponse;
- respect des conditions d'essai.

4.3 Gamme de dilutions et calcul des paramètres d'effet (CI_{50} , CI_{20} , CI_{15} , CSEO-CMEO)

Le choix de la gamme de dilutions doit permettre une détermination suffisamment précise et fiable du paramètre d'effet choisi. En d'autres termes, l'étalement des dilutions doit concorder avec la zone qui se situe entre 0 et 100 % d'effet et générer des résultats d'effet partiel. La gamme de dilutions doit aussi s'ajuster sur le principal type d'effet recherché, telle l'inhibition de la croissance ou de la reproduction.

Différents facteurs de dilution peuvent être adéquats, mais le facteur de 0,5 fréquemment appliqué entraîne souvent une gamme de dilutions trop étendue pour obtenir une bonne progression dans les réponses d'inhibition. Une gamme de dilutions plus serrée est recommandée pour obtenir une bonne estimation des CI ou de la CSEO. Une solution peut consister soit à faire un essai préliminaire si le délai de conservation de l'échantillon le permet ou à démarrer l'essai avec plus de dilutions et à éliminer au deuxième jour, par exemple, les concentrations trop fortes causant beaucoup de mortalité.

Il est essentiel d'avoir une série de concentrations relativement rapprochées dans la zone située au début de la relation concentration-réponse, particulièrement si le calcul est basé sur un test d'hypothèse (ANOVA). Si le niveau de toxicité de l'échantillon est déjà anticipé, il est d'autant plus facile de déterminer une gamme de dilutions adéquate.

Dans le cas de la détermination de la CSEO et de la CMEO, il faut prendre en considération les points suivants :

- le calcul de la CSEO et de la CMEO est très dépendant du schéma expérimental (nombre de concentrations, nombre de replica, etc.) et de la variabilité des réponses dans les échantillons de contrôle;
- la CSEO et la CMEO sont obligatoirement des concentrations testées;
- aucun intervalle de confiance ne peut être calculé.

En conséquence, il est donc nécessaire de réduire l'écart entre la CSEO et la CMEO par l'utilisation de concentrations rapprochées. De même, il peut être utile d'augmenter le nombre de contrôles à cinq ou six de façon à augmenter le pouvoir de discrimination statistique. Le pourcentage d'effet observé doit être rapporté avec les résultats de CSEO et de CMEO. Compte tenu des inconvénients liés à la détermination de la CSEO et de la CMEO, il est fortement recommandé d'utiliser plutôt la CI_p .

Si la CI_p est calculée par la méthode d'interpolation linéaire (IC_p), il est également important d'obtenir des réponses d'inhibition dans la zone du paramètre d'effet. Cette méthode utilise uniquement les deux réponses d'inhibition qui se situent de part et d'autre au paramètre d'effet recherché. Une gamme de dilutions avec moins de concentrations peut convenir à condition que les réponses d'inhibition soient bien étalées, par exemple entre 10 et 80 % d'inhibition. Si la méthode des gamma est utilisée, une série avec moins de 10 concentrations peut convenir si les données d'inhibition sont bien étalées.

Des procédures de régression non linéaire peuvent également être utilisées pour le calcul des CI_p telles que celles proposées par Bruce et Versteeg (1992) et Bailer et Oris (1997). Cette approche permet de tracer la relation concentration-réponse selon le modèle correspondant le plus précisément aux réponses biologiques (*best curve fitting*) et utilise de façon optimale les résultats de l'essai. Une série de cinq concentrations peut suffire si des réponses d'inhibition partielle sont disponibles pour au moins deux concentrations.

4.4 Organismes vivants

4.4.1 Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

Les truites arc-en-ciel utilisées pour les essais doivent provenir d'une pisciculture fiable et être exemptes de maladies. À cet égard, la pisciculture doit être en mesure de démontrer l'état de santé (certificat de vétérinaire, registre de suivi, etc.) du lot d'organismes. La provenance, l'âge, l'identification taxinomique, la date d'achat et la quantité achetée doivent être notés dans un registre. Les poissons doivent être acclimatés au moins deux semaines avant les essais et présenter un pourcentage de mortalité inférieur à 2 % dans les sept jours précédant l'essai. Si le taux de mortalité dans le bassin de détention est supérieur à 10 % par semaine, le lot de poissons ne doit pas être utilisé pour les essais. Le pH de l'eau de détention doit être entre 6,5 et 8,5. Les bassins de détention doivent être entretenus correctement.

Le laboratoire doit maintenir un registre de suivi des poissons en détention contenant les renseignements suivants :

- provenance et identification taxinomique;
- date de réception;
- numéro de lot, longueur et poids à l'arrivée;
- nombre de truites mortes/jour;

- suivi du nombre de truites;
- suivi de la longueur et du poids;
- type, quantité et fréquence d'alimentation;
- calcul de la charge en g/l/j;
- comportements anormaux;
- observations visuelles pertinentes;
- débit/taux de renouvellement.

Le laboratoire doit également effectuer un suivi chimique de base de l'eau dans les bassins de détention pour les paramètres figurant au tableau suivant :

Paramètres	Fréquence	Critère de qualité
Température	1/jour	13-17 °C
Oxygène dissous	3/semaine	> 80 % de saturation
pH	2/semaine	6,5-8,5
Azote ammoniacal	1/semaine	< 1,0 mg N/l
Nitrites	1/semaine	< 0,02 mg N/l
Intensité lumineuse ⁽¹⁾	1/2 semaines	100-500 lux

(1) L'intensité lumineuse est vérifiée à la surface de l'eau des bassins.

Pour l'azote ammoniacal et les nitrites, la fréquence peut être réduite à une fois par mois si le laboratoire démontre que le traitement d'eau utilisé permet de bien contrôler ces paramètres.

4.4.2 Daphnie (*Daphnia magna*)

La méthode utilisée pour l'élevage des daphnies doit s'appuyer sur une méthode documentée qui permet d'obtenir un élevage en santé. Le laboratoire doit être en mesure de démontrer que le niveau de productivité est adéquat et qu'il atteste de la santé générale des organismes.

Le laboratoire doit maintenir un registre de suivi de l'élevage de daphnies qui inclut les renseignements suivants :

- confirmation de l'identification taxinomique;
- provenance de la souche et date de mise en élevage;
- type, quantité et fréquence d'alimentation;
- présence d'éphippies;
- mortalité chez les daphnies adultes;
- fréquence des renouvellements d'eau;

- productivité des élevages*;
- autres observations pertinentes.

* Un élevage en santé doit présenter un ratio jeunes/adultes élevé et les femelles doivent avoir au plus 12 jours à la première portée. Le nombre de néonates par portée peut être variable. Cependant, la moyenne doit se situer à près de 15 pour les daphnies âgées de deux à cinq semaines. Pour documenter cet aspect de l'élevage, des néonates peuvent être isolées dans des bechers et incubées dans les mêmes conditions que l'élevage. Le temps requis pour la première portée et le nombre moyen de néonates par portée peuvent ainsi être déterminés. Le suivi quotidien de la productivité des élevages peut être effectué par une simple évaluation qualitative.

Le laboratoire doit également effectuer un suivi chimique de base de l'eau dans les élevages pour les paramètres suivants et aux fréquences présentées au tableau qui suit :

Paramètre	Fréquence	Critère de qualité
Température	1/jour	18-22 °C
Oxygène dissous	2/semaine	> 80 % de saturation
pH	2/semaine	6,5-8,5
Dureté ⁽¹⁾	1/semaine	160-180 mg CaCO ₃ /l
Intensité lumineuse ⁽²⁾	1/2 semaines	500-1100 lux

(1) Sauf si la dureté est ajustée préalablement à l'usage de l'eau.

(2) L'intensité lumineuse est mesurée à la surface des aquariums.

4.4.3 Tête-de-boule (*Pimephales promelas*)

Les poissons utilisés pour les tests peuvent provenir d'un élevage maintenu au laboratoire ou d'un fournisseur externe dans la mesure où une démonstration de la qualité du matériel biologique utilisé peut être faite. Les renseignements suivants relatifs à l'achat d'œufs ou de larves de tête-de-boule doivent être disponibles :

- date d'achat et de réception;
- fournisseur;
- état du matériel biologique à la réception (pourcentage de mortalité);
- température de l'eau à la réception;
- confirmation de l'identification taxinomique;
- température et conditions chimiques de l'élevage source;
- nombre d'œufs ou de larves.

Il est important de respecter l'exigence d'acclimatation qui demande un changement d'au plus 3 °C par jour. L'achat d'œufs ou de larves chez un fournisseur externe peut être problématique à cet égard, particulièrement en hiver.

Pour les élevages maintenus au laboratoire, le suivi doit être consigné dans un registre avec les renseignements suivants :

- identification taxinomique;
- provenance;
- taux de renouvellement de l'eau;
- type d'alimentation, quantité et fréquence;
- âge des reproducteurs à la première ponte;
- nombre moyen d'œufs par ponte;
- mortalité chez les individus juvéniles et adultes;
- taux d'éclosion des œufs (moyenne);
- présence de maladie ou d'infection;
- densité de chargement dans les aquariums.

Un suivi de la qualité de l'eau d'élevage doit également être effectué pour les paramètres suivants et selon les fréquences présentées au tableau qui suit :

Paramètre	Fréquence	Critère de qualité
Température	1/jour	23-27 °C
Oxygène dissous	3/semaine	≥ 80 % de saturation
pH	2/semaine	7,0-8,5
Azote ammoniacal	1/semaine	< 0,5 mg N /l
Nitrites	1/semaine	< 0,02 mg N /l
Intensité lumineuse ⁽¹⁾	1/2 semaines	400-500 lux

(1) L'intensité lumineuse est vérifiée à la surface des aquariums.

Pour l'azote ammoniacal et les nitrites, la fréquence peut être réduite à une fois par mois si le laboratoire démontre que le traitement d'eau utilisé permet de bien maîtriser ces paramètres.

4.4.4 Algue verte (*Selenastrum capricornutum*)

Un suivi doit être effectué sur les souches d'algues utilisées et les renseignements suivants doivent être notés.

- Identification taxinomique de l'espèce : cette confirmation peut être établie à l'aide d'un certificat émis par le fournisseur si le laboratoire achète régulièrement des nouvelles souches. Si la même souche de

S. capricornutum est repiquée et conservée au laboratoire depuis une longue période de temps, il est nécessaire d'avoir le certificat original de confirmation ou de faire certifier la souche. Il est possible de faire certifier, à un coût raisonnable, une souche par l'*University of Toronto Culture Collection* (UTCC).

- La souche mère d'algues doit être observée périodiquement (une fois par mois) pour s'assurer de sa monospécificité ainsi que de l'état de santé général de la population; l'observation microscopique permet de détecter la présence d'autres espèces d'algues qui auraient pu contaminer la culture ainsi que des anomalies indicatrices de problèmes potentiels (cellules moribondes, anomalies structurales, manque de coloration, etc.).
- La souche mère peut être préservée en milieu liquide ou sur gélose à 4 °C pendant une longue période de temps, ce qui s'avère utile lorsque le laboratoire n'effectue pas d'essai pendant de longues périodes. Lorsque le laboratoire effectue des analyses sur une base régulière, la souche mère doit être repiquée de façon aseptique environ une fois par semaine dans un milieu frais de façon à toujours disposer de cellules en phase logarithmique de croissance pour le départ des tests. Des dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA) doivent être effectués régulièrement pour s'assurer que les cultures ne sont pas contaminées. La performance de la population algale souche dans les conditions de laboratoire doit également être connue. Une fois aux trois mois, la courbe de croissance de la population doit être établie en traçant le graphique de la densité cellulaire (cellules $\times 10^6$ /ml) en fonction du temps en jours.

4.4.5 Cériodaphnie (*Ceriodaphnia dubia*)

Pour les élevages maintenus au laboratoire, le suivi doit être consigné dans un registre avec les renseignements suivants :

- identification taxinomique (confirmation par observation microscopique à l'aide d'une clé d'identification);
- provenance des organismes;
- densité d'organismes par contenant d'élevage;
- fréquence des renouvellements d'eau;
- type d'alimentation, quantité et fréquence;
- nombre moyen de néonates par ponte;
- pourcentage de mortalité chez les femelles;
- présence d'éphippies.

Un suivi sur la qualité de l'eau d'élevage doit également être effectué pour les paramètres suivants et selon les fréquences présentées au tableau qui suit :

Paramètre	Fréquence ⁽¹⁾	Critère de qualité
Température	1/jour	25 ± 1 °C
Oxygène dissous	2/semaine	90-100 % de saturation
pH	2/semaine	6,5-8,5
Intensité lumineuse ⁽²⁾	1/2 semaines	500-600 lux

(1) Les vérifications d'oxygène dissous et de pH peuvent être faites au moment des renouvellements d'eau et occasionnellement dans les contenants d'élevage.

(2) L'intensité lumineuse est vérifiée à la surface des contenants d'élevage.

4.5 Conditions d'essai

Le laboratoire doit s'assurer de respecter les conditions spécifiées dans les protocoles d'analyse et dans ces lignes directrices. L'ensemble des renseignements pertinents aux conditions d'essai doit être enregistré de façon claire et précise.

4.6 Échantillonnage et conservation des échantillons (section 5.7)

L'échantillonnage, le mode de conservation et le délai de conservation peuvent influencer directement le niveau de toxicité d'un échantillon. Le préleveur doit tenir compte de certaines considérations techniques pour le prélèvement des échantillons.

Les échantillons doivent parvenir au laboratoire le plus rapidement possible (moins de 24 h). Le démarrage des tests dans les meilleurs délais est considéré comme une bonne pratique de laboratoire susceptible de donner les résultats les plus représentatifs des échantillons. Les délais maximaux de conservation sont précisés dans les protocoles d'analyse. Ils sont généralement de trois jours (essais avec *Selenastrum*, tête-de-boule et cériodaphnie) ou de cinq jours (truite arc-en-ciel et daphnie). Dans tous les cas, il est fortement recommandé de démarrer les essais à l'intérieur des 72 heures qui suivent le prélèvement.

Les échantillons ne doivent pas geler entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire. Ils doivent être conservés à une température entre 1 et 8 °C (idéalement 4 °C) à l'obscurité.

4.7 Système informationnel (section 5.4.7)

Les ordinateurs et les moyens automatisés sont entretenus pour assurer leur bon fonctionnement; ils sont placés dans un environnement et maintenues en état de fonctionnement nécessaires à la préservation de l'intégrité des données relatives aux analyses. Des procédures appropriées sont établies et appliquées pour la préservation et la sécurité des données, y compris l'interdiction d'accès sans autorisation aux fichiers informatiques et de leur modification sans autorisation.

Les programmes informatiques utilisés pour le calcul des paramètres d'effet doivent provenir d'organismes reconnus; s'il s'agit de programmes internes, ils doivent être validés et vérifiés.

Le laboratoire doit s'assurer que les programmes sont fiables et que les résultats reproduits sont constants. Pour s'assurer de la fiabilité des programmes, le laboratoire peut procéder à des répétitions de calcul avec la même série de données et comparer les résultats. De même, il est possible de comparer les résultats obtenus à l'aide d'un programme informatique avec ceux obtenus par un calcul manuel.

5 TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (sections 4.12, 5.8 et 5.10)

Le mode d'enregistrement des données constitue un facteur important pour l'obtention de résultats fiables. Tous les renseignements concernant les analyses doivent être enregistrés et être disponibles de façon que la direction du laboratoire puisse démontrer que ses activités sont contrôlées. Le laboratoire doit avoir un système défini par écrit permettant d'identifier de façon unique les échantillons à analyser, afin d'assurer qu'à aucun moment il ne puisse y avoir de confusion sur l'identité de ces échantillons. Tous les enregistrements doivent être effectués à l'aide d'un crayon à l'encre.

5.1 Demande d'analyse et enregistrement des échantillons au laboratoire

Le laboratoire doit mettre en place un système d'enregistrement des échantillons qui permet de conserver tous les renseignements nécessaires pour assurer une traçabilité adéquate de l'information. Pour tous les échantillons, les renseignements minimaux suivants doivent être disponibles sur support papier ou informatique :

- date du prélèvement;
- identification de l'échantillon;
- identification du point de prélèvement;
- identification et adresse du préleveur;
- identification du client *;
- nature de l'échantillon;
- paramètres demandés;
- date de réception;
- mode de conservation;
- numéro de projet (le cas échéant);
- numéro de laboratoire;
- date de réception;
- nombre de contenants et volume des échantillons;
- commentaires appropriés.

* Sans objet pour les laboratoires qui n'offrent pas de service à la clientèle externe.

5.2 Feuilles de travail

L'imprimé des calculs produits à l'aide de programmes informatiques doit accompagner les feuilles de travail, le cas échéant. Celles-ci doivent contenir les renseignements suivants :

- **Truite arc-en-ciel, létalité CL₅₀ 96 heures :**

- numéro de laboratoire;
- date d'analyse;
- température, pH, oxygène dissous et conductivité de l'échantillon avant le début de l'essai;
- traitement de l'échantillon;
- lot et âge des poissons;
- longueur à la fourche et poids frais moyen;
- densité de chargement;
- série de dilutions (% V/V);
- pH, oxygène dissous et température à 0 et 96 heures dans le contrôle et toutes les concentrations;
- mortalité à 24, 48, 72 et 96 heures;
- résultats exprimés en pourcentage de mortalité dans chacune des concentrations et pour le contrôle;
- initiales de l'analyste.

- **Daphnies, létalité CL₅₀ 48 heures :**

- numéro de laboratoire;
- date de l'analyse;
- lot d'organismes;
- température, pH, oxygène dissous, conductivité et dureté de l'échantillon avant le début de l'essai;
- traitement de l'échantillon;
- série de dilutions (% V/V);
- pH et oxygène dissous au début et à la fin de l'essai dans le contrôle et dans quelques concentrations d'essai;
- température dans quelques solutions d'essai au début et à la fin de l'essai;
- résultats exprimés en pourcentage de mortalité et d'immobilité pour chacune des concentrations et pour le contrôle;
- initiales de l'analyste.

- **Tête-de-boule, létalité CL₅₀ 96 heures :**

- numéro de laboratoire;
- date d'analyse;
- température, pH, oxygène dissous, conductivité et apparence de l'échantillon avant le début de l'essai;
- traitement de l'échantillon;

- lot et âge des poissons;
 - alimentation en cours d'essai (type, quantité, fréquence);
 - série de dilutions (% V/V);
 - pH et oxygène dissous à 0, 48 et 96 heures dans le contrôle et toutes les concentrations;
 - température dans le témoin et dans trois concentrations d'essai au début et à la fin de l'essai;
 - mortalité à 24, 48, 72 et 96 heures;
 - résultats exprimés en pourcentage de mortalité dans chacune des concentrations et pour le contrôle;
 - initiales de l'analyste.
- **Tête-de-boule, inhibition de la croissance CI_{25} 7 jours et CL_{50} 7 jours**
 - numéro de laboratoire;
 - date d'analyse;
 - température, pH, oxygène dissous, conductivité, dureté et apparence des échantillons originaux avant le début de l'essai;
 - nombre d'échantillons utilisés s'il y a eu plus d'un prélèvement ou nombre de sous-échantillons s'il y a eu un seul prélèvement;
 - traitement de l'échantillon;
 - lot et âge des larves;
 - alimentation en cours d'essai (type, quantité, fréquence);
 - série de dilutions (% V/V);
 - pH, oxygène dissous et température au début et à la fin de chaque période de 24 heures pour le témoin et pour trois concentrations;
 - conductivité au début de chaque période de 24 heures dans le témoin et dans trois concentrations;
 - renouvellement des solutions d'essai (fréquence et pourcentage);
 - nombre de larves par contenant et mortalité quotidienne;
 - poids sec moyen après sept jours pour chacun des replica de chaque traitement;
 - résultats exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance et pourcentage de mortalité dans chacune des concentrations et dans le contrôle;
 - initiales de l'analyste.
 - **Algue verte *Selenastrum* (MENV), inhibition de la croissance CI_{25} 96 heures et CI_{50} 96 heures :**
 - numéro de laboratoire;
 - date d'analyse;
 - température, pH, oxygène dissous, conductivité et apparence de l'échantillon avant le début de l'essai;
 - traitement de l'échantillon;
 - âge de la culture;
 - compte cellulaire de la culture;
 - compte cellulaire de l'inoculum;

- compte de l'isoton au début et à la fin;
 - température dans l'incubateur au début et à la fin;
 - série de dilutions (% V/V);
 - pH au début et à la fin du test dans le contrôle et dans quelques concentrations;
 - compte cellulaire après 96 heures dans chaque concentration et dans le contrôle;
 - initiales de l'analyste.
- **Algue verte *Selenastrum* (Env. Can.), inhibition de la croissance CI₂₅ 72 heures et CI₅₀ 72 heures :**
 - numéro de laboratoire;
 - date d'analyse;
 - température, pH, oxygène dissous, conductivité et apparence de l'échantillon avant le début de l'essai;
 - traitement de l'échantillon;
 - âge de la culture;
 - compte cellulaire de la culture;
 - compte cellulaire de l'inoculum;
 - compte de l'isoton au début et à la fin;
 - type et nombre de microplaques utilisées et configuration;
 - usage de pellicule d'étanchéité;
 - scellage des microplaques individuelles;
 - estimation des pertes par évaporation;
 - température dans l'incubateur au début et à la fin;
 - série de dilutions (% V/V);
 - pH d'une cupule témoin au début et à la fin de l'essai;
 - compte cellulaire après 72 heures dans chaque concentration et dans le contrôle normalisé ou absorbance (dans ce cas, les mesures d'absorbance doivent être validées par des numérations cellulaires comme prévu dans la méthode);
 - initiales de l'analyste.
- **Cériodaphnie, inhibition de la reproduction CI₂₅ 7 jours – CL₅₀ 7 jours - CSEO-CMEO :**
 - numéro de laboratoire;
 - date d'analyse;
 - température, pH, oxygène dissous, conductivité, dureté et apparence de l'échantillon avant le début de l'essai;
 - nombre d'échantillons utilisés;
 - traitement de l'échantillon;
 - lot et âge des cériodaphnies;
 - alimentation en cours d'essai (type, quantité, fréquence);
 - série de dilutions (% V/V);
 - température, pH et oxygène dissous au début et à la fin de chaque période de 24 heures dans le témoin et dans trois concentrations;

- conductivité au début de chaque période de 24 heures dans le témoin et dans trois concentrations;
- renouvellement des solutions d'essai (fréquence et %);
- nombre de cériodaphnies de première génération vivantes quotidiennement;
- nombre de néonates vivantes quotidiennement;
- résultats exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance et pourcentage de mortalité dans chacune des concentrations et dans le contrôle;
- initiales de l'analyste.

5.3 Certificat d'analyse

Le certificat d'analyse contient les sections et les renseignements suivants :

- **Une section « en-tête » comprenant :**

- un titre;
- le nom et l'adresse du laboratoire;
- un numéro de dossier et un numéro de laboratoire;
- le nom et l'adresse du client;
- le nom du projet;
- les dates de prélèvement, de réception et d'analyse;
- le nom du préleveur;
- l'endroit du prélèvement;
- le mode de conservation;
- la méthode d'échantillonnage;
- l'identification de l'échantillon;
- la nature de l'échantillon;
- l'apparence de l'échantillon.

- **Une section « caractéristiques de l'échantillon » comprenant**

Les caractéristiques chimiques de l'échantillon avant le début de l'essai; les paramètres mesurés varient selon la méthode d'analyse, mais incluent généralement le pH, l'oxygène dissous, la conductivité et la température.

- **Une section « résultats » comprenant :**

- le résultat des paramètres d'effet pertinents à un essai donné exprimé dans l'unité appropriée;
- l'intervalle de confiance à 95 % du résultat si celui-ci est calculable;
- l'équivalent du résultat exprimé en unité toxique pour les échantillons liquides complexes.

- **Une section « conditions d'essai » comprenant :**

- le type d'essai;
- le traitement de l'échantillon (s'il y a lieu);
- l'espèce utilisée et sa provenance;

- l'état des organismes (âge, taille, etc.) selon la méthode;
 - le nombre d'organismes par concentration, le nombre de replica;
 - l'environnement d'essai;
 - les principales conditions d'essai (valeurs chimiques minimales et maximales, alimentation s'il y a lieu, eau de dilution, etc.);
 - le toxique de référence ou l'échantillon de référence utilisé;
 - le résultat le plus récent de contrôle de qualité;
 - la moyenne et les limites de $\pm 2s$ du diagramme de contrôle;
 - la méthode de calcul utilisée si le résultat est calculable;
 - la référence de la méthode utilisée.
- **Le certificat inclut également :**
 - la signature du superviseur autorisé du laboratoire et la date d'émission;
 - la numérotation de chacune des pages et le nombre total de pages;
 - toute divergence, ajout ou suppression par rapport à la méthode d'analyse utilisée;
 - un tableau contenant la gamme de dilutions et le pourcentage d'effet de chacune des mesures biologiques à chacune des concentrations.

5.4 Transcription et suivi des données pour les échantillons

Les auditeurs retraceront une série d'échantillons par domaine d'accréditation pendant la visite d'audit et vérifieront les éléments suivants :

- numéro de l'échantillon dans le registre d'entrée;
- date de prélèvement;
- date de réception;
- date d'analyse;
- paramètre(s) demandé(s);
- données brutes de la feuille de travail;
- calcul des résultats d'analyse;
- rapport d'analyse.

6 ASSURANCE DE LA QUALITÉ (sections 5.6 et 5.9)

L'assurance de la qualité comporte un ensemble d'activités effectuées de façon routinière qui permet d'assurer la qualité des opérations. Plus spécifiquement, le contrôle de qualité comporte des procédures appliquées de façon régulière qui attestent de la fiabilité des résultats d'analyse.

6.1 Éléments de contrôle de qualité

6.1.1 Essais avec toxique de référence ou échantillon de référence

Comme il est mentionné à la section 2.3, l'usage d'un toxique de référence permet de déterminer la précision des analyses, de faire un suivi de la

sensibilité des organismes vivants et de détecter ultérieurement les séquences d'analyse non conformes.

Le laboratoire doit effectuer sur une base régulière des essais avec des toxiques de référence pour déterminer la précision des analyses.

Ces essais doivent être effectués au moins aux fréquences suivantes :

- **Létalité avec la truite arc-en-ciel et le tête-de-boule :**

Minimum de une fois par mois ou 1/10 essais, jusqu'à concurrence de une fois par semaine si le laboratoire effectue plus de 10 essais par mois. Un essai par série d'essais si le laboratoire effectue moins de un essai par mois. Un essai par nouveau lot d'organismes.

- **Létalité avec la daphnie et inhibition de la croissance avec l'algue verte *Selenastrum* :**

Minimum de deux fois par mois ou 1/10 essais, jusqu'à concurrence de une fois par semaine si le laboratoire effectue plus de 10 essais par deux semaines. Un essai par série d'essais si le laboratoire effectue moins de un essai par deux semaines.

- **Inhibition de la croissance avec le tête-de-boule et inhibition de la reproduction avec la cériodaphnie :**

Minimum de une fois par mois ou 1/5 essai, jusqu'à concurrence de deux fois par mois si le laboratoire effectue plus de dix essais par mois. Un essai par série d'essais si le laboratoire effectue moins de un essai par mois.

Des essais supplémentaires avec des toxiques de référence peuvent être nécessaires s'il y a des anomalies telles qu'une hausse anormale du taux de mortalité dans les contrôles, une modification de la qualité de l'eau, des anomalies ou tendances liées au diagramme de contrôle (voir section 6.1.2), etc.

Les résultats issus d'essais avec des toxiques de référence doivent être compilés à l'aide de tous les renseignements pertinents rendus disponibles aux fins de consultation.

6.1.2 Diagramme de contrôle

Les résultats obtenus avec les toxiques de référence doivent être présentés sous forme de diagramme de contrôle (moyenne et limites $\pm 2s$ et $\pm 3s$) en utilisant les paramètres d'effet de l'essai. Par exemple, pour les essais d'inhibition de la croissance avec le tête-de-boule et d'inhibition de la reproduction avec la cériodaphnie, la CI_{25} 7 jours et la CL_{50} 7 jours doivent être utilisées.

La méthodologie, les considérations statistiques pour l'établissement de ces diagrammes et leur usage sont explicités dans les documents USEPA (2002) et Environnement Canada (1990).

Le coefficient de variation pour les essais avec toxique de référence ne doit pas dépasser 30 %, bien qu'il puisse arriver selon la nature du toxique de référence et le type d'essai que la variabilité soit supérieure (voir section 2.3).

Une recherche des causes et des mesures de correction doit être effectuée si le diagramme de contrôle présente des anomalies ou des tendances. Ces données doivent être documentées.

6.1.3 Groupes de contrôle

Les exigences quant au suivi des groupes de contrôle pour la validation de la méthode d'analyse sont précisées aux sections 4.2.2. et 4.2.3.

Chaque essai de toxicité doit être accompagné d'un groupe de contrôle. Des critères spécifiques à chaque essai sont précisés dans les protocoles d'analyse.

6.1.4 Critères d'acceptabilité

Le laboratoire doit définir à l'intérieur d'un document les modalités de gestion des critères d'acceptabilité. Il doit, en outre, préciser les mesures ou les décisions qui sont prises lors du non-respect d'un critère. Ces critères doivent être relatifs à l'acceptabilité des échantillons, à la santé des organismes vivants, aux groupes de contrôle, aux résultats d'essai avec toxique de référence et aux conditions d'essai.

La plupart des critères d'acceptabilité sont précisés dans les méthodes d'analyse. Toutefois, le laboratoire doit définir des critères appropriés pour la variabilité des réponses biologiques dans les groupes de contrôle (pour les essais sous-létaux), lesquels sont basés sur le suivi historique des réponses biologiques. Un diagramme de contrôle peut être utilisé à cet effet (ex. : densités cellulaires dans les groupes de contrôle avec *Selenastrum* obtenues pour des journées différentes) et des limites d'acceptabilité peuvent être fixées à $\pm 2s$ de la moyenne historique. La moyenne doit être issue de données générées sur une période de temps suffisamment longue pour être représentative des conditions d'application de la méthode dans un laboratoire donné. À noter que, dans cet exemple, le critère de < 20 % de variation entre les replica du contrôle demeure applicable.

Dans le cas où la CSEO et la CMEO seraient calculées, les résultats sont acceptables seulement si l'écart entre ces deux paramètres d'effet est limité par l'usage d'une gamme de dilutions suffisamment serrées pour obtenir une bonne progression des réponses d'inhibition dans la zone de la relation concentration-réponse située entre 0 et 50 % d'effet. Le pourcentage d'effet observé doit être rapporté avec les résultats de CSEO et CMEO.

DÉFINITIONS

CL₅₀ : Concentration létale pour 50 % des organismes exposés pour une durée d'exposition déterminée.

CI_p : Concentration qui inhibe un pourcentage donné d'une réponse biologique de type quantitatif (croissance, bioluminescence, etc.).

CMEO : Concentration minimale causant un effet observable.

CSEO : Concentration sans effet observable.

Paramètre d'effet : Mode d'expression mesurable d'un effet biologique pour une durée d'exposition déterminée (c.-à-d. : CI₂₅ 7 jours inhibition de la croissance).

Seuil d'effet de la méthode : Niveau d'inhibition le plus faible qui peut être détecté et qui est significativement différent des groupes de contrôle pour un niveau de confiance donné.

BIBLIOGRAPHIE

- BAILER, H.J., and J.T. ORIS, *Estimating inhibition concentrations for different response scales using generalized linear models*, Environ Toxicol Chem 16 (7) : 1554–1559, 1997.
- BRUCE, R.D., and D.J. VERSTEEG, *A statistical procedure for modeling continuous toxicity data*, Environ Toxicol Chem 11 : 1485-1492, 1992.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Champs et domaines d'accréditation en vigueur (DR-12-CDA)*, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Détermination de la toxicité létale chez la daphnie CL₅₀ 48h Daphnia magna, MA. 500 - D. mag. 1.0*, Ministère de l'Environnement du Québec, édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Détermination de la toxicité létale CL₅₀ 96 h chez la truite arc-en-ciel Oncorhynchus mykiss. MA. 500 - O. myk 1.0*, Ministère de l'Environnement du Québec, édition courante.
- CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue Selenastrum capricornutum, MA. 500 - S. cap. 2.0*, Ministère de l'Environnement du Québec, édition courante.
- CONSEIL CANADIEN DES MINISTRES DE L'ENVIRONNEMENT (CCME), *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, Winnipeg, Le Conseil, 1999.
- 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, Ottawa, Rapport SPE 1/RM/12, août 1990.
- ENVIRONNEMENT CANADA, *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule*, Conservation et protection, Ottawa, Rapport SPE 1/RM/22, février 1992 avec modifications de novembre 1997.
- ENVIRONNEMENT CANADA, *Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère Ceriodaphnia dubia*, Conservation et protection, Ottawa, Rapport SPE 1/RM/21, février 1992 avec modifications de novembre 1997.
- ENVIRONNEMENT CANADA, *Méthode d'essai biologique : essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce Selenastrum capricornutum*, Conservation et protection, Ottawa, Rapport SPE 1/RM/25, novembre 1992 avec modifications de novembre 1997.
- 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, deuxième édition, 2000.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT, *Critères de qualité de l'eau de surface au Québec*.
Direction du suivi de l'état de l'Environnement, Ministère de l'Environnement, Québec,
2001, 430 p.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT, *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse
environnementale*, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2002 (mis à
jour en décembre 2003), 44 p.

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