

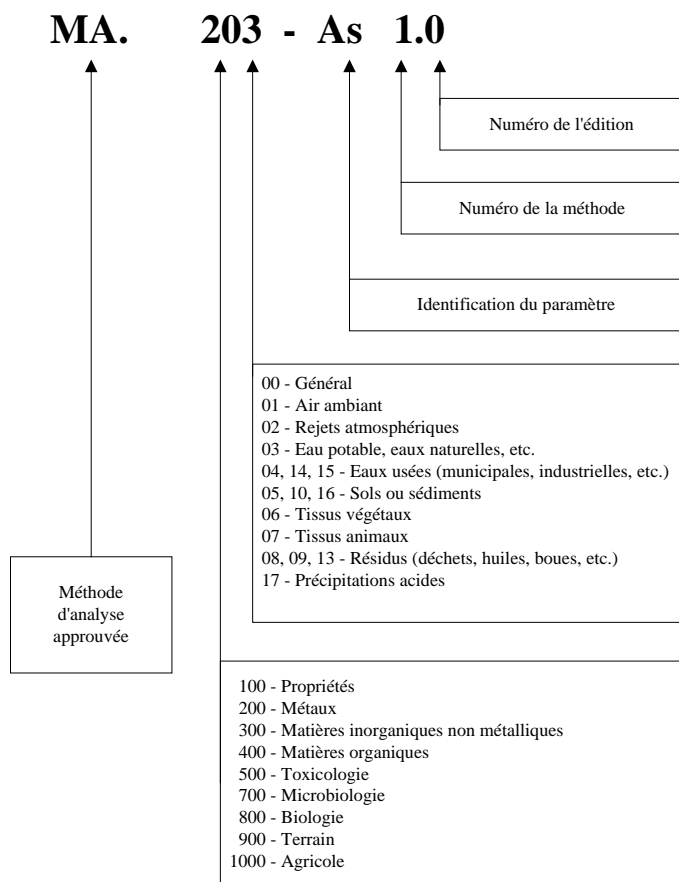
Méthode d'analyse



MA. 500 – D.mag 1.1

Détermination de la toxicité létale CL_{50} 48h
Daphnia magna

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

Référence à citer :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.
Détermination de la toxicité létale CL₅₀ 48h Daphnia magna. MA. 500 – D.mag. 1.1,
Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre
les changements climatiques du Québec, 2016, 18 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
2700, rue Einstein, bureau E.2.220
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301
Télécopieur : 418 528-1091
Courriel : ceaeq@mddelcc.gouv.qc.ca

© Gouvernement du Québec, 2016

TABLE DES MATIÈRES

1.	DOMAINE D'APPLICATION	4
2.	PRINCIPE ET THÉORIE	4
3.	FIABILITÉ	4
	3.1. Interférences	5
4.	PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	5
5.	APPAREILLAGE	5
6.	RÉACTIFS	6
7.	ORGANISMES BIOLOGIQUES	7
	7.1. Espèce et souche	7
	7.2. Manipulation des daphnies	7
8.	PROTOCOLE D'ANALYSE	8
	8.1. Préparation des échantillons	8
	8.2. Eau de dilution	8
	8.3. Conditions d'essai	8
	8.4. Choix des dilutions	8
	8.5. Réalisation de l'essai	9
	8.6. Essai avec toxique de référence	10
	8.7. Acceptabilité des résultats	11
9.	CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	11
	9.1. Détermination de la CL ₅₀ 48h	11
	9.2. Expression des résultats	11
10.	VOCABULAIRE	12
11.	BIBLIOGRAPHIE	13
	ANNEXE 1 – Procédure d'élevage des daphnies	14

INTRODUCTION

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

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

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

1. DOMAINE D'APPLICATION

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

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Cet essai de toxicité consiste à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause 50 % de mortalité après 48 heures d'exposition (CL₅₀ 48h) dans un système statique et dans des conditions contrôlées.

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

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

3. FIABILITÉ

Les données relatives à la fiabilité de cette méthode sont disponibles pour les clients qui en font la demande.

Les éléments relatifs à la validation de la méthode sont définis dans le document DR-12-SCA-03, intitulé *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie*.

3.1. INTERFÉRENCES

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

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

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Les échantillons doivent être prélevés et conservés selon les recommandations décrites au [Guide d'échantillonnage à des fins d'analyse environnementale](#) du site Internet du CEAEQ.

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

Aucun agent de conservation ne doit être ajouté. *Au cours du prélèvement et pendant le transport, l'échantillon doit être protégé du gel et conservé à l'obscurité dans un environnement avoisinant 4 °C.* Au laboratoire, l'échantillon doit être conservé à environ 4 °C. *L'échantillon doit être acheminé au laboratoire dans le plus court délai possible.* L'essai devrait commencer le plus rapidement possible après le prélèvement. Le délai maximal de conservation entre le prélèvement et l'analyse est de 5 jours.

5. APPAREILLAGE

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

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

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

6. RÉACTIFS

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

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

- Dextrose anhydre (CAS n° 50-99-7)
- Concentré d'extrait de bœuf
- Solution d'extrait de bœuf et de dextrose

Dissoudre 1,5 g d'extrait de bœuf et 1,5 g de dextrose dans 100 ml d'eau déminéralisée ou ultrapure. Une nouvelle solution doit être préparée à chaque semaine et conservée au réfrigérateur.

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

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

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

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

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

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

7. ORGANISMES BIOLOGIQUES

7.1. ESPÈCE ET SOUCHE

L'organisme utilisé est le microcrustacé *Daphnia magna Strauss*. Le stade néonate (≤ 24 h) est utilisé pour les essais. L'état de santé général de l'élevage et la productivité des organismes doivent être adéquats pour un usage en toxicologie. Un élevage adéquat doit présenter beaucoup de jeunes et peu d'adultes et les femelles 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 15 ou plus, pour les femelles âgées de 12 à 37 jours.

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

7.2. MANIPULATION DES DAPHNIES

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

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

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. 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 tempéré à $20,0 \pm 2,0$ °C. Par la suite, la température, le pH, l'oxygène dissous, la conductivité et la dureté doivent être mesurés et notés. Si la dureté est inférieure à 50 mg/l, elle est ajustée à 50 mg/l avec une solution concentrée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium (*cf. 6 ci-dessus*). Si, **et seulement si**, la concentration d'oxygène dissous est inférieure à 40 % **ou supérieure à 100 %** de saturation, l'échantillon est préaéré pour une période n'excédant pas 30 minutes à raison de 25 à 50 ml/min·l. Aucune autre modification ne doit être apportée à l'échantillon. Cependant, si le pH est extrême, un essai supplémentaire peut être effectué avec l'échantillon à pH ajusté.

8.2. EAU DE DILUTION

L'eau de dilution peut être déchlorée, souterraine ou embouteillée. Cette eau doit avoir une dureté se situant entre 160 et 180 mg/l, 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**. Elle sert à effectuer les dilutions de l'échantillon et à préparer et transférer les organismes de l'aquarium d'élevage dans les contenants utilisés pour les essais.

La dureté de l'eau déchlorée peut être ajustée entre 160 et 180 mg/l CaCO₃ avec la solution concentrée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium (*cf. 6 ci-dessus*).

NOTE – *D. magna* est une espèce d'eau dure qui ne se trouve en milieu naturel qu'à des duretés supérieures à 150 mg/l de CaCO₃. À noter que l'USEPA (2002) recommande une eau d'élevage se situant entre 160 et 180 mg/l de dureté.

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

8.3. CONDITIONS D'ESSAI

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

8.4. CHOIX DES DILUTIONS

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'effluent non dilué (100 % V/V) doit être analysé.

Résumé des conditions pour l'essai de toxicité <i>Daphnia magna</i> CL ₅₀ 48h	
Type d'essai :	Statique
Température :	20,0 ± 2,0 °C
Intensité de la lumière :	500 à 1000 lux
Oxygène dissous :	40 à 100 % de saturation
Photopériode :	16 heures de lumière, 8 heures d'obscurité
Capacité des récipients :	25 ml
Volume de solution :	10 ml
Âge des daphnies :	≤ 24 heures (néonates)
Nombre de tubes par concentration :	4
Nombre de daphnies par tube :	5
Régime alimentaire :	Aucune alimentation
Eau de dilution :	Eau déchlorée, souterraine ou embouteillée (pH 6,5 – 8,5; recommandé entre 7,0 et 8,0 ; dureté 160 - 180 mg/l CaCO ₃); ou réceptrice selon l'étude (voir sections 6.6 et 8.2)
Durée de l'essai :	48 heures
Effet mesuré :	Mortalité et immobilité
Expression des résultats :	CL ₅₀ 48h (et CE ₅₀ 48h)
Volume d'échantillon requis :	500 ml

8.5. RÉALISATION DE L'ESSAI

Cet essai permet de déterminer la CL₅₀ 48h.

- Choisir la gamme de concentrations appropriées.
- Préparer, pour chaque concentration et pour le témoin, quatre tubes à essai de 25 ml en introduisant des volumes croissants de l'échantillon et compléter à 8 ml avec de l'eau de dilution.
- Transférer dans les quatre tubes cinq néonates par tube à l'aide d'une pipette. Les néonates sont transférées en prenant soin de minimiser l'apport d'eau de culture et en s'assurant qu'elles ne sont pas piégées par la tension de surface. Remplacer les individus blessés lors des manipulations.
- Pour le témoin, une concentration faible, une concentration moyenne et une concentration élevée, préparer deux autres tubes dans lesquels il n'y aura pas de daphnie; ces tubes serviront pour les mesures physico-chimiques.

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

NOTE – La charge s'exprime en g/l de poids vivants et des restrictions y sont appliquées pour éviter la déplétion en oxygène dissous, l'accumulation et l'intoxication par les déchets métaboliques ainsi que le stress causé par une densité de population trop élevée. Selon USEPA (2002), la charge à respecter pour un test statique à 20 °C est de 0,65 g/l.

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

À partir de ce poids moyen, nous avons déterminé la charge à 0,11 g/l alors que le critère est de 0,65 g/l.

Les méthodes ISO 6341 recommandent une densité de chargement de cinq daphnies par 10 ml, et la méthode USEPA (2002) recommande une densité de cinq daphnies par 25 ml.

- Pour chaque tube à essai, compléter le volume de liquide à 10 ml avec de l'eau de dilution.
- Mettre un bouchon non hermétique. La présence de bouchons permet de limiter la perte de substances volatiles.
- Pour les trois concentrations et le témoin, mesurer le pH et l'oxygène dissous dans le cinquième et le sixième tube à essai n'ayant pas reçu de daphnies. Ces tubes pourront par la suite être éliminés. Mesurer également la température dans le témoin et dans une concentration faible, moyenne et élevée.
- Incuber pendant 48 heures à $20,0 \pm 2,0$ °C à une intensité lumineuse entre 500 et 1000 lux.
- Après 48 heures d'incubation, dénombrer les daphnies immobiles et mortes. L'immobilité se définit par l'incapacité 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.
- Immédiatement après le dénombrement, mesurer la concentration en oxygène dissous, le pH et la température dans une concentration faible, une moyenne et une élevée ainsi que dans le témoin.

8.6. ESSAI AVEC TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

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

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

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

8.7. ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats de l'essai sont acceptables si :

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

9. **CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

9.1. DÉTERMINATION DE LA CL₅₀ 48H

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

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

9.2. EXPRESSION DES RÉSULTATS

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

- en pourcentage (% V/V);
- pour les produits purs le résultat est exprimé en P/V.
- les résultats peuvent également être exprimés en unité toxique aiguë (UT_a) pour les effluents, soit 100/CL₅₀.

10. VOCABULAIRE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11. BIBLIOGRAPHIE

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.

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

[<http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA500Psub10.pdf>]

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. *Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez Daphnia magna*. Rapport SPE 1 RM/14, Centre de technologie environnementale, Ottawa, Ontario, 2000, 23 p.

ISO. *Qualité de l'eau – Détermination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna Straus (Cladocera, crustacea) – Essai de toxicité aiguë*, ISO-6341, 1996 (Cor. : 1998).

PENNAK, R.W. *Fresh-water invertebrates of the United States*. 3th edition, Protozoa to Mollusca, John-Wiley and Sons, New York. N.Y., 1989.

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 1 – PROCÉDURE D'ÉLEVAGE DES DAPHNIES

Plusieurs protocoles d'élevage sont répertoriés dans la littérature (USEPA, 2002; Env. Can. 2000) et peuvent être adéquats pour cette méthode. La méthode en vigueur au CEAEQ utilise de l'eau déchlorée comme eau d'élevage, une culture concentrée d'algues vertes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) et une solution d'extrait de bœuf et de dextrose comme sources d'alimentation. Une séquence contrôlée de renouvellement des aquariums permet d'obtenir une production abondante d'organismes issus de femelles âgées d'au maximum 37 jours.

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

CONDITIONS D'ÉLEVAGE

Les élevages sont réalisés dans des aquariums de 16 l contenant un volume d'eau de 10 l et maintenus à $20,0 \pm 2,0$ °C dans une chambre environnementale ou une enceinte d'élevage appropriée. Un bain thermostaté peut également être utilisé pour le maintien de la température.

La température des élevages est maintenue à $20,0 \pm 2,0$ °C et la photopériode à 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

L'éclairage est obtenu à l'aide de tubes fluorescents Cool White et l'intensité lumineuse est maintenue entre 500 et 1000 lux à la surface de l'eau.

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

L'oxygène dissous devrait être maintenu à une valeur près de la saturation. Elle doit au moins être égale ou supérieure à 80 % de saturation en tout temps.

L'élevage peut bien fonctionner à un pH se situant entre 6,5 et 8,5 (**recommandé entre 7,0 et 8,0**). Toutefois, il doit se situer à une valeur de ± 20 % des valeurs exigées pour l'eau de dilution.

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

NOUVEL ÉLEVAGE

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

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

- prendre 10 béchers de 250 ml en verre et introduire 200 ml d'eau d'élevage;
- à l'aide d'une pipette Pasteur coupée et rodée (ou d'un autre dispositif adéquat), 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;
- renouveler quotidiennement le 2/3 du volume d'eau et ajouter de la culture concentrée d'algues comme source de nourriture;
- dès la première ponte, sélectionner le bécher ayant la meilleure production et éliminer la première génération de néonates. Conserver la deuxième génération et retirer la femelle adulte;
- transférer les daphnies juvéniles dans un aquarium de 16 l contenant 6 l d'eau d'élevage. Ajouter 100 ml de culture concentrée d'algues;
- après environ une semaine, ou dès la première ponte, éliminer les néonates de la première génération en sélectionnant ces dernières à l'aide des tamis de 1 000, 560 et 315 μm . Seules les daphnies adultes retenues sur le tamis de 1 000 μm sont conservées. Ramener le volume à 10 l et ajouter 100 ml de culture concentrée d'algues.

MAINTIEN D'UN ÉLEVAGE FONCTIONNEL

Les daphnies de la deuxième génération retenues sur les tamis de 315 et 560 μm à partir de l'élevage initial seront utilisées pour l'ensemencement de deux aquariums qui seront les premiers éléments d'une série constituant un élevage fonctionnel pour la réalisation d'essais sur une base régulière.

- Introduire 10 l d'eau d'élevage dans chacun des deux aquariums de 16 l.
- Ajouter environ 100 ml de culture concentrée d'algues (20 à 30×10^6 cell./ml) dans chaque aquarium comme source de nourriture jusqu'à l'obtention d'une coloration légèrement verdâtre. Ne pas ajouter d'extrait de bœuf et dextrose à cette étape.
- Introduire 10 à 25 daphnies juvéniles/l.
- Maintenir les aquariums dans une chambre environnementale ou dans une enceinte d'élevage qui permet de respecter les conditions précisées plus haut.

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

Après huit jours, compter et conserver entre 100 et 250 daphnies adultes, renouveler environ 40 % du volume de 10 l et ajouter du concentré d'algues ainsi qu'une solution d'extrait de bœuf et de dextrose. Ne pas excéder la consommation quotidienne d'algues de façon à éviter une prolifération qui serait nuisible aux daphnies.

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

Les néonates produites par les femelles âgées de 12 à 37 jours seront utilisées pour les essais de toxicité.

Un élevage constitué de quatre à six aquariums permet une production très abondante de néonates.

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

Les élevages doivent être localisés dans des espaces séparés de ceux utilisés pour les essais. L'air comprimé utilisé pour l'oxygénation des aquariums doit être filtré pour éviter l'introduction de contaminants provenant des pompes lubrifiées.

La productivité de l'élevage est évaluée de façon continue en isolant environ une fois par deux semaines 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 de 150 ml d'eau d'élevage est utilisé par bécher et environ 1 ml de culture concentrée d'algues est ajouté à chaque jour ainsi qu'une solution d'extrait de bœuf et de dextrose.

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

- absence d'éphippie;
- présence de femelles qui ont une première portée au plus tard à 12 jours;
- nombre moyen de néonates par femelle de 15 ou plus pour les daphnies âgées de 12 à 37 jours ;
- absence de mortalité chez les femelles.

CULTURE CONCENTRÉE D'ALGUES

Milieu de culture

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

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

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

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

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

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

C) 0,5 ml de la solution de micro-éléments suivante :

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

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

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

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

CULTURE DES ALGUES

- Inoculer un volume approprié (1 - 3 l) de milieu de culture, de façon à obtenir une densité cellulaire de 10 000 cell./ml. La méthode de conservation et de culture de la souche pure et axénique de *Pseudokirchneriella subcapitata* est précisée dans le document MA. 500 – P.sub 1.0 (Édition courante).
- Incuber à $24,0 \pm 2,0$ °C pour une durée maximum de sept jours avec un barbotage d'air continu pour éviter une déplétion en CO₂ et une sédimentation des algues. Des « pièges à eau » ou des filtres à air sont recommandés pour réduire les risques de contamination pour les contaminants issus des pompes lubrifiées. L'éclairage est continu à une intensité de $4\,300 \text{ lux} \pm 10\%$ ($58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1} \pm 10\%$).
- La densité cellulaire de la culture concentrée d'algues utilisée pour l'alimentation des daphnies est approximativement de 20×10^6 cell./ml.