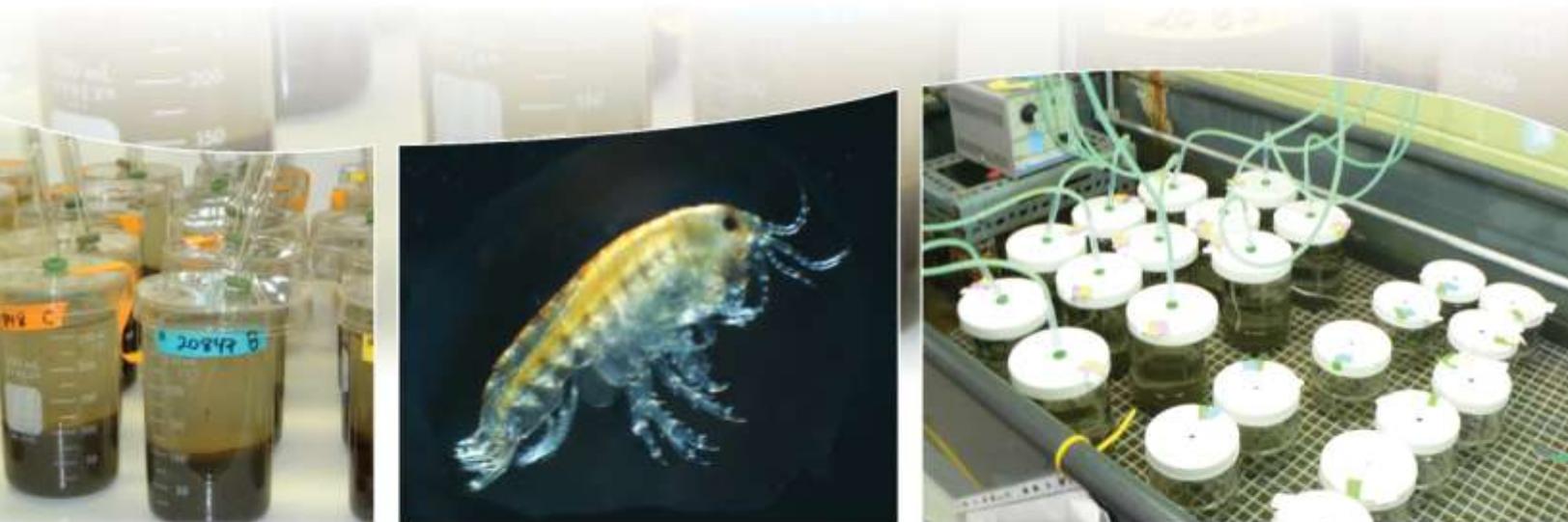




Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyaella azteca* dans les sédiments et l'eau

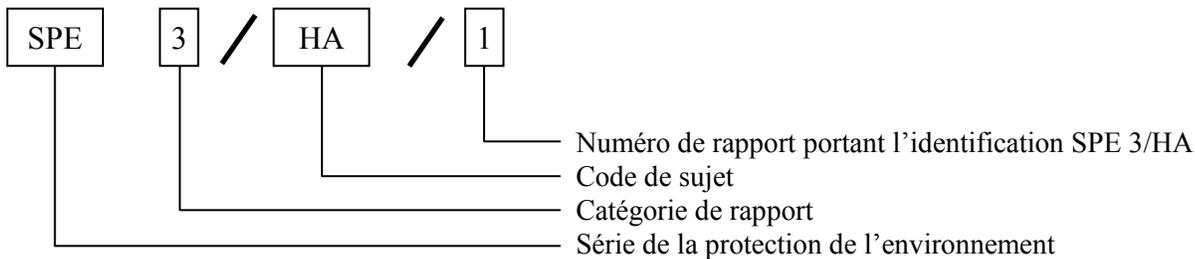
Rapport SPE 1/RM/33 Deuxième édition - Janvier 2013

Direction générale de la science et de la technologie
Environnement Canada



SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation



Catégories

- | | |
|---|--|
| 1 | Règlements/Lignes directrices/Codes de pratiques |
| 2 | Évaluation des problèmes et options de contrôle |
| 3 | Recherche et développement technologique |
| 4 | Revue de la documentation |
| 5 | Inventaires, examens et enquêtes |
| 6 | Évaluations des impacts sociaux, économiques et environnementaux |
| 7 | Surveillance |
| 8 | Propositions, analyses et énoncés de principes généraux |
| 9 | Guides |

Sujets

- | | |
|------------|--|
| AG | Agriculture |
| AN | Technologie anaérobie |
| AP | Pollution atmosphérique |
| AT | Toxicité aquatique |
| CC | Produits chimiques commerciaux |
| CE | Consommateurs et environnement |
| CI | Industries chimiques |
| FA | Activités fédérales |
| FP | Traitement des aliments |
| HA | Déchets dangereux |
| IC | Produits chimiques inorganiques |
| MA | Pollution marine |
| MM | Exploitation minière et traitement des minéraux |
| NR | Régions nordiques et rurales |
| PF | Papier et fibres |
| PG | Production d'électricité |
| PN | Pétrole et gaz naturel |
| RA | Réfrigération et conditionnement d'air |
| RM | Méthodes de référence |
| SF | Traitement des surfaces |
| SP | Déversements de pétrole et de produits chimiques |
| SRM | Méthodes de référence normalisées |
| TS | Transports |
| TX | Textiles |
| UP | Pollution urbaine |
| WP | Protection et préservation du bois |

Des sujets et des codes additionnels sont ajoutés au besoin. On peut obtenir une liste des publications de la Série de la protection de l'environnement à l'adresse suivante : Publications de la Protection de l'environnement, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) K1A 0H3.

Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyaella azteca* dans les sédiments et l'eau

Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale de la science et de la technologie
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/33
Deuxième édition
Janvier 2013

Version imprimée
N° de cat. : En49-7/1-33F
ISBN 978-0-662-75757-3

Version PDF
N° de cat. : En49-7/1-33F-PDF
ISBN 978-0-662-75135-9

Le contenu de cette publication ou de ce produit peut être reproduit en tout ou en partie, et par quelque moyen que ce soit, sous réserve que la reproduction soit effectuée uniquement à des fins personnelles ou publiques mais non commerciales, sans frais ni autre permission, à moins d'avis contraire.

On demande seulement :

- de faire preuve de diligence raisonnable en assurant l'exactitude du matériel reproduit;
- d'indiquer le titre complet du matériel reproduit et l'organisation qui en est l'auteur;
- d'indiquer que la reproduction est une copie d'un document officiel publié par le gouvernement du Canada et que la reproduction n'a pas été faite en association avec le gouvernement du Canada ni avec l'appui de celui-ci.

La reproduction et la distribution à des fins commerciales sont interdites, sauf avec la permission écrite de l'administrateur des droits d'auteur de la Couronne du gouvernement du Canada, Travaux publics et Services gouvernementaux (TPSGC). Pour de plus amples renseignements, veuillez communiquer avec TPSGC au 613-996-6886 ou à droitdauteur.copyright@tpsgc-pwgsc.gc.ca.

Photos de la page couverture : © Environnement Canada

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, représentée par le ministre de l'Environnement, 2013

Also available in English

Commentaires

Prière d'adresser vos commentaires et observations sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins, chef
Section de l'évaluation biologique
et normalisation
Direction générale de la science
et de la technologie
Environnement Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Lisa Taylor, gestionnaire
Unité de l'élaboration et de l'application
des méthodes
Direction générale de la science
et de la technologie
Environnement Canada
335, chemin River
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This publication is also available in English from:

Communications Services
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale pour l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue pas une approbation, par Environnement Canada, de l'emploi de ces produits. D'autres produits de valeur comparable peuvent être utilisés.

Résumé

*Le présent rapport décrit les modes opératoires révisés que recommande maintenant Environnement Canada pour mener des essais toxicologiques sur des sédiments et dans l'eau seulement, avec l'amphipode dulcicole *Hyaella azteca*. La survie et le poids sec des amphipodes à la fin d'un essai de 14 jours constituent les paramètres des essais. Cette deuxième édition du rapport SPE 1/RM/33 renferme de nombreuses mises à jour, dont les suivantes : choix de différents ratios sédiment-eau, âge des organismes expérimentaux au début de l'essai, utilisation de répétitions, renouvellement de l'eau sus-jacente, types d'aliments et rations, intensité lumineuse pour l'élevage des amphipodes, analyses statistiques des données. Sont aussi inclus les modes opératoires applicables aux essais toxicologiques sur la survie et la croissance de *H. azteca* dans l'eau seulement. La présente méthode révisée remplace celle décrite dans SPE 1/RM/33 (essais de survie et de croissance de *H. azteca* dans les sédiments), publiée par Environnement Canada en décembre 1997. L'essai sur des sédiments s'applique à la mesure des effets nocifs des sédiments d'eau douce principalement, mais des modes opératoires relatifs à des sédiments estuariens (salinité de ≤ 15 ‰) sont également inclus dans la présente méthode.*

*Pour l'essai toxicologique sur un sédiment, on utilise normalement des béciers ou des bocaux en verre renfermant 100 mL de sédiment recouvert de 175 mL d'eau, et l'essai se déroule à 23 ± 1 °C. Un ratio sédiment-eau de 1:4 pour les études exigeant un plus grand volume d'eau sus-jacente aux fins de la surveillance de la qualité de l'eau et/ou des analyses chimiques fait partie des options décrites ici. L'essai peut être exécuté en tant qu'essai à concentration unique (p. ex., sur un échantillon non dilué de sédiment prélevé sur le terrain) ou à concentrations multiples (p. ex., sur un sédiment enrichi ou un mélange de sédiments) afin de déterminer l'effet de seuil. Pour un essai à concentration unique, il faut prélever ≥ 5 répliquats de sédiment (sur le terrain) par station d'échantillonnage et évaluer la toxicité de chacun pour *H. azteca*. Pour un essai à concentrations multiples, il faut prévoir ≥ 5 récipients de répétition (répliquats de laboratoire) par traitement. Chaque récipient d'essai renferme 10 *H. azteca*, âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours au début de l'essai.*

*L'essai sur un sédiment se déroule habituellement en conditions statiques – pendant l'exposition, l'eau sus-jacente n'est pas renouvelée, mais elle est aérée en continu. Toutefois, si la qualité de l'eau d'essai recouvrant le sédiment provenant d'une station d'échantillonnage de référence se dégrade (à cause d'une forte teneur en ammoniac, d'un pH se situant à l'extérieur de la plage de tolérance de *H. azteca* et/ou d'une faible teneur en oxygène dissous), et que l'essai a pour but d'évaluer les effets toxiques d'une substance ou matière d'essai à l'exclusion des effets nocifs ou modificateurs de ces facteurs confusionnels, l'essai doit être exécuté ou poursuivi en tant qu'essai à renouvellement intermittent. Dans ce dernier type d'essai, l'eau sus-jacente est renouvelée ≥ 3 fois par semaine, en des journées non consécutives, par l'ajout de 2 volumes d'eau sur 24 h. On nourrit les organismes avec un mélange de LCT (levure, Cerophyll^{MC} et nourriture pour truite), avec des flocons moulus d'aliments pour poissons (du commerce) ou avec un mélange de ces deux types d'aliments. La nourriture est ajoutée dans chaque récipient d'essai, soit quotidiennement, soit 3 fois par semaine en des journées non consécutives. La décision à cet égard dépend des objectifs de l'étude et, le cas échéant, des lignes directrices ou des exigences réglementaires applicables.*

L'essai sur la survie et la croissance des organismes dans l'eau seulement s'exécute dans les mêmes conditions d'exposition que l'essai sur un sédiment, et de nombreux aspects du plan d'expérience sont communs aux deux types d'essai. L'essai dans l'eau seulement est à renouvellement intermittent. Il

comporte ≥ 5 récipients de répétition par traitement, chaque récipient contenant 275 mL de solution et un substrat. Il peut être exécuté indépendamment ou parallèlement à un essai de 14 jours sur un sédiment, ce qui pourrait faciliter la distinction entre une contamination historique (p. ex., par ce sédiment) et l'apport actuel de contaminants par un effluent industriel.

*Le rapport expose les conditions et modes opératoires généraux ou universels applicables à la préparation et à l'exécution des essais, de même que des conditions et modes opératoires supplémentaires adaptés aux fins d'essais donnés. L'essai sur un sédiment convient à la mesure et à l'évaluation de la toxicité d'échantillons de sédiments, de boues ou de matières particulières semblables, tous prélevés sur le terrain, ou encore d'un sédiment enrichi (mélangé) en laboratoire avec une substance chimique, un sédiment contaminé ou une autre matière particulière. L'essai dans l'eau seulement convient à la mesure de la toxicité d'échantillons d'effluents industriels ou d'eaux usées, d'eau douce (p. ex., une eau réceptrice), d'extraits aqueux ou de substances chimiques. Sont également incluses dans le rapport des instructions et des exigences relatives aux éléments suivants : installations d'essai, prélèvement, manipulation et entreposage des échantillons, élevage de *H. azteca*, préparation des mélanges de sédiment et de solutions aqueuses, mise en route des essais, conditions d'essai particulières, observations et mesures pertinentes, paramètres, méthodes de calcul, emploi de toxiques de référence.*

Abstract

*Revised methods now recommended by Environment Canada for performing sediment and water-only toxicity tests using the freshwater amphipod *Hyaella azteca* are described in this report. The endpoints for these tests are survival and dry weight of amphipods at the end of a 14-day assay. This revised version of Report EPS 1/RM/33 includes numerous updates such as options for sediment-to-water ratio, age of test organisms used to start a test, use of replicates, overlying water renewal, food types and feeding rates, and light intensity for culturing, as well as the statistical analyses of data. Procedures for a water-only survival and growth toxicity test using *Hyaella azteca* have also been included herein. This revised method supersedes Environment Canada's test for survival and growth in sediment using *H. azteca* that was published as Report EPS 1/RM/33 in December 1997. The sediment test is intended primarily for measuring the adverse effect(s) of freshwater sediments, although procedures for testing estuarine sediments ($\leq 15\%$ salinity) are also described.*

*The sediment toxicity test is normally conducted at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ in glass beakers or jars containing a 100-mL layer of sediment and 175 mL of overlying water. An option for using a 1:4 sediment to water ratio is included herein for studies requiring greater volumes of overlying water for water-quality monitoring and/or chemical analyses. The test may be run as a single-concentration assay (e.g., for testing undiluted samples of field-collected sediment), or as a multi-concentration assay (e.g., for testing spiked-sediment or sediment mixtures at several concentrations) to determine the threshold of effect. For a single-concentration assay, a minimum of 5 replicate samples of sediment (i.e., field replicates) are collected at each discrete sampling station and each one is tested for its toxicity to *H. azteca* as a single replicate. For a multi-concentration assay, a minimum of 5 replicate vessels (i.e., laboratory replicates) per treatment are required. Each replicate contains 10 *H. azteca*. Amphipods are 2 to 9 days old and ranging in age by ≤ 3 days at the start of the test.*

*The sediment test is routinely carried out as a static (i.e., no renewal) exposure, during which the overlying water is continuously aerated. If, however, the test water overlying sediment from any reference sampling station deteriorates or becomes fouled (i.e., due to high levels of ammonia, pH levels outside the tolerance range of *H. azteca*, and/or low levels of dissolved oxygen) at any time during the test, and the objectives of the test are to assess toxic effects due to substances or materials without the deleterious or modifying effect of these confounding factors, the test must be carried out, or continued, as a static-renewal test. In the static-renewal exposure, the overlying water is renewed a minimum of three times weekly on non-consecutive days, at a rate of two volume additions in 24 hours. The animals are fed either a mixture of yeast, Cerophyll™, and trout chow (YCT); ground commercial fish food flakes; or a combination of both YCT and fish food flakes. Food is added to each test vessel, either daily or three times per week on non-consecutive days. Selection of either feeding option depends on the objectives of the study and perhaps also on regulatory guidelines or requirements.*

The water-only survival and growth test is conducted under the same exposure conditions as the sediment test and shares many aspects of the test design. The test is carried out as a static-renewal exposure, with a minimum of 5 replicate vessels per treatment, each containing 275 mL of solution and a substrate. The water-only method has been included for use alone, or in conjunction with the 14-day sediment test, which together might be useful in differentiating between historical contamination (i.e., from sediment) and current water and/or effluent quality.

*General or universal conditions and procedures are outlined for test preparation and performance. Additional conditions and procedures are stipulated that are specific to the intended use of the test. The sediment test is suitable for measuring and assessing the toxicity of samples of field-collected sediment, sludge, or similar particulate material, or of sediment spiked (mixed) in the laboratory with chemical(s) or chemical substance(s), contaminated sediment, or other particulate material. The water-only test is suitable for measuring samples of industrial or sewage effluents, fresh waters (e.g., receiving water), aqueous extracts, or chemical substances. Instructions and requirements are included on test facilities, sample collection, handling and storing samples, culturing *H. azteca*, preparing sediment and aqueous mixtures and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints and methods of calculation, and the use of reference toxicants.*

Avant-propos

*Le présent document fait partie d'une série de **méthodes recommandées** pour mesurer et évaluer les effets toxiques que peuvent avoir, dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies, des substances ou des matières toxiques ou potentiellement toxiques sur une espèce donnée d'organismes aquatiques ou terrestres exposés à des échantillons de ces substances ou matières. Environnement Canada a évalué ces méthodes et en préconise l'emploi :*

- *dans les laboratoires d'écotoxicologie d'Environnement Canada;*
- *pour les essais qu'Environnement Canada donne en sous-traitance ou que demandent des organismes ou des entreprises de l'extérieur;*
- *en l'absence d'instructions plus précises, comme dans les règlements;*
- *en vue de l'élaboration d'instructions très explicites, comme celles qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire ou une méthode de référence normalisée.*

Les différents types d'essais inclus dans cette série ont été choisis parce qu'ils étaient acceptables aux fins des programmes de protection et de gestion de l'environnement mis en œuvre par Environnement Canada. Les documents de la collection ont pour objet d'orienter les utilisateurs et de faciliter la mise en œuvre de modes opératoires cohérents, pertinents et intégrés en vue d'obtenir des données sur la toxicité, pour des organismes terrestres ou aquatiques, de substances ou matières destinées à être dispersées dans l'environnement ou présentes dans l'environnement. Selon la ou les méthodes d'essai biologique choisies et le milieu naturel visé, les substances ou matières dont la toxicité doit être mesurée pourraient comprendre des échantillons de substance chimique, d'effluent, d'élutriat, de lixiviat, d'eau réceptrice, de sédiment ou de matière particulaire semblable, ou encore de sol ou de matière particulaire semblable. On trouvera à l'annexe A du présent document la liste des méthodes d'essai biologique et des documents d'orientation publiés jusqu'à maintenant par Environnement Canada dans le cadre de cette collection.

Les termes définis dans la section « Terminologie » sont en italique lorsqu'ils sont mentionnés pour la première fois dans le texte, conformément à la définition qui en est donnée ici. L'italique sert également à mettre en évidence ces termes et certains autres.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vii
Avant-propos	ix
Liste des tableaux	xv
Liste des figures	xv
Liste des sigles, abréviations, acronymes, symboles et formules chimiques	xvii
Terminologie	xix
Remerciements	xxix
 Section 1	
Introduction	1
1.1 Contexte.....	1
1.2 Identification, répartition et cycle biologique.....	5
1.3 Emploi antérieur dans des essais toxicologiques.....	6
1.4 Tolérance et sensibilité relative de <i>H. azteca</i> en laboratoire.....	7
 Section 2	
Organismes expérimentaux	11
2.1 Espèce et stade.....	11
2.2 Origine et acclimatation.....	11
2.3 Élevage.....	13
2.3.1 Généralités.....	13
2.3.2 Installations et appareillage.....	15
2.3.3 Éclairage.....	15
2.3.4 Eau d'élevage.....	15
2.3.5 Température.....	18
2.3.6 Oxygène dissous.....	19
2.3.7 Substrat d'élevage.....	19
2.3.8 Alimentation.....	19
2.3.9 Manipulation des organismes.....	19
2.3.10 Élevages d'âges mélangés et d'âge connu.....	19
2.3.11 Critères de santé.....	21
 Section 3	
Système d'essai	22
3.1 Installations et appareillage.....	22
3.2 Éclairage.....	24
3.3 Récipients d'essai.....	25
3.4 Eau d'essai et eau témoin/ de dilution.....	25
3.5 Sédiment témoin.....	26

Section 4

Modes opératoires universels	28
4.1 Début de l'essai	32
4.2 Conditions d'essai	35
4.3 Oxygène dissous et aération	36
4.4 Alimentation	36
4.5 Observations et mesures pendant l'essai	37
4.6 Fin de l'essai.....	39
4.7 Paramètres et calculs	41
4.8 Essais avec un ou des toxiques de référence	42

Section 5

Modes opératoires particuliers applicables aux essais sur un sédiment ou une matière particulaire semblable prélevé sur le terrain	48
5.1 Prélèvement des échantillons	48
5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse des échantillons	50
5.3 Préparation des échantillons en vue des essais.....	52
5.4 Eau d'essai.....	53
5.5 Observations et mesures	54
5.6 Paramètres et calculs	54
5.6.1 Analyse des données sur la mortalité	56
5.6.1.1 Évaluation des modèles utilisés.....	59
5.6.2 Analyse des données sur le poids sec.....	60
5.6.3 Variantes du plan d'étude et des analyses	61
5.6.4 Analyse de puissance.....	62

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais sur un sédiment enrichi	64
6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons	64
6.2 Préparation des mélanges destinés aux essais	65
6.3 Eau d'essai et eau témoin/ de dilution.....	68
6.4 Observations et mesures	69
6.5 Paramètres et calculs	69

Section 7

Modes opératoires pour les essais de 14 jours dans l'eau seulement	73
7.1 Aspects généraux des modes opératoires	73
7.2 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons	73
7.3 Préparation des solutions d'essai.....	74
7.4 Eau témoin/de dilution	76
7.5 Conditions d'essai	80
7.5.1 Oxygène dissous et aération	80
7.5.2 pH.....	81
7.5.3 Alimentation.....	82
7.5.4 Renouvellement des solutions d'essai.....	82
7.6 Observations et mesures	83
7.7 Paramètres et calculs	84

Section 8	
Rapports à produire	86
8.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai	86
8.1.1 Substance ou matière d'essai	87
8.1.2 Organismes expérimentaux	87
8.1.3 Installations	87
8.1.4 Eau d'essai et eau témoin/de dilution	87
8.1.5 Méthode d'essai	87
8.1.6 Conditions et modes opératoires	88
8.1.7 Résultats	89
8.2 Exigences supplémentaires	90
8.2.1 Substance ou matière d'essai	90
8.2.2 Organismes expérimentaux	90
8.2.3 Installations d'essai et appareillage	90
8.2.4 Sédiment témoin, eau d'essai et eau témoin/de dilution	90
8.2.5 Méthode d'essai	91
8.2.6 Conditions et modes opératoires	91
8.2.7 Résultats de l'essai	92
Références	93
Annexe A	
Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada^a	107
Annexe B	
Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en mai 2012)	110
Annexe C	
Administration centrale et bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada	113
Annexe D	
Variantes des méthodes d'élevage de <i>H. azteca</i>, décrites dans des documents canadiens et étatsuniens	114
Annexe E	
Variantes des modes opératoires des essais toxicologiques sur un sédiment, avec <i>H. azteca</i>, décrites dans des documents canadiens et étatsuniens	122
Annexe F	
Variantes des modes opératoires des essais toxicologiques de référence avec <i>H. azteca</i>, décrites dans des documents canadiens et étatsuniens	133
Annexe G	
Systématique générale de <i>Hyalella azteca</i> (Saussure, 1858)	138

Annexe H	
Préparation du mélange de LCT destiné à <i>H. azteca</i>	143
Annexe I	
Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques	145

Liste des tableaux

1.	Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage des <i>H. azteca</i> destinés aux essais toxicologiques sur un sédiment	16
2.	Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques sur un sédiment avec <i>H. azteca</i>	29
3.	Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques de référence dans l'eau seulement avec <i>H. azteca</i>	44
4.	Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques de 14 jours dans l'eau seulement, avec <i>H. azteca</i>	77

Liste des figures

1.	Points à considérer dans la préparation et l'exécution d'essais toxicologiques avec <i>H. azteca</i> et divers types de substances ou matières	4
2.	Schémas illustrant des plans d'expérience utilisés couramment pour l'évaluation de sédiments sur le terrain.....	57
3.	Organigramme de l'analyse statistique connexe à trois plans d'expérience utilisés couramment pour les essais sur un sédiment prélevé sur le terrain	58

Liste des sigles, abréviations, acronymes, symboles et formules chimiques

ANOVA	analyse de la variance
ASTM	American Society for Testing and Materials
CaCl ₂	chlorure de calcium
CaCO ₃	carbonate de calcium
CaSO ₄	sulfate de calcium
CdCl ₂	chlorure de cadmium
CE ₅₀	concentration efficace médiane
CESO	concentration avec effet de seuil observé
CI _p	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage (p) d'effet précisé
CL ₅₀	concentration létale médiane
cm	centimètre
CMEO	concentration minimale avec effet observé
CSEO	concentration sans effet observé
CuSO ₄	sulfate de cuivre
CV	coefficient de variation
EC	Environnement Canada
ET	écart type
g	gramme
g/kg	grammes par kilogramme
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
INRE	Institut national de recherche sur les eaux
KCl	chlorure de potassium
kg	kilogramme
L	litre
LCT	levure, Cerophyll ^{MC} et nourriture pour truite
LEEA	Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique
MAN-5S	milieu artificiel normalisé à 5 sels
MC	marque de commerce
mg	milligramme
MgSO ₄	sulfate de magnésium
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
mS	millisiemens
NaBr	bromure de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
nm	nanomètre
O ₂	oxygène
OD	oxygène dissous
®	marque de commerce déposée
s	seconde

sp.	espèce
USEPA	United States Environmental Protection Agency
μE	micro-Einstein
μg	microgramme
μm	micromètre
$\mu\text{mhos/cm}$	micromhos par centimètre
<	moins de
\leq	moins de ou égal à
>	plus de
\geq	plus de ou égal à
\pm	plus ou moins
\sim	environ
\cong	approximativement égal à
.	multiplié par
/	par; peut aussi signifier « ou » (p. ex., eau témoin/de dilution)
%	pour cent
‰	parties par millier; pour mille; millième
°C	degré Celsius

Terminologie

Nota : Toutes les définitions ci-dessous s'inscrivent dans le contexte des procédures décrites dans le présent rapport; elles pourraient ne pas être adaptées à d'autres contextes.

Verbes auxiliaires

L'auxiliaire *doit* (*doivent*) exprime l'obligation absolue.

L'auxiliaire *devrait* (*devraient*) et le conditionnel d'obligation (*il faudrait*, etc.) expriment une recommandation ou la nécessité de respecter la condition dans la mesure du possible.

L'auxiliaire *peut* (*peuvent*) exprime l'autorisation ou la capacité d'accomplir une action.

L'auxiliaire *pourrait* (*pourraient*) indique la possibilité ou l'éventualité.

Termes techniques généraux

À *renouvellement continu* – Se dit d'un appareillage ou d'un essai dans lequel on renouvelle continuellement la solution ou l'eau sus-jacente du récipient d'*élevage* ou d'essai par l'apport constant d'une solution fraîche.

À *renouvellement intermittent* – Se dit d'un essai toxicologique au cours duquel la solution d'essai ou l'eau sus-jacente est renouvelée périodiquement pendant la durée de l'essai. Synonyme : à *renouvellement périodique*.

À *renouvellement périodique* – V. à *renouvellement intermittent*.

Acclimatation – Adaptation physiologique à une valeur précise d'un ou de plusieurs facteurs environnementaux, comme la température. Ce terme désigne habituellement l'adaptation des organismes expérimentaux à des conditions de laboratoire contrôlées.

Conductivité – Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de conduire l'électricité. Cette capacité dépend de la concentration des ions dans une solution, de leur valence et de leur mobilité, de même que de la température de la solution. La conductivité est exprimée en micromhos par centimètre ($\mu\text{mhos/cm}$) ou en millisiemens par mètre (mS/m); $1 \text{ mS/m} = 10 \mu\text{mhos/cm}$.

Conformité – Respect des règlements ou des exigences gouvernementales en matière de permis.

Élevage – Stock d'organismes élevés en laboratoire dans des conditions définies et contrôlées, pendant une génération ou plus, afin d'obtenir des sujets d'expérience en bonne santé. Ce terme désigne également l'activité visant à produire de tels sujets à partir d'une génération ou plus, dans des conditions définies et contrôlées.

En conditions statiques – Se dit d'un essai toxicologique au cours duquel la solution ou l'eau sus-jacente n'est pas renouvelée pendant l'essai. Synonyme : *sans renouvellement*.

Floculation – Formation d'un précipité non consolidé (c.-à-d. un floccule) dans une solution.

Lot – Groupe d’amphipodes (âgés de 2-9 jours et présentant un écart d’âge de ≤ 3 jours) prélevé en une seule fois dans un *élevage* et comprenant tous les organismes expérimentaux destinés à un essai toxicologique donné (y compris tout essai toxicologique de référence connexe).

Lux – Unité d’éclairement mesurant l’intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,092 9 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 lux. Pour convertir des lux en flux quantique [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], il faut connaître la qualité spectrale de la source lumineuse. Les conditions de luminosité ou l’irradiance sont exprimées sous forme de flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d’onde photosynthétiquement efficaces de $\sim 400\text{-}700$ nm. Le lien entre flux quantique et lux (ou pied-bougie) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles (v. ASTM, 1999). Le facteur approximatif de conversion entre flux quantique et lux pour un éclairage fluorescent en spectre continu (p. ex., Vita-Lite® de Duro-Test®) est le suivant : 1 lux \cong 0,016 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (Deitzer, 1994; Sager et McFarlane, 1997).

Méthode de référence – Protocole conçu spécifiquement pour l’exécution d’un essai de toxicité, c’est-à-dire une méthode d’essai biologique comportant un ensemble explicite de modes opératoires et de conditions d’essai exposé avec précision dans un document écrit et dont ont convenu formellement les parties en cause. Contrairement à d’autres méthodes d’essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement Canada, les méthodes de référence sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

pH – Logarithme négatif de l’activité des ions hydrogène exprimée en équivalents-grammes par litre. La valeur du pH indique le degré ou l’intensité des réactions tant acides qu’alcalines sur une échelle de 0 à 14, le nombre 7 représentant la neutralité, les nombres inférieurs à 7, des réactions de plus en plus acides, et les nombres supérieurs à 7, des réactions de plus en plus alcalines.

Photopériode – Durée de l’éclairement sur 24 h.

Pourcentage (%) – Concentration exprimée en parties par centaine. Ainsi, 10 % d’une substance ou matière d’essai représente 10 unités ou parties de celle-ci diluées dans un sédiment ou dans l’eau pour constituer en tout 100 parties. Selon la substance ou matière d’essai, les concentrations peuvent être préparées d’après un rapport de masse à masse, de masse à volume ou de volume à volume et sont exprimées sous forme de pourcentage de la substance ou matière d’essai dans le mélange final de sédiment ou la solution finale.

Précipitation – Formation d’un solide (le précipité) à partir de tout ou partie des constituants dissous d’une solution.

Prétraitement – Traitement d’un échantillon (ou d’un sous-échantillon) de sédiment ou d’eau avant que les amphipodes y soient exposés.

Protocole – Document exposant avec précision l’ensemble des marches à suivre pendant un essai et dont ont convenu formellement les parties en cause.

Renouvellement de l'eau – Renouvellement de la solution ou de l'eau sus-jacente des récipients d'essai, de façon régulière et mesurée (p. ex., 3 fois par semaine) pendant toute la durée de l'essai. Le renouvellement peut être manuel ou automatisé – dans ce dernier cas, l'eau sus-jacente est renouvelée périodiquement, à un taux constant.

Salinité – Quantité totale, en grammes, d'une substance solide en dissolution dans 1 kg d'eau, dont l'eau de mer. La salinité est habituellement exprimée en parties par millier (‰). Elle est déterminée après conversion de tous les carbonates en oxydes, après remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et après oxydation de toute la matière organique. On peut également mesurer la salinité directement à l'aide d'un salinomètre, d'un conductimètre ou d'autres moyens (v. APHA et coll., 1995, 2005).

Sans renouvellement – V. en conditions statiques.

Surveillance – Vérification périodique (p. ex., quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle) de la qualité, ou collecte et communication d'information. Dans le présent rapport, le terme désigne soit la vérification et la mesure périodiques de variables biologiques ou de variables relatives à la qualité de l'eau, soit le prélèvement d'échantillons de sédiment, d'eaux usées ou d'eau réceptrice aux fins de la mesure de leur toxicité.

Turbidité – Mesure dans laquelle la clarté de l'eau est réduite par la présence de particules en suspension ou d'autres matières qui diffusent et absorbent la lumière, l'empêchant ainsi d'être transmise en ligne droite à travers l'échantillon. Cette caractéristique est généralement exprimée en unités de turbidité néphélométrique.

Termes relatifs aux substances ou matières d'essai

Eau d'amont – Eau de surface (p. ex., cours d'eau ou lac) ne subissant pas l'influence de l'effluent (ou d'une autre substance ou matière d'essai) parce qu'elle en est éloignée en direction opposée au courant ou qu'elle s'en trouve suffisamment loin perpendiculairement au courant.

Eau d'essai – Eau recouvrant la couche de sédiment dans les récipients d'essai, c'est-à-dire l'*eau sus-jacente*. On utilise aussi l'eau d'essai, au besoin, pour la manipulation d'un sédiment (p. ex., préparation d'un sédiment artificiel ou enrichi, tamisage par voie humide), de même que comme eau témoin/de dilution pour les essais dans l'eau seulement. (V. aussi *eau témoin/de dilution*.)

Eau de dilution – Eau servant à diluer une substance ou matière d'essai à différentes concentrations aux fins des divers traitements connexes aux essais de toxicité. V. *eau témoin/de dilution* et *eau d'essai*.

Eau de porosité (ou *eau interstitielle*) – Eau occupant l'espace entre les particules d'un sédiment.

Eau déchlorée – Eau (généralement, eau potable municipale) ayant subi un traitement visant à en éliminer le chlore et ses composés.

Eau désionisée – Eau qu'on a purifiée en la faisant passer dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

Eau distillée – Eau ayant été traitée dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre matériau pour la débarrasser de ses impuretés.

Eau réceptrice – Eau de surface (p. ex., cours d'eau ou lac) dans laquelle ont été rejetées ou sont sur le point d'être rejetées des matières résiduelles. Il faut en donner une description étoffée pour préciser ce dont il s'agit.

Eau reconstituée – Eau désionisée ou distillée sous verre, d'une grande pureté, à laquelle on a ajouté des substances chimiques de qualité réactif. L'eau douce de synthèse ainsi obtenue devrait être exempte de contaminants et posséder le *pH*, l'alcalinité et la dureté recherchés. Une eau reconstituée peut également être une eau douce à laquelle on a ajouté du sel de mer sec (du commerce), des sels de qualité réactif ou de la saumure, en une quantité suffisante pour obtenir une *salinité* (et un *pH*) d'eau de mer convenant à l'élevage des organismes et aux essais (p. ex., essai sur un sédiment estuarien).

Eau sus-jacente – Eau recouvrant le sédiment d'un récipient d'essai. (V. aussi *eau d'essai*.)

Eau témoin/de dilution – Pour les essais dans l'eau seulement, eau servant à la dilution de la substance ou matière d'essai et/ou du *témoin*. Pour les essais sur un sédiment, eau servant à préparer une série de concentrations de la substance d'essai ou utilisée comme eau sus-jacente. L'eau témoin/de dilution est souvent identique à l'eau d'*élevage* des organismes expérimentaux ou à l'*eau (sus-jacente) d'essai*.

Eaux usées – Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les éluutriats.

Effluent – Tout déchet liquide (p. ex., industriel ou urbain) rejeté dans le milieu aquatique.

Éluatriat – Solution aqueuse obtenue après addition d'eau à une matière solide (p. ex., sédiments, stériles, boues de forage, matériaux de dragage), suivie du brassage du mélange, puis de la centrifugation ou de la filtration de celui-ci ou de la décantation du surnageant.

Essai toxicologique de référence (ou *essai avec un toxique de référence*) – Essai effectué à l'aide d'un toxique de référence parallèlement à un essai de toxicité sur un sédiment ou dans l'eau seulement, afin d'estimer la sensibilité des organismes au moment de l'évaluation de la substance ou matière d'essai, de même que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire en regard de ce toxique. Toute déviation par rapport à une plage normale préétablie indique que la sensibilité des organismes expérimentaux ainsi que le rendement et la précision de l'essai sont suspects. Le plus souvent, un essai toxicologique de référence est effectué en l'absence de sédiment (c.-à-d. un essai *dans l'eau seulement*), mais il peut aussi prendre la forme d'un essai sur un *sédiment enrichi*.

Lixiviat – Eau, usée ou non, ayant traversé une colonne de sol ou de déchets solides dans l'environnement.

Matière – *Substance* dont est faite une chose. Ses caractéristiques seraient plus ou moins uniformes. Un sédiment, un effluent, un lixiviat, un éluatriat ou une eau de surface sont des matières. Habituellement, une matière renferme un nombre plus ou moins grand de substances.

Sédiment – Matière particulaire naturelle qui, après son transport jusque dans l'eau, s'est déposée sur le fond de l'eau. Ce terme peut également désigner un substrat artificiel constitué de matières particulaires choisies [p. ex., sable d'une granulométrie donnée, bentonite (argile)] dans lequel les organismes expérimentaux peuvent fourir.

Sédiment contaminé – Sédiment renfermant des substances chimiques qui posent une menace connue ou potentielle pour l'environnement ou la santé humaine.

Sédiment d'essai – Échantillon de sédiment entier prélevé sur le terrain à un endroit présumé contaminé par au moins une substance chimique, qu'on se propose d'utiliser dans un essai toxicologique avec des amphipodes. Parfois, le terme désigne tout échantillon de sédiment ou tout mélange de sédiment enrichi (y compris un sédiment témoin et un sédiment de référence) utilisé dans l'essai.

Sédiment de référence – Échantillon de sédiment présumé *non contaminé*, prélevé sur le terrain et choisi du fait que ses propriétés (p. ex., granulométrie, compacité, teneur en matière organique totale) correspondent étroitement à celles de l'échantillon du sédiment d'essai, sauf pour ce qui est de la teneur en contaminants chimiques. Il provient souvent d'un site où l'influence d'une ou de plusieurs sources de contamination est inexistante (c.-à-d. un site de référence), mais il se trouve dans les environs du lieu de prélèvement de l'échantillon de sédiment d'essai. (V. aussi *site*.)

Sédiment enrichi – Tout sédiment (contaminé ou non) auquel on a ajouté en laboratoire une substance ou matière d'essai, comme une substance chimique, un mélange de substances chimiques, des boues (notamment des boues de forage), des matériaux de dragage contaminés ou des sédiments contaminés, et qui a ensuite été mélangé soigneusement afin de répartir également la substance ou matière dans tout le sédiment.

Sédiment entier – Sédiment intact auquel sont exposés les organismes expérimentaux. Un sédiment entier n'est ni une forme ni un dérivé d'un sédiment (p. ex., eau de porosité) ni un sédiment remis en suspension.

Sédiment non contaminé – Sédiment exempt de toute substance à une concentration pouvant causer des désordres observables chez les organismes expérimentaux, abrégier leur survie ou ralentir leur croissance pendant l'essai.

Sédiment témoin – Sédiment *non contaminé*, c'est-à-dire exempt de tout contaminant à des concentrations susceptibles d'influer sur la survie, la croissance ou le comportement des organismes expérimentaux. Il peut s'agir d'un sédiment naturel provenant d'un lieu non contaminé, ou encore d'un sédiment préparé (reconstitué). Un sédiment témoin ne doit contenir aucune substance ou matière d'essai ajoutée et il doit permettre un taux de survie acceptable (c.-à-d. $\geq 80\%$) des organismes pendant l'essai. Un sédiment témoin permet d'interpréter les données tirées des essais de toxicité sur un sédiment d'essai; il sert également de sédiment de base dans les procédures d'enrichissement.

Site – Étendue délimitée de sédiments utilisée ou envisagée comme zone d'étude, habituellement parce qu'elle est considérée comme contaminée ou susceptible d'être contaminée par des activités anthropiques. Un *site de référence* est un site où l'influence d'une ou de plusieurs sources de contamination est inexistante, mais il se trouve dans les environs du lieu de prélèvement de l'échantillon de sédiment d'essai (v. figure 2). (V. aussi *sédiment de référence*.)

Solution mère – Solution concentrée de la substance ou matière d’essai. On ajoute des volumes mesurés de la solution mère à l’eau de dilution pour préparer les concentrations voulues des solutions d’essai.

Station d’échantillonnage – Lieu déterminé d’un site où s’effectue le prélèvement d’un ou de plus d’un échantillon de sédiment (échantillon prélevé sur le terrain) aux fins des essais toxicologiques et des analyses physicochimiques connexes (v. figure 2). Une station d’échantillonnage de référence est un lieu défini d’un site de référence où l’échantillon ou les échantillons de *sédiment de référence* sont prélevés. (V. aussi *site*.)

Substance – Matière particulière ayant des propriétés plus ou moins uniformes. Le terme a un sens plus restreint que *matière* et pourrait s’employer pour désigner, par exemple, un élément naturel ou un produit manufacturé.

Substance chimique – Tout élément, composé, préparation, produit chimique ou mélange de substances qui pourrait être associé à des sédiments ou à de l’eau, s’y déposer, y être mélangé ou ajouté, ou qui pourrait pénétrer dans l’environnement par suite d’un déversement, d’un épandage ou d’un rejet.

Témoin – Dans une enquête ou une étude, traitement reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière faisant l’objet de l’étude. Dans un essai toxicologique, le témoin doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d’exposition, mais il ne doit pas renfermer de substance ou matière d’essai contaminée. Le témoin sert à vérifier l’absence de toxicité mesurable attribuable aux conditions de base de l’essai (p. ex., qualité de l’eau de dilution, santé des organismes expérimentaux ou effets de la manipulation de ces derniers).

Témoin sédiment-solvant – Échantillon de sédiment inclus dans un essai sur un *sédiment enrichi* dans lequel il est nécessaire d’introduire un solvant organique pour solubiliser la substance chimique d’essai avant de le mélanger avec une quantité mesurée de *sédiment témoin*. Le volume de solvant utilisé dans la préparation du témoin sédiment-solvant doit contenir la même concentration d’agent solubilisant que l’échantillon de sédiment enrichi contenant la plus forte concentration de la ou des substances chimiques d’essai. Cette concentration de solvant ne devrait pas avoir d’effet néfaste sur les organismes expérimentaux pendant l’essai. Tout essai dans lequel on utilise un solvant organique pour préparer une ou plusieurs concentrations de sédiment enrichi avec une substance chimique doit inclure un témoin sédiment-solvant. (V. aussi *sédiment témoin*, *substance chimique* et *sédiment enrichi*.)

Toxique de référence – Étalon chimique permettant d’établir la fiabilité des données sur la toxicité d’une substance ou matière d’essai. Dans la plupart des cas, on procède à un essai avec un toxique de référence afin d’estimer la sensibilité des organismes ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus en regard de cette substance au moment où on évalue la substance ou matière d’essai.

Termes relatifs aux statistiques et à la toxicologie

a priori – Se dit de ce qui est indépendant de l’expérience. Dans le contexte des plans d’expérience et de la statistique, un essai planifié avant la collecte de données constitue un essai a priori. Les objectifs et le plan d’expérience influeraient sur les décisions quant au choix de l’essai a priori à exécuter. (V. aussi *post-hoc*.)

Analyse de contrastes – Comparaison des taux de mortalité obtenus pour différentes stations d'échantillonnage. D'un point de vue mathématique, une analyse de contrastes suppose la répartition des sommes des carrés d'une variable indépendante nominale pour vérifier une hypothèse *a priori* définie par un contraste entre des variables indépendantes.

Biomasse – Poids sec total des amphipodes survivants dans une *répétition* à la fin de l'essai, divisé par le nombre des juvéniles qui s'y trouvaient au départ. Le *paramètre* de biomasse représente une combinaison de l'effet sublétalet et de la mortalité.

Carte de contrôle – Diagramme servant à suivre l'évolution des effets mesurés d'un toxique de référence. La date de l'essai se trouve sur l'axe horizontal; sur l'axe logarithmique vertical, on porte la concentration à laquelle l'effet est observé.

CI_p ou *concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)* – Concentration estimative ponctuelle d'une substance ou matière d'essai qui inhibe, selon le pourcentage précisé, une fonction biologique quantitative, comme la croissance. Ainsi, la CI₂₅ pourrait être la concentration qui, estime-t-on, réduit de 25 % le poids sec des organismes expérimentaux à la fin de l'essai, par rapport au poids sec des organismes des groupes témoins. La CI_p devrait être établie dans tout essai toxicologique visant à mesurer un effet variant constamment, comme le poids sec à la fin de l'essai, la reproduction ou la respiration.

CL₅₀ ou *concentration létale médiane* – Concentration d'une substance ou matière dans le sédiment (p. ex., mg/kg) ou dans l'eau (p. ex., mg/L) qu'on estime mortelle pour 50 % des organismes expérimentaux. La CL₅₀ et ses limites de confiance à 95 % sont normalement dérivées de l'analyse statistique des mortalités survenues à chacune des 5 concentrations expérimentales ou plus, après une période d'exposition donnée. On doit préciser la durée de l'exposition (p. ex., CL₅₀ 96 h pour un essai toxicologique de référence dans l'eau seulement, ou CL₅₀ 14 jours pour un essai toxicologique *de survie et de croissance* avec *H. azteca*). Selon les objectifs de l'étude, une concentration létale autre qu'une CL₅₀ (p. ex., CL₂₅) peut être calculée en remplacement ou en plus de la CL₅₀.

CMEO ou *concentration minimale avec effet observé* – Concentration la plus basse d'une substance ou matière d'essai à laquelle des organismes sont exposés et qui cause des effets sublétaux observables et statistiquement significatifs. Par exemple, la CMEO pourrait être la concentration minimale à laquelle le poids sec des organismes exposés présente, à la fin de l'essai, un écart significativement inférieur au poids sec des organismes des groupes témoins.

Coefficient de variation (CV) – Écart type (ET) d'un ensemble de données divisé par la moyenne, exprimé sous forme de *pourcentage*. Le coefficient de variation est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$CV (\%) = 100 \text{ ET} \div \text{moyenne}$$

CSEO ou *concentration sans effet observé* – Concentration la plus élevée d'une substance ou matière d'essai à laquelle des organismes sont exposés et qui ne cause aucun effet sublétalet observable et statistiquement significatif. Par exemple, la CSEO pourrait être la concentration la plus élevée à laquelle une variable observée, comme le poids sec à la fin de l'essai, ne présente pas d'écart significatif (réduction) par rapport aux organismes des groupes témoins.

Essai toxicologique (ou *essai de toxicité*) – Détermination de l'effet d'une substance ou matière sur un groupe d'organismes choisis (p. ex., *H. azteca*) dans des conditions précises. Un essai en milieu aquatique ou sur un sédiment permet habituellement de mesurer la proportion d'organismes touchés (effet *quantique*) et/ou l'ampleur de l'effet observé (effet *quantitatif* ou gradué) après exposition à une substance ou matière d'essai donnée (p. ex., échantillon de sédiment ou d'*eaux usées*) ou à un mélange (p. ex., substance chimique et sédiment ou eau).

Homoscédasticité – Propriété des données dont le diagramme de dispersion se caractérise par une homogénéité des résidus. Ce terme s'applique lorsque la variance des résidus n'est pratiquement pas différente de celle de la variable indépendante (c.-à-d. les concentrations d'essai ou de traitement). Lorsqu'on effectue des analyses statistiques et qu'on évalue les résidus (p. ex., à l'aide du test de Levene), dans le cas de données dénotant une homoscédasticité (ou homogénéité des résidus), on n'observe aucune différence importante dans la variance des résidus pour toutes les concentrations d'essai ou de traitement.

Hormèse – Phénomène par lequel de faibles concentrations de la substance ou matière d'essai stimulent le rendement des organismes expérimentaux, par comparaison avec les organismes témoins (autrement dit, il y a amélioration du rendement à une ou plusieurs faibles concentrations par comparaison avec le traitement *témoin*). À des concentrations plus élevées, on observe des effets nocifs.

Létal – Qui cause directement la mort. Chez les amphipodes, la mort est définie par la cessation de tous les signes visibles de mouvement ou d'activité (p. ex., aucune contraction des pléopodes).

Limite de contrôle de 95 % – Limite, calculée logarithmiquement, située à plus ou moins deux écarts types (± 2 ET), de part et d'autre de la moyenne géométrique historique des paramètres de mesure d'essais toxicologiques avec un toxique de référence.

Moyenne géométrique – Moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. La moyenne géométrique a pour avantage d'atténuer l'influence qu'exercent les valeurs extrêmes sur la moyenne, comme lorsqu'une moyenne arithmétique est établie. On peut calculer la moyenne géométrique comme étant la racine énième du produit de « n » valeurs et, aussi, comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes de « n » valeurs.

Non ordonné – En parlant de stations d'échantillonnage ou de variables indépendantes, se dit de l'absence de gradient. Ce terme, qui est synonyme de nominal, pourrait s'appliquer à des stations d'échantillonnage situées dans un lac, par exemple (v. figure 2). (V. aussi *variable ordinale*.)

Normalité (ou *distribution normale*) – Désigne une série de données d'observations décrivant une courbe symétrique en forme de cloche. Cette série met en lien la fréquence d'occurrence et l'ampleur du phénomène mesuré. Dans une *distribution normale*, la plupart des données d'observation se regroupent près de la valeur moyenne et deviennent progressivement moins nombreuses à mesure qu'on se rapproche des extrêmes de la plage de valeurs. La distribution normale joue un rôle central dans la théorie statistique en raison de ses propriétés mathématiques. Elle revêt également une grande importance dans les sciences biologiques du fait que beaucoup de phénomènes biologiques suivent la même courbe. Dans un bon nombre de tests statistiques, on présume que les données suivent une courbe de distribution normale, de sorte qu'il peut être nécessaire de déterminer si c'est le cas d'un ensemble de données en particulier.

Ordinal – V. *variable ordinale*.

Paramètre – Mesure ou valeur (il peut y en avoir plus d'une) caractérisant les résultats d'un essai (p. ex., CL₅₀, CI₂₅). La réponse des organismes expérimentaux (p. ex., mortalité, accroissement du poids des organismes vivants) constitue également un paramètre.

post-hoc – Se dit d'une chose postérieure à une autre. Dans le contexte des plans d'expérience et de la statistique, un test qu'on décide d'exécuter après la collecte de données constitue un test *post-hoc*. Dans un sens plus général, un test *post-hoc* vise à déterminer quelles moyennes des traitements diffèrent les unes des autres, et ce, afin de contrôler le taux d'erreur global de type I. (V. aussi *a priori*.)

Précision – Degré de rapprochement des données recueillies au cours de mesures répétées de la même quantité. La précision décrit le degré de certitude entourant un résultat ou le rapprochement des valeurs d'un paramètre dérivées d'une analyse statistique, comme la CI_p.

Quantique – Adjectif utilisé dans des expressions comme données quantiques et essai quantique. Un effet quantique est un effet auquel chaque organisme d'essai réagit ou ne réagit pas. Par exemple, un animal peut soit vivre, soit mourir, ou encore se développer normalement ou anormalement. En général, l'effet quantique est exprimé sous forme de nombre ou de pourcentage.

Quantitatif – Adjectif utilisé dans des expressions comme données quantitatives et essai quantitatif. Un effet quantitatif est un effet dont la valeur mesurée peut être un nombre entier ou fractionnel sur une échelle numérique. Il peut s'agir, par exemple, du poids de chaque organisme, ou encore du nombre de descendants produits à la fin de l'essai.

Régression logistique – Méthode d'analyse de la relation entre une variable dépendante, comme la réponse des organismes expérimentaux, et au moins une variable indépendante. Les caractéristiques propres à la régression logistique utilisée dans la présente méthode incluent la variable réponse binaire (mortalité) et trois classes de variables indépendantes (*continue*, *ordinale* et *nominale*). La régression logistique est un modèle linéaire, et la linéarité est attribuable à la transformation logit de la variable dépendante.

Relation traitement-réponse monotone – Augmentation (ou diminution) constante des effets (réponse) dans la plage de la variable indépendante. Une courbe de létalité type est monotone du fait que la létalité augmente avec la dose. Par contre, une courbe d'inhibition dénotant une *hormèse* est non monotone du fait qu'il y a stimulation à faible dose, puis inhibition à mesure que la dose augmente.

Répétition (ou *réceptif d'essai de répétition*) – Réceptif d'essai individuel renfermant un nombre prescrit d'organismes exposés soit à une concentration (ou un réplicat) de la substance ou matière d'essai, soit à un traitement témoin ou de référence. Comme il s'agit d'une unité expérimentale indépendante, tout transfert d'organismes ou de substance ou matière d'essai d'un réceptif d'essai à un autre invaliderait l'analyse statistique fondée sur la répétition. Le terme répétition désigne également les sous-échantillons (c.-à-d. les réplicats de laboratoire) du sédiment témoin (v. 3.5), du sédiment enrichi (v. 6.2) ou de l'eau (v. 7.3), qui sont tous préparés en laboratoire. Dans un essai sur un sédiment témoin et dans chaque traitement d'un essai à concentrations multiples, il devrait normalement y avoir ≥ 5 répétitions.

Réplicat – Échantillon prélevé sur le terrain à une même station d'échantillonnage afin d'obtenir une estimation de l'erreur d'échantillonnage ou d'améliorer la justesse de l'estimation (v. figure 2). Lorsqu'un seul échantillon de sédiment est prélevé à une station d'échantillonnage, il est traité comme un réplicat. Les échantillons additionnels sont considérés comme des réplicats supplémentaires – ils sont traités de la même façon, mais entreposés dans des récipients à échantillon distincts (ils ne sont pas regroupés).

Sublétalet – Se dit d'un effet nuisible se manifestant en deçà de la concentration ou du niveau de contamination causant directement la mort d'un organisme au cours d'un essai.

Traitement – En règle générale, intervention ou procédure dont l'effet doit être mesuré. Plus précisément, dans un essai toxicologique, un traitement est une condition ou une procédure visant à mesurer les effets d'une substance ou matière sur les organismes expérimentaux. Le traitement pourrait consister en une concentration donnée d'une substance ou matière potentiellement toxique, ou encore en une matière d'essai en particulier (p. ex., échantillon de sédiment contaminé, témoin ou de référence; échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat, d'eau réceptrice ou d'eau témoin).

Toxicité – Capacité d'une substance ou matière de provoquer un ou des effets nocifs tant *létaux* que *sublétaux* chez des organismes vivants.

Toxique – Désigne ou qualifie une substance ou une matière ayant des effets nocifs sur des organismes si elle se trouve en quantité suffisante, au bon endroit.

Variable continue – Variable qui peut prendre toutes les valeurs de nombres entiers ou fractionnaires sur une échelle numérique. L'adjectif *continu*, qui est synonyme ici de *quantitatif*, est utilisé plus couramment par les statisticiens du domaine de la toxicologie, particulièrement en Europe. (V. aussi *quantitatif*.)

Variable ordinale – Classe de données discrètes à l'intérieur d'un ordre de grandeur relatif allant de « bas » à « élevé » (p. ex., aucun effet, effet minimal, effet marqué). L'adjectif « ordinal » s'emploie ici dans le cas de stations d'échantillonnage censées suivre un gradient de concentration. En d'autres termes, les concentrations de la ou des substances à l'étude devraient augmenter ou diminuer de manière séquentielle selon l'ordonnement des stations d'échantillonnage. Ce serait le cas, par exemple, de stations d'échantillonnage situées en aval d'une source ponctuelle d'effluent. Aussi appelée variable *ordonnée*, une variable ordinale a la propriété d'être ordonnée. (V. aussi *non ordonné*.)

Remerciements

Les auteurs de la première édition de la présente méthode d'essai biologique, publiée en décembre 1997, sont D.J. McLeay [McLeay Environmental Ltd., Victoria (BC)] et K.E. Day [Direction de la conservation des écosystèmes aquatiques, Institut national de recherche sur les eaux – INRE, Environnement Canada, Burlington (ON)].

Avec le concours de K. Conlan et E. Hendrycks, Musée canadien de la nature [Ottawa (ON)], E.L. Bousfield [chercheur associé, Royal British Columbia Museum (BC)] a préparé la note taxinomique et les éléments d'histoire naturelle présentés à l'annexe G. Par ailleurs, P. Hamr, S. Kirby et P. Gillis ont apporté leur concours aux essais et participé à la validation de la méthode dans les laboratoires d'Environnement Canada à l'INRE, Centre canadien des eaux intérieures [Burlington (ON)]. J.B. Sprague [Sprague Associates Ltd., Salt Spring Island (BC)] a rédigé, révisé ou amélioré les notes d'orientation de la première édition sur la statistique.

*La première édition du présent rapport se fondait sur des rapports antérieurs (publiés ou non) décrivant les conditions et modes opératoires utilisés au Canada et aux États-Unis pour l'élevage de *Hyaella azteca* et pour l'exécution d'essais toxicologiques sur des sédiments avec cet amphipode dulcicole. Les auteurs de cette première édition se sont notamment inspirés des marches à suivre, des conditions précises d'élevage et des essais utilisant *H. azteca* que recommandait l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA, 1994a), de même que d'études intralaboratoires et interlaboratoires ultérieures avec *Chironomus riparius*, réalisées par des chercheurs des deux pays (Milani et coll., 1996). Pour ce qui concerne l'élaboration de la méthode et les études de validation (Milani et coll., 1996), nous sommes particulièrement reconnaissants, pour leur participation et leur contribution, aux personnes et aux organismes suivants : D. Milani et S. Kirby (INRE); K. Doe [Environnement Canada, Moncton (NB)]; K. Holtze [B.A.R. Environmental Inc., Guelph (ON)]; A. Putt [Springborn Laboratories Inc., Wareham (MA)]; P. Riebel [Beak Consultants Ltd., Dorval (QC)] et G. van Aggelen [Environnement Canada, North Vancouver (BC)].*

En sa qualité de responsable scientifique de la première édition de la présente méthode biologique, R.P. Scroggins [Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Gloucester (ON)] a fourni une orientation et un apport techniques au projet, pendant toute sa réalisation. Des membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (annexe B) ont participé à l'élaboration et à l'examen du rapport originel, et nous les en remercions. De nombreuses observations utiles ont été formulées par chaque membre du comité d'experts scientifiques d'Environnement Canada chargé de la première et de la dernière révision de la première édition du rapport : G.T. Ankley [USEPA, Duluth (MN)]; U. Borgmann [Pêches et Océans Canada, Burlington (ON)]; G.A. Burton, Jr. [Université d'État Wright, Dayton (OH)]; C.W. Hickey (NIWA Ecosystems, Hamilton, Nouvelle-Zélande); C.G. Ingersoll [U.S. Geological Survey, Columbia (MO)]; K. Liber [Université du Wisconsin, Superior (WI)]; L. Maltby (Université de Sheffield, Sheffield, Royaume-Uni); G. van Aggelen. Trois des principaux auteurs du document USEPA (1994a), soit C.G. Ingersoll, G.T. Ankley et G.A. Burton, faisaient partie de ce comité.

Outre les membres du comité consultatif scientifique d'Environnement Canada qui ont contribué à l'élaboration de la méthode, les personnes suivantes ont relu l'ébauche finale de la première édition et formulé de nombreuses observations utiles : J. Black et W. McCulloch [EA Engineering, Science and Technology Inc., Sparks (MD)]; D. Boersma [Direction des produits chimiques commerciaux,

Environnement Canada, Ottawa (ON)]; R. Casey [Centre environnemental de l'Alberta, Vegreville (AB)]; G. Dave (Université de Göteborg, Suède); M.P. Hamer (Zeneca Agrochemicals, Bracknell, Berkshire, Royaume-Uni); R.A. Hoke [SAIC, Hackensack (NJ)]; M.L. Hinman [Exxon Biomedical Sciences Inc., Millstone (NJ)]; J.W. Lazorchak [USEPA, Cincinnati (OH)]; B. McGee [Université du Maryland, Queenstown (MD)]; A. Mueller (Federal Biological Research Center – Agriculture, Kleinmachnow, Allemagne); M.H. Murdoch [EVS Consultants Ltd., North Vancouver (BC)]; C. Naylor (Université de Sheffield, Sheffield, Royaume-Uni); G. Pagano (Istituto Nazionale Tumori-Pondazione, Naples, Italie); F. Quiniou (IFREMER, Centre de Brest, Plouzané, France); C. Roghair (National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Pays-Bas); G.L. Stephenson [Ecological Services for Planning Ltd., Guelph (ON)]; K. Taylor [Direction des produits chimiques commerciaux, Environnement Canada, Ottawa (ON)]; A. Verbeek [Chemex Labs. Alberta Inc., Edmonton (AB)]; L. Vigano (Istituto de Ricerca Sulle Acque, Milan, Italie); P. Winger [Université de la Géorgie, Athens (GA)].

La présente édition (la deuxième) a été préparée par J. Miller [Miller Environmental Sciences Inc., King City (ON)], avec l'aide et les conseils de L. Taylor (gestionnaire, Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes) et de L. Van der Vliet (Section de l'évaluation biologique et normalisation), Environnement Canada [Ottawa (ON)]. Nous remercions sincèrement B. Zajdlik [Zajdlik and Associates, Rockwood (ON)] pour ses conseils en matière de statistiques, lesquels ont été rédigés et révisés par L. Van der Vliet. Cette deuxième édition renferme de nombreuses mises à jour fondées sur plusieurs études menées ces dernières années par des laboratoires d'essais toxicologiques du Canada. Les personnes suivantes, membres du personnel des laboratoires ayant participé à ces études ou du groupe de travail spécial, ont formulé de nombreux commentaires utiles et nous leur en sommes reconnaissants : K. Doe et P. Jackman [Laboratoire des essais environnementaux de l'Atlantique, Environnement Canada, Moncton (NB)]; K. Hunter, T. Watson-Leung, J. Schroeder et D. Poirier [Unité de la toxicologie aquatique, ministère de l'Environnement de l'Ontario, Toronto (ON)]; G. van Aggelen, C. Buday et G. Schroeder [Laboratoire des essais environnementaux du Pacifique et du Yukon, North Vancouver (BC)]; A. Bartlett et W. Norwood (INRE). Nous exprimons notre gratitude à L. Novak, K. Holtze et E. Jonczyk [Aquatox Testing and Consulting Inc., Guelph (ON)], qui ont perfectionné la méthode d'essai dans l'eau seulement avec H. azteca. Merci également à L. Taylor, qui a agi comme autorité scientifique, en plus d'apporter une aide technique et d'orienter les travaux.

Section 1

Introduction

1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs dans le monde, on se sert d'essais toxicologiques en milieu aquatique pour mesurer et surveiller les effets de substances individuelles ou de mélanges complexes susceptibles d'être toxiques pour les organismes aquatiques indigènes présents dans l'environnement (eau et sédiment). En plus de servir à des fins de recherche, les résultats de ces essais permettent, par exemple, de déterminer s'il faut réglementer les rejets ou fixer des normes en matière d'effluents.

Reconnaissant qu'une seule méthode d'essai ou un seul organisme expérimental ne pouvait répondre aux besoins d'une approche globale en matière de conservation et de protection de l'environnement, le Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (GIEE, annexe B) a proposé de mettre au point un ensemble d'essais de mesure de la toxicité en milieu aquatique qui seraient généralement acceptables au Canada et qui permettraient de mesurer différents effets toxiques au moyen de diverses substances ou matières (p. ex., échantillons de substances chimiques, d'effluents, d'eau réceptrice ou de sédiment) et d'organismes représentatifs de différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques.

En 1987, Environnement Canada et le GIEE ont recommandé l'élaboration d'un ensemble cohérent de méthodes d'essai qui serviraient couramment à prévenir, à évaluer, à gérer et à réduire la contamination des sédiments (Sergy, 1987). Les laboratoires régionaux d'Environnement Canada (annexe C) ont alors entrepris une série d'études (McLeay et coll., 1989, 1991, 1992, 1993; Paine et McPherson, 1991a, 1991b; Doe et Wade, 1992; Yee et coll.,

1992) afin de mettre au point et de valider une méthode d'essai biologique normalisée qui permettrait de mesurer la toxicité d'échantillons de sédiments contaminés. Cette méthode utiliserait au moins une des 6 espèces d'amphipodes marins ou estuariens communs aux eaux côtières du Pacifique ou de l'Atlantique (EC, 1992a). Le GIEE a demandé à Environnement Canada de normaliser, parmi différents essais toxicologiques sur des sédiments, celui sur la survie et la croissance de l'amphipode dulcicole *Hyalella azteca*. C'est en 1997 que cette méthode (SPE 1/RM/33) a été incluse dans la série de méthodes d'essai biologique préparées par Environnement Canada afin d'aider à satisfaire aux exigences du Canada concernant l'évaluation et la protection de l'environnement (EC, 1997b). Diverses raisons ont présidé au choix de *H. azteca* : la vaste répartition de l'espèce, sa présence dans les sédiments d'eau douce, son importance écologique, sa facilité d'élevage et de manipulation au cours des essais, sa croissance rapide, son cycle biologique court, sa sensibilité aux contaminants présents dans les sédiments et son utilisation répandue dans les essais de toxicité sur des sédiments.

Après 9 ans d'application dans des laboratoires d'essais publics et privés, Environnement Canada a reconnu qu'il fallait réévaluer des aspects précis de la méthode. Il a créé en 2006 un groupe de travail spécial chargé de réviser la méthode SPE 1/RM/33 et de déterminer les priorités en matière de recherche. Il s'agissait d'établir un plan de recherche afin de régler certaines questions d'ordre méthodologique et de formuler des recommandations à inclure dans la méthode révisée. Depuis ce temps, certains laboratoires d'essais toxicologiques du Canada ont effectué des recherches axées sur

l'amélioration des paramètres d'exécution des essais avec *H. azteca*, dont les rations (type d'aliments et quantité), l'âge des organismes expérimentaux et la variation de leur taux de croissance, l'intensité lumineuse requise pendant l'élevage, les ratios sédiment-eau et l'exposition des organismes dans l'eau *seulement* pendant 14 jours. Les résultats de ces recherches ont été publiés dans MESI (2010). Les révisions fondées sur les conclusions de ce rapport sont incluses dans la présente méthode, de même que des conseils actualisés relatifs aux statistiques [à l'exception des réplicats de laboratoire (c.-à-d. les *réipients d'essai de répétition*) pour les essais à concentration unique sur un sédiment prélevé sur le terrain] et de nouvelles options concernant le type d'exposition (à savoir *en conditions statiques* et, en cas de dégradation de la qualité de l'eau, à *renouvellement intermittent*). Le présent rapport constitue donc une version révisée et actualisée de SPE 1/RM/33 (EC, 1997b), qu'elle remplace et annule.

En règle générale, les expérimentateurs canadiens ont diversement utilisé des échantillons de sédiments d'eau douce et *H. azteca* dans leurs essais, en se fondant notamment sur les procédures décrites dans Borgmann et Munawar (1989), Borgmann et coll. (1989) et ASTM (1991a, 1993), de même sur les modes opératoires normalisés inédits de l'Institut national de recherche sur les eaux (INRE, 1992). D'autres méthodes notables d'élevage et d'utilisation de *H. azteca* dans des essais ont inspiré la présente méthode, dont les suivantes : de March, 1981; FDA, 1987; Ingersoll et Nelson, 1990; Smith et coll., 1991a, 1991b; USEPA, 1991a, 1991b; MPO, 1992; Norberg-King, 1992; Ankley et coll., 1993a; Brooke et coll., 1993; Kubitz, 1993a, 1993b; Borgmann, 1996, 2002; Borgmann et Borgmann, 1997; Borgmann et Norwood, 1999; AFNOR, 2003; Ivey et coll., 2004, 2011; Borgmann et coll., 2005a, 2005b; Hockett et coll., 2011; ISO, 2011; P. Jackman, Laboratoire

des essais environnementaux de l'Atlantique – LEEA, Environnement Canada, Moncton (NB), comm. pers., 2012.

En 1994, l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA) a publié de nouvelles méthodes de mesure de la toxicité de contaminants associés à des sédiments, y compris un essai sur un échantillon de *sédiment entier* avec *H. azteca* (USEPA, 1994a)¹. Ces méthodes ont été mises à jour en 2000 (USEPA, 2000), et le Comité E47 de l'American Society for Testing and Materials (ASTM, 1995a, 2010) les a adoptées comme méthodes normalisées. La présente méthode d'Environnement Canada s'inspire fortement des modes opératoires d'élevage de *H. azteca* et d'essai avec ces amphipodes énoncés dans USEPA (1994a, 2000). Différence de taille, cependant, l'essai avec *H. azteca* décrit dans USEPA (1994a, 2000) et ASTM (1995a, 2010) dure 10 jours et il est axé sur la survie des amphipodes, tandis que la méthode d'Environnement Canada dure 14 jours et porte sur *la survie et la croissance* des organismes. En outre, l'essai décrit dans la présente méthode est normalement exécuté *en conditions statiques* (alors qu'un renouvellement quotidien est prévu dans USEPA, 1994a et 2000) : pendant l'exposition, l'eau *sus-jacente* n'est pas renouvelée (sauf pour compenser les pertes dues à l'évaporation) et est aérée en continu.

On a aussi inclus dans la méthode un essai à *renouvellement intermittent* (v. 3.1 et section 4), auquel on *peut* avoir recours lorsque la qualité

¹ Préparé par des membres du Freshwater Sediment Toxicity Assessment Committee des États-Unis, ce rapport (USEPA, 1994a), reflétait le consensus des chercheurs du Canada et des États-Unis activement engagés dans les essais toxicologiques sur un sédiment avec *H. azteca* (Ingersoll, 1992; Norberg-King, 1992; Burton et Ingersoll, 1994; Ingersoll et coll., 1995; Burton et coll., 1996). L'USEPA a publié une version révisée (une deuxième édition) du manuel en mars 2000 (USEPA, 2000).

de l'eau d'essai recouvrant le *sédiment de référence* se dégrade [à cause d'une forte teneur en ammoniac, d'un *pH* se situant à l'extérieur de la plage de tolérance de *H. azteca* et/ou d'une faible teneur en oxygène dissous (OD)]. Ce dernier essai peut être exécuté *seulement* s'il a pour objectif l'évaluation des effets toxiques d'une substance ou matière d'essai, à l'exclusion des effets nocifs ou modificateurs de ces facteurs confusionnels.

La première édition de la présente méthode prévoyait la possibilité d'un essai à renouvellement quotidien, conformément aux modes opératoires décrits dans USEPA (1994a) et ASTM (1995a), c'est-à-dire le renouvellement 2 fois par jour de l'eau *sus-jacente* dans les récipients d'essai, sans aération de cette eau. Cette possibilité a été maintenue ici, mais seulement dans les conditions précises décrites dans la section 4. On nourrit les organismes avec un mélange standard de LCT (levure, *Cerophyll*^{MC} et nourriture pour truite), avec des flocons d'aliments pour poissons (du commerce), ou avec un mélange à 50/50 de ces deux types d'aliments, soit chaque jour, soit 3 fois par semaine en des journées non consécutives.

Le présent rapport révisé et actualisé décrit les modes opératoires universels de préparation et d'exécution d'essais toxicologiques sur un sédiment, avec *H. azteca*. Il décrit également les conditions et modes opératoires exigés ou recommandés pour évaluer différents types de substances ou matières (p. ex., échantillons de sédiment ou de déchets particuliers prélevés sur le terrain, échantillons d'au moins une *substance chimique* mélangée en laboratoire avec un sédiment naturel ou préparé, ou encore mis en contact avec ce dernier).

On a inclus dans la présente méthode un essai de 14 jours *dans l'eau seulement* (section 7), lequel peut être utilisé seul ou parallèlement à un essai sur un sédiment en vue de faciliter la distinction entre la contamination historique d'un milieu

récepteur et l'apport actuel de contaminants par un effluent industriel. Cet essai peut être appliqué dans la « recherche des causes » qu'exige Environnement Canada aux termes de son programme d'Étude de suivi des effets environnementaux.

L'organigramme de la figure 1 donne un aperçu général des sujets universels abordés ici. Il énumère les aspects particuliers qui concernent expressément les essais sur des échantillons de sédiment ou de déchets particuliers semblables prélevés sur le terrain (p. ex., boues, dont les boues de forage, matières draguées); les essais sur un *sédiment enrichi* en laboratoire avec une ou plus d'une substance chimique, un *sédiment contaminé* ou des déchets particuliers; les essais faisant appel à des échantillons d'eaux *usées* ou de substance chimique (pour les essais dans l'eau seulement).

La première édition de la présente méthode d'essai biologique a été élaborée après examen des variantes des méthodes d'élevage et d'essai énoncées dans les méthodes² canadiennes et étatsuniennes décrivant la préparation et la réalisation d'essais toxicologiques sur un sédiment, avec l'amphipode dulcicole *H. azteca*. L'annexe D résume les variantes actuelles et antérieures des méthodes d'élevage de cette espèce ainsi que de prélèvement de jeunes sujets pour les essais toxicologiques. L'annexe E résume les variantes actuelles ou antérieures des essais de croissance et/ou de survie pour mesurer la toxicité d'un sédiment chez *H. azteca*. L'annexe F résume les variantes

² Les listes de ces variantes (v. annexes D, E et F) ont été établies à partir des guides pratiques publiés, des modes opératoires normalisés mais inédits de laboratoires gouvernementaux ainsi que de rapports préliminaires. Ces documents de base sont énumérés dans les annexes selon le sigle de l'organisme dont ils émanent plutôt que sous celui de l'auteur. Cependant, les noms des auteurs et les renvois officiels sont indiqués. Les annexes D, E et F n'ont pas été mises à jour aux fins de la présente méthode; seules des corrections mineures ont été apportées à des fins d'uniformisation.

interlaboratoires des conditions et modes opératoires applicables aux *essais toxicologiques de référence* avec *H. azteca*.

Les *paramètres* biologiques des essais décrits ici sont le *pourcentage* moyen de survie et le poids sec moyen (un indicateur de croissance) à la fin

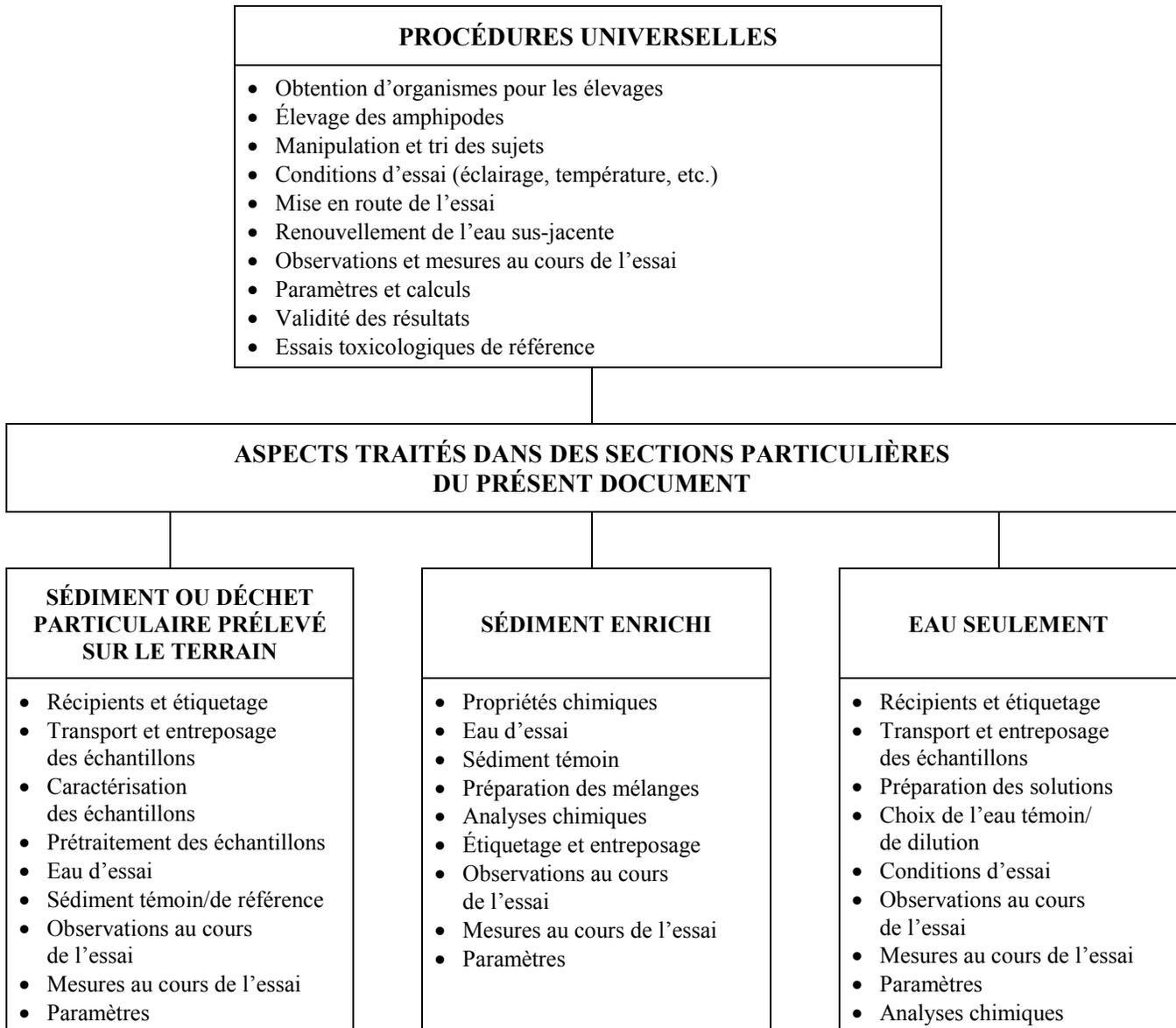


Figure 1. Points à considérer dans la préparation et l'exécution d'essais toxicologiques avec *H. azteca* et divers types de substances ou matières

des 14 jours d'exposition³. Les essais sont destinés à l'évaluation de la toxicité d'échantillons des matières suivantes :

- 1) sédiment d'eau douce prélevé sur le terrain (section 5);
- 2) boues industrielles ou urbaines et déchets particuliers semblables qui *pourraient* avoir des effets sur le milieu dulcicole (section 5);
- 3) mélange d'au moins une substance chimique dans un sédiment d'eau douce ou recouvrant celui-ci (section 6);
- 4) *effluent, éluviat, lixiviât*, eau réceptrice ou substance chimique (essais dans l'eau seulement) (section 7).

Environnement Canada (EC, 1997a) a également mis au point une méthode d'essai de 10 jours pour mesurer les effets toxiques de ces matières sur la survie et la croissance de larves de chironomes dulcicoles (*Chironomus tentans* ou *C. riparius*). Elle *peut* servir en association avec la présente méthode ou comme autre méthode. La méthode décrite ici peut aussi être employée pour mesurer et évaluer la toxicité de contaminants dans un sédiment estuarien ou la toxicité d'un mélange de substances chimiques et de sédiments d'un milieu où la *salinité* de

³ Jusqu'ici, il était de pratique courante de considérer que le poids constitue un paramètre biologique de croissance. Toutefois, si le poids des organismes au début de la période d'exposition (poids initial) n'est pas soustrait de celui observé à la fin de la période (poids final), le terme « croissance » n'est pas exact. Étant donné qu'aucune correction n'est appliquée au poids initial dans l'essai avec *H. azteca*, le paramètre de mesure qui convient est le « poids final ». Après avoir évalué des ensembles de données-échantillons et les incidences possibles, l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes a décidé de maintenir la pratique actuelle (c.-à-d. ne pas apporter de correction quant au poids sec initial). Dans le présent rapport, le terme « croissance » a été remplacé par « poids sec (final) » lorsqu'il était pratique de le faire, et ces deux termes désignent le poids sec moyen des amphipodes à la fin de l'essai. Aucun changement n'a été apporté à la mesure ou au calcul du paramètre biologique. Seule la terminologie a été révisée afin de décrire adéquatement les mesures effectuées.

l'eau sus-jacente et/ou de l'*eau de porosité* n'excède pas 15 ‰ (Nebeker et Miller, 1988; USEPA, 1994a, 2000). On utilise normalement la méthode d'Environnement Canada employant au moins une des espèces recommandées d'amphipodes estuariens ou marins communs aux eaux côtières canadiennes de l'Atlantique ou du Pacifique (EC, 1992a) pour mesurer et évaluer la toxicité des contaminants d'un sédiment estuarien ou marin.

En formulant ces modes opératoires, nous nous sommes efforcés de trouver un équilibre entre les considérations scientifiques, pratiques et pécuniaires et de faire en sorte que les résultats soient suffisamment précis pour la plupart des situations dans lesquelles ils seront utilisés. Nous supposons que l'utilisateur possède une certaine connaissance des essais toxicologiques en milieu aquatique. Nous ne fournissons pas les instructions explicites qui pourraient être exigées dans un *protocole* réglementaire, bien que le présent document se veuille un guide utile pour cette application et pour d'autres.

On trouvera dans EC (1999a) des indications sur l'application de la présente méthode et d'autres méthodes d'essai biologique, de même que sur l'interprétation et l'application des données sur les paramètres de mesure.

1.2 *Identification, répartition et cycle biologique*

H. azteca (Saussure) est un amphipode détritivore épibenthique et fousseur des sédiments d'eau douce. Les caractéristiques de ce petit crustacé (le mâle mesure ≤8 mm et la femelle, ≤6 mm) sont décrites et illustrées à l'annexe G⁴.

H. azteca vit dans les cours d'eau paresseux, les lacs et les étangs tempérés. Il est inféodé à la

⁴ L'analyse moléculaire (p. ex., le code à barres de l'ADN) porte à croire que *H. azteca* compte de nombreuses espèces (Witt et Hebert, 2000), même si, d'un point de vue morphologique, ces espèces sont identiques (v. 2.1).

couche supérieure de 1-2 cm des sédiments. Dans les habitats qu'il privilégie, sa densité a déjà atteint >10 000 sujets par mètre carré; on peut également le trouver, en nombres moins élevés, dans les terrains marécageux, les fossés, les sources, les cours d'eau et les marécages (USEPA, 1994a, 2000). L'espèce est largement répandue en Amérique du Nord, et on l'a observée dans les sédiments superficiels de lacs du Guatemala et des Antilles jusqu'à Inuvik, dans les Territoires du Nord-Ouest (de March, 1981). L'annexe G renferme des renseignements sur la répartition connue de *H. azteca* dans les eaux canadiennes et sur son habitat.

Les amphipodes abondent dans les communautés benthiques des milieux dulcicoles, estuariens et marins de l'Amérique du Nord. Les amphipodes dulcicoles, y compris *H. azteca*, sont une importante source de nourriture pour de nombreuses espèces de poissons, de sauvagine, d'échassiers, de salamandres et de gros invertébrés (de March, 1981). *H. azteca* ingérerait de façon sélective les bactéries et les algues adhérant aux particules de sédiment de <65 µm (Hargrave, 1970). Sa reproduction est sexuée. La femelle porte les œufs et les jeunes dans une poche à couvée située sur sa face ventrale. Immédiatement avant l'accouplement, elle mue et libère la progéniture de l'accouplement précédent. Selon sa taille et son état de santé, elle peut produire et libérer chaque fois jusqu'à 50 descendants. À 25 °C, *H. azteca* atteint la maturité sexuelle en 28-33 jours (de March, 1981; USEPA, 1991a, 1991b). Pour plus de renseignements sur le cycle biologique de l'espèce, prière de consulter l'annexe G.

1.3 Emploi antérieur dans des essais toxicologiques

On trouve dans Burton (1991) un excellent survol des diverses méthodes ayant servi à déterminer la toxicité de sédiments d'eau douce, y compris des essais toxicologiques avec *H. azteca* et d'autres espèces d'amphipodes dulcicoles. Nebeker et coll. (1984) ont d'abord

recommandé des essais étalés sur une partie du cycle biologique de *H. azteca* pour mesurer la toxicité de sédiments d'eau douce contaminés. Nebeker et Miller (1988) ont montré que *H. azteca* survit et se reproduit si, dans les récipients d'essai, le sédiment estuarien est recouvert d'eau douce. Ultérieurement, on a montré qu'on pouvait élever *H. azteca* dans une eau d'une salinité de ≤15 ‰, taux alors utilisé dans les essais toxicologiques appliqués aux rejets en milieu estuarien (Ingersoll et coll., 1992) ou aux sédiments estuariens contaminés (McGee et coll., 1993). L'USEPA et l'Army Corps of Engineers des États-Unis (USACE) ont recommandé l'emploi de *H. azteca* pour évaluer les matériaux de dragage qu'on envisage d'immerger dans des eaux intérieures et côtières (USEPA/USACE, 1994). Ingersoll et coll. (1995) ont examiné les méthodes d'essai de mesure de la toxicité de sédiments avec *H. azteca*, de même que leur application.

On a employé *H. azteca* dans des essais de mesure de la toxicité aiguë et chronique de diverses substances chimiques *dans l'eau seulement* (FDA, 1987; Borgmann et coll., 1989, 1990, 1991, 1993, 2005b, 2005c, 2007; Borgmann et Munawar, 1989; Schubauer-Berigan et coll., 1993; Borgmann, 1994; Hoke et coll., 1995; Phipps et coll., 1995; Borgmann et Borgmann, 1997; Wang et coll., 2008). Les paramètres biologiques de ces essais ont notamment été la survie, la croissance et le succès de la reproduction pendant tout ou partie du cycle biologique (12-14 semaines à 25 °C). On a également utilisé *H. azteca* pour mesurer, dans l'eau seulement, la bioaccumulation de certaines substances chimiques (Borgmann et coll., 1990, 1991, 1993, 2010; Norwood et coll., 2007a, 2007b). De nombreux chercheurs ont fait appel à *H. azteca* pour étudier la toxicité et la bioaccumulation de substances chimiques ajoutées au sédiment (*sédiment enrichi*) (Landrum et Scavia, 1983; Cairns et coll., 1984; Nebeker et coll., 1986, 1989; Smith et coll., 1992a; Suedel et coll., 1993a, 1993b; Kubitz et coll., 1995; Milani et coll., 1996; Whiteman et coll., 1996; Besser et coll., 1998; Borgmann

et coll., 2001a, 2001b; Bartlett et coll., 2004, 2007; Nowierski et coll., 2005; Norwood et coll., 2009).

Beaucoup d'expérimentateurs ont utilisé avec succès *H. azteca* pour évaluer la toxicité d'échantillons de *sédiments entiers* d'eau douce (p. ex., Nebeker et coll., 1984; Burton et coll., 1989; Borgmann et Munawar, 1989; Ingersoll et Nelson, 1990; Ankley et coll., 1993a, 1993b; Borgmann et Norwood, 1993; Kubitz, 1993a; Kubitz et coll., 1993; Sibley et coll., 1993; West et coll., 1993; Burton et Ingersoll, 1994; Kemble et coll., 1994; Pastorok et coll., 1994; Becker et coll., 1995; Ingersoll et coll., 1995; Kubitz et coll., 1995, 1996; Reynoldson et coll., 1995; Burton et coll., 1996; Milani et coll., 1996; Borgmann et coll., 2001a, 2004; Borgman et Norwood, 2002; Bartlett et coll., 2005). Les paramètres biologiques de ces essais, qui peuvent servir à évaluer la variation spatio-temporelle de la toxicité d'échantillons de sédiment prélevés sur le terrain, sont habituellement le taux moyen de survie et la croissance moyenne (longueur ou poids) à la fin de l'essai. On a aussi employé *H. azteca* dans des essais toxicologiques sur des extraits aqueux (eau de porosité et/ou éluutriats) de sédiments d'eau douce (Burton et coll., 1989; Ankley et coll., 1991; Schubauer-Berigan et Ankley, 1991; Sibley et coll., 1993).

Des chercheurs ont examiné les résultats d'essais de mesure de la toxicité de sédiments menés en laboratoire avec *H. azteca* afin d'évaluer l'utilité pour repérer les sites où les populations benthiques naturelles sont touchées par la présence de contaminants toxiques dans les sédiments (Becker et Bigham, 1993; Burton et Ingersoll, 1994; Canfield et coll., 1994; Schlekot et coll., 1994). Ces *études de validation sur le terrain* intègrent souvent les résultats d'essais toxicologiques en laboratoire, d'analyses chimiques simultanées d'échantillons de sédiment et de relevés sur le terrain de la diversité et de l'abondance des communautés benthiques, par l'approche dite de la triade de qualité des sédiments (Chapman et coll., 1986,

1987, 1991) ou une approche semblable. À ce jour, les études intégrées en laboratoire et sur le terrain englobant des essais de toxicité d'un sédiment pour *H. azteca* ou d'autres espèces d'amphipodes ont montré que de tels essais peuvent donner une indication fiable de la nocivité de la contamination de sédiments sur le terrain (Swartz et coll., 1982, 1985a, 1986, 1994; Becker et coll., 1990; Canfield et coll., 1994; USEPA, 1994a; Day et coll., 1995a; Borgman et coll., 2001b, 2004).

1.4 Tolérance et sensibilité relative de *H. azteca* en laboratoire

Un certain nombre de chercheurs ont examiné en laboratoire la tolérance de *H. azteca* à certaines variables du milieu naturel. Les effets de la température sur la tolérance, le comportement et la biologie de la reproduction de ces animaux sont résumés dans de March (1981). *H. azteca* tolère naturellement une plage de températures de 0-33 °C. En règle générale, la production maximale de jeunes s'observe à 26-28 °C, tandis que des températures de 33-37 °C sont *létales*. Entre 0 et 10 °C, on assiste à l'immobilisation complète des animaux; des températures de 10-18 °C retardent la maturation, abaissent le taux de reproduction et donnent de gros adultes; à ≥ 20 °C, on observe l'accélération de la maturation, l'augmentation du taux de reproduction et la production de petits adultes (de March, 1981).

En laboratoire, *H. azteca* se reproduit bien et de façon continue si la *photopériode* est de ≥ 16 h. Si elle est plus courte (≤ 12 h), on observe un stade de repos sur le plan de la reproduction (de March, 1977). Un éclairage fluorescent à spectre étendu, d'une intensité de $\sim 500-1000$ lux, a permis un élevage fructueux de *H. azteca* (Ingersoll et Nelson, 1990; Ankley et coll., 1991; USEPA, 1994a, 2000). Le fait de couvrir les récipients d'élevage d'une feuille d'aluminium n'a pas influé sur la survie, mais cela a ralenti la croissance et arrêté la reproduction (Borgmann et coll., 1989).

H. azteca peut survivre à une longue exposition à de faibles concentrations d'OD. de March (1981) a résumé des études montrant que l'espèce pouvait survivre dans l'eau stagnante et il a cité deux études indépendantes signalant une CL_{50} 48 h à 0,7 mg d'oxygène par litre (O_2/L) pour cette espèce. Nebeker et coll. (1992) ont également constaté que l'animal pouvait survivre à une exposition aiguë ou prolongée à de faibles concentrations d'OD; les CL_{50} 96 h et 30 jours étaient de $<0,3$ mg d' O_2/L . Toutefois, après 30 jours d'exposition à une eau dont la teneur en oxygène était de $\leq 1,2$ mg/L, on a observé le ralentissement de la croissance et une baisse de la reproduction (nombre moyen de jeunes). Nebeker et coll. (1992) n'ont pas examiné les effets d'une concentration plus élevée (mais inférieure aux valeurs de saturation) de l'OD sur la croissance et la reproduction de *H. azteca*.

Il existe peu d'information relative à l'influence du pH sur la survie de *H. azteca*. de March (1979) signale que la survie de l'espèce est optimale à des pH 6-8 et que, à des pH 4-5, la mortalité augmente graduellement. On ne sait pas s'il existe des renseignements sur les effets qu'exerce l'eau douce à des pH différents sur le taux de croissance ou le succès de la reproduction de cet amphipode.

On possède peu de renseignements concluants sur l'influence de la dureté ou de l'alcalinité de l'eau sur le bien-être de *H. azteca*. L'USEPA (1991b) a observé que le succès de la reproduction de l'espèce était souvent médiocre dans une eau reconstituée dont la dureté avait été ajustée à la baisse au moyen de formules classiques (p. ex., dans USEPA, 1985a, 1985b, 1991c). Toutefois, le problème pourrait avoir été attribuable à un déséquilibre chimique des ions en solution plutôt qu'à la dureté même de l'eau; par la suite, une eau reconstituée d'une dureté de 90-100 mg de carbonate de calcium ($CaCO_3$) par litre a donné de meilleurs résultats (mais pas systématiquement), et c'est cette formule qui était recommandée dans la première édition de la présente méthode (USEPA, 1994a). Dans le

cas d'essais et d'élevages plus longs, les résultats ont été tout aussi piètres qu'incohérents (Borgmann, 2002). Depuis, un milieu artificiel normalisé à 5 sels (MAN-5S), mis au point à l'INRE (Borgmann, 1996) a donné des résultats plus universels (Borgmann et Borgmann, 1997; Borgmann, 2002; Ivey et coll., 2004; Borgmann et coll., 2005b, 2010) et est maintenant recommandé dans la présente méthode. L'eau reconstituée employée comme MAN-5S renferme du brome, car on a constaté qu'un ratio déterminé brome-calcium était essentiel à l'utilisation efficace du calcium par *H. azteca*. Elle contient aussi les ions sodium et bicarbonate (HCO_3^-), les ions les plus critiques pour la survie de *H. azteca*, de même que du magnésium et du potassium, qui assurent une croissance et une reproduction optimales des organismes (Borgmann, 1996; v. 2.3.4). Il faut poursuivre les travaux pour déterminer les plages de dureté et d'alcalinité de l'eau qui conviennent à l'élevage de *H. azteca* et aux essais avec cette espèce.

H. azteca s'est révélé euryhalin. En effet, on a réussi à l'élever et/ou à l'utiliser dans des essais employant de l'eau et un sédiment estuariens. Nebeker et Miller (1988) signalent que, à l'issue d'essais avec des organismes acclimatés à l'eau douce, la CL_{50} 10 jours correspondait à des salinités de 19-24 ‰, selon l'âge (jeunes adultes ou adultes à maturité), tandis que la CL_{50} 24 h correspondait à des salinités de 16-19 ‰ (adultes à maturité). Toujours chez des organismes acclimatés à l'eau douce, l'inhibition de la reproduction (qui se mesure par le nombre de descendants) était évidente à des salinités de $\geq 10,4$ ‰ (Nebeker et Miller, 1988). On peut présumer que la tolérance à la salinité serait accrue si on acclimatait les sujets à l'eau estuarienne avant les essais. de March (1981) fait observer que *H. azteca* peut survivre à une salinité atteignant 30 ‰ si elle y est acclimatée graduellement. D'autres études ont montré qu'on peut élever *H. azteca* dans une eau d'une salinité de ≤ 15 ‰ (McGee et coll., 1993; USEPA, 1994a, 2000). Des études plus récentes montrent que les diverses souches de *Hyalella*

ne présentent pas toutes la même tolérance à la salinité. En conséquence, pour les essais à des salinités plus élevées, il faut choisir soigneusement la souche (Borgmann, 2002).

On a examiné l'influence des propriétés physicochimiques naturelles des sédiments sur la performance de *H. azteca* dans des essais toxicologiques sur un sédiment. Ingersoll et Nelson (1990) ont constaté la tolérance extrêmement élevée de l'espèce à la granulométrie des sédiments. Au bout d'une longue exposition à des *sédiments non contaminés* dont la composition granulométrique variait de >90 % de particules de la taille du limon et de l'argile à 100 % de particules de la taille du sable, on n'a observé aucun effet néfaste sur la survie ou la croissance des amphipodes. De même, Ankley et coll. (1994) ont exposé pendant 10 jours *H. azteca* à 50 échantillons d'un sédiment lacustre non contaminé dont la composition variait de 95 % de particules de la taille de l'argile à 100 % de particules de la taille du sable et dont la teneur en carbone organique était de 0,3-8,1 %. Ils n'ont relevé aucune corrélation entre le taux de survie des amphipodes et les caractéristiques du sédiment, notamment la granulométrie, la teneur en carbone organique ou la composition minéralogique, lorsque les amphipodes étaient nourris pendant les essais. Au bout d'essais de survie de 10 jours sur des sédiments préparés en laboratoire ou des sédiments naturels non contaminés, Suedel et Rodgers (1994a) ont établi que *H. azteca* tolérait toutes les compositions granulométriques (0-100 % de particules de la taille du sable, 0-100 % de la taille du limon et 0-60 % de la taille de l'argile) et toutes les teneurs en carbone organique de la plage examinée (0,1-8,0 %). À l'issue d'essais de 48 h sur des sédiments enrichis avec une gamme de concentrations d'alkylbenzènesulfonate, Cano et coll. (1996) ont constaté que l'ajout de mousse de sphaigne au sédiment augmentait la tolérance de *H. azteca* à la concentration létale aiguë du surfactif lorsque la teneur en carbone organique total était de $\geq 1,5$ %.

Diverses études ont permis de comparer la sensibilité de *H. azteca* à celle d'autres espèces dulcicoles souvent utilisées dans les essais toxicologiques sur des sédiments ou des substances chimiques. Les données comparatives montrent que *H. azteca* est une des espèces dulcicoles les plus sensibles (Burton, 1991; USEPA, 1994a, 2000). Des essais de létalité aiguë *dans l'eau seulement*, portant sur un certain nombre d'effluents industriels, montrent que la sensibilité de *H. azteca* est semblable à celle de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Maciorowski, 1975). De même, les résultats d'essais comparatifs de 96 h (*H. azteca*) ou de 48 h (*Ceriodaphnia dubia*), menés dans l'eau seulement avec du chlorure de potassium (KCl), révèlent que la tolérance des deux espèces à la concentration létale aiguë de ce *toxique de référence* était semblable (Smith et coll., 1991b). Dans des essais comparatifs de létalité aiguë dans l'eau de porosité ou un éluat de sédiment, *H. azteca* a été aussi sensible ou légèrement plus sensible que *C. dubia* ou que les larves de tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le ver oligochète *Lumbriculus variegatus* étant l'espèce la moins sensible (Ankley et coll., 1991). Des essais de toxicité chronique menés dans l'eau seulement, où *H. azteca*, *Gammarus fasciatus* (un autre amphipode) ou *Daphnia magna* ont été exposés au cadmium et au pentachlorophénol, ont montré que la sensibilité des deux espèces d'amphipodes était semblable et que chaque espèce était aussi sensible ou plus sensible que *D. magna* (Borgmann et coll., 1989). Dans un essai comparatif de 10 jours dans l'eau seulement et sur un *sédiment enrichi* avec du fluoranthène, *H. azteca* et des larves du chironome dulcicole *C. tentans* se sont révélés deux fois plus sensibles que *D. magna* dans le premier milieu (eau), tandis que *H. azteca* a été aussi sensible ou plus sensible que les deux autres espèces dans le second milieu (sédiment enrichi) (Suedel et coll., 1993a). Dans une étude comparative de la CL₅₀ dans l'eau seulement, avec *H. azteca*, *C. tentans* et *L. variegatus* exposés séparément à 5 métaux et à 5 pesticides individuels, Phipps et coll. (1995) ont constaté

qu'aucune espèce n'était systématiquement plus sensible à tous les *toxiques*, bien que *H. azteca* se soit révélé l'espèce la plus sensible aux 5 métaux. Ils ont aussi comparé les CL₅₀ pour *H. azteca* aux valeurs publiées pour d'autres espèces aquatiques exposées aux mêmes substances chimiques, et ils ont observé que l'amphipode était souvent parmi les espèces les plus sensibles (Phipps et coll., 1995). Kubitz et coll. (1995) ont procédé aux essais comparatifs suivants sur des échantillons d'un sédiment enrichi avec du cuivre ou d'un sédiment prélevé sur le terrain : des essais de 48 h dans l'eau de porosité pour mesurer la survie de *D. magna* ou de *C. dubia*, des essais d'inhibition enzymatique de 1 h avec *D. magna* et des essais de mesure de la survie et de la croissance de *H. azteca* après exposition de 14 jours aux sédiments. Ces essais ont tous montré que le paramètre de croissance (poids sec) de *H. azteca* et le paramètre d'inhibition enzymatique chez *D. magna* étaient plus sensibles que tous les paramètres de survie.

Dans leurs essais comparatifs de 10 jours sur des *sédiments entiers* prélevés sur le terrain, West et coll. (1993) ont constaté que *H. azteca* était plus sensible que *C. tentans* et *L. variegatus*. Comme il est indiqué dans USEPA (1994a, 2000), Kemble et coll. (1994) ont comparé la sensibilité de *H. azteca*, *C. riparius*, *D. magna* et *O. mykiss* à des échantillons d'un sédiment contaminé par des métaux. D'après la longueur des sujets, leur maturation sexuelle et leur taux de survie après 28 jours, *H. azteca* s'est révélé la plus sensible des quatre espèces expérimentales (le paramètre de mesure le plus sensible étant la longueur). Selon une étude distincte portant sur un sédiment contaminé des Grands Lacs, *H. azteca* faisait partie des 24 espèces d'organismes les plus sensibles et les plus discriminants (Burton et Ingersoll, 1994; USEPA, 1994a, 2000). Smith et coll. (1993) ont montré que les larves de *P. promelas* (essai de 7 jours) pourraient être plus sensibles que *H. azteca* à certains sédiments naturels contaminés par des métaux et des non-métaux (sélénium).

Section 2

Organismes expérimentaux

2.1 Espèce et stade

L'amphipode dulcicole *H. azteca* doit être utilisé dans la présente méthode d'essai biologique. Ce crustacé fouisseur est un détritivore épibenthique inféodé aux sédiments d'eau douce. Un taxinomiste qualifié doit confirmer et documenter⁵ l'identité de l'espèce obtenue auprès d'un fournisseur, au moins une fois pour tout envoi par ce fournisseur, d'après les caractéristiques taxinomiques distinctives décrites et illustrées dans les clés taxinomiques et à l'annexe G du présent document, ou d'après l'identification taxinomique fondée sur l'ADN (c.-à-d. le code à barres de l'ADN)⁶. Par la suite, le laboratoire d'essais peut procéder à des confirmations périodiques en comparant un organisme d'un lot donné et un spécimen représentatif de l'espèce dont l'identité a déjà été confirmée par un taxinomiste; il conservera ensuite cet organisme en tant que spécimen (EC, 1999b). Le laboratoire peut aussi soumettre

⁵ Parmi les formes de documentation acceptables, on compte l'attestation par le fournisseur, de même que l'identification des spécimens de laboratoire par un taxinomiste qualifié ou par analyse moléculaire (code à barres de l'ADN).

⁶ Les clés taxinomiques normalisées montrent que, au Canada, tous les *Hyalella* devraient être des *H. azteca* (Borgmann, 2002). Toutefois, des preuves plus récentes tirées d'analyses moléculaires portent à croire que *H. azteca* compte de nombreuses espèces (Witt et Hebert, 2000), même si, d'un point de vue morphologique, ces espèces seraient pratiquement identiques. Comme mesure provisoire, la taxinomie de *Hyalella* doit être confirmée au microscope jusqu'à l'espèce *H. azteca*. On peut aussi, à l'aide de techniques moléculaires, procéder à une confirmation jusqu'à une espèce de *Hyalella* dont on sait qu'elle est présente en Amérique du Nord et qu'elle est étroitement apparentée à *H. azteca*, à l'exclusion d'autres *Hyalella* sp. déjà bien décrites (p. ex., on ne doit pas utiliser *H. montezuma*, un organisme filtreur qui se nourrit de plancton). Les conseils d'ordre taxinomique seront mis à jour à mesure que les éléments de preuve tirés des analyses moléculaires s'accumuleront.

des échantillons d'organismes expérimentaux au codage à barres de l'ADN.

Il faut utiliser pour les essais des *H. azteca* juvéniles âgés de 2-9 jours. Aux fins d'une plus grande normalisation des mesures et d'une moins grande variation du poids sec final, l'âge des organismes expérimentaux ne doit pas s'écarter de ≥ 3 jours; cependant, un écart encore moins grand (p. ex., ≤ 2 jours) est vivement recommandé (v. 2.3.10)⁷.

2.2 Origine et acclimatation

Tous les amphipodes utilisés dans un essai doivent être issus de la même population. Les géniteurs dont on a besoin pour établir les élevages (v. 2.3) peuvent provenir de laboratoires gouvernementaux ou privés qui élèvent *H. azteca* en vue d'essais toxicologiques sur des sédiments. Ils peuvent également provenir d'un fournisseur commercial de matériel biologique⁸. On peut se procurer des géniteurs auprès des fournisseurs canadiens suivants :

⁷ Dans USEPA (2000), il est recommandé de commencer avec des juvéniles dont l'écart d'âge ou de taille est faible (écart de 1-2 jours) afin de réduire la variation possible de la croissance à la fin de l'essai. Dans ISO (2011), l'écart exigé est de ≤ 2 jours.

⁸ Des chercheurs pourraient s'inquiéter des effets d'une endogamie excessive dans les élevages de laboratoire ou souhaiter utiliser les descendants d'organismes d'une niche particulière. C'est pourquoi on peut établir des élevages à partir de populations sauvages. Dans ce cas, il faudrait confirmer la taxinomie des sujets, élever ceux-ci pendant plusieurs générations et évaluer leur sensibilité à un ou des toxiques de référence avant d'en utiliser les descendants dans des essais toxicologiques. On devrait éviter de se procurer des populations sauvages en vue des essais, à moins d'avoir démontré qu'elles peuvent se croiser avec des populations existantes de laboratoire (USEPA, 1994a, 2000).

Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Centre des sciences de l'environnement
de l'Atlantique
Environnement Canada
C.P. 23005
Moncton (NB) E1A 6S8

Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
Centre des sciences environnementales
du Pacifique
Environnement Canada
2645, route Dollarton
North Vancouver (BC) V7H 1V2

Pour obtenir des adresses de fournisseurs des États-Unis, prière de consulter USEPA (2000; tableau 10.1).

L'eau dans laquelle les géniteurs sont expédiés au laboratoire *devrait* être de même origine que l'eau d'élevage. Elle devrait être bien oxygénée (teneur en OD de 90-100 % de la valeur de saturation) avant l'expédition et il *faudrait* fournir aux animaux un substrat convenable (v. 2.3). On devrait isoler les récipients de transport afin de réduire au minimum les variations de température au cours du transport. Le temps de transport des organismes vivants devrait être le plus court possible (c.-à-d. <24 h). Il faudrait éviter le surpeuplement afin de réduire le stress au minimum et de prévenir l'insuffisance d'oxygène pendant le transport.

À l'arrivée des sujets au laboratoire, on peut, le temps d'ajuster la température, les conserver dans l'eau dans laquelle ils ont été transportés, ou les transférer dans une eau d'élevage bien oxygénée, réglée à la température de l'eau du récipient d'expédition. On recommande d'exposer graduellement les organismes à l'eau d'élevage si la qualité de celle-ci (p. ex., dureté, pH, *conductivité*) diffère grandement de celle à laquelle ils étaient acclimatés. On trouvera en 4.1 des conseils sur l'acclimatation à l'eau d'essai des amphipodes provenant d'une source externe.

On devrait ajuster graduellement l'eau à la température exigée pour l'élevage (23 °C; v. 2.3), sans dépasser 2 °C par jour (USEPA, 1994a, 2000). Durant l'*acclimatation*, on devrait aérer modérément l'eau servant au maintien des géniteurs. Pendant cette période intermédiaire d'acclimatation des géniteurs aux conditions de laboratoire, les autres paramètres *devraient* être le plus semblables possible à ceux appliqués au maintien des élevages (v. 2.3).

Il est vivement recommandé d'utiliser des organismes expérimentaux élevés à l'interne (v. 2.3). Cependant, les organismes peuvent provenir d'une source externe au besoin (amphipodes juvéniles âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours), à la condition que les procédures que recommande Environnement Canada pour se les procurer en vue d'essais toxicologiques sublétaux (EC, 1999b) soient observées. Il faut se conformer en particulier aux conditions et modes opératoires décrits dans EC (1999b) et dans les paragraphes qui suivent, de même qu'aux exigences applicables aux élevages en laboratoire décrits ici. Si les amphipodes venaient d'une source externe, chaque envoi ou groupe d'amphipodes représenterait un *lot* distinct d'organismes expérimentaux.

S'il faut se procurer des organismes expérimentaux d'une source externe, ceux-ci devraient être le plus jeunes possible au moment de leur envoi par le fournisseur afin qu'on dispose de suffisamment de temps pour acclimater les juvéniles à l'eau d'essai du laboratoire et à la température (23 ± 1 °C; v. section 4) à laquelle l'essai se déroulera. Chaque envoi d'organismes expérimentaux venant d'une source externe doit inclure une déclaration écrite quant au nombre, à la provenance et à l'âge des juvéniles; la date et l'heure de l'envoi doivent aussi être précisées. Les organismes doivent provenir d'élevages spécialisés (c.-à-d. d'un fournisseur maintenant des élevages en permanence) conformes aux critères de santé et aux exigences en matière d'assurance de la qualité décrits dans la présente

méthode. Ils doivent être en bonne santé et le taux de mortalité des juvéniles doit être de ≤ 20 % dans les 24 h précédant immédiatement l'essai (EC, 1999b). Pour confirmer que ce taux de mortalité n'est pas dépassé, il faut compter le nombre total d'amphipodes (vivants et morts) reçus du fournisseur, de même que le nombre de survivants dans les 24 h précédant immédiatement le transfert dans les récipients d'essai. Le fournisseur doit se conformer aux exigences précisées ici quant à la *surveillance* des caractéristiques de la qualité de l'eau et à d'autres conditions d'élevage (p. ex., la température). Le laboratoire d'essais doit établir un système interne d'évaluation de la santé des organismes inclus dans chaque envoi.

Dans tous les cas où des organismes juvéniles sont expédiés à un laboratoire d'essais, la température et la teneur en OD de l'eau du ou des récipients d'expédition doivent être mesurées et consignées au moment du départ des installations du fournisseur, de même qu'à l'arrivée au laboratoire (EC, 1999b). Pendant toute la durée du transport, la température de l'eau doit être la même que celle de l'eau d'essai ou s'en approcher le plus possible, et elle ne doit pas varier de >3 °C par période de 24 h. En outre, la teneur en OD doit correspondre à ≥ 80 % de la valeur de saturation (EC, 1999b). L'eau dans laquelle seront transportés les organismes expérimentaux doit être bien oxygénée (p. ex., 90-100 % de la valeur de saturation) au préalable. Une fiche de la température et de l'OD de cette eau devrait accompagner chaque envoi.

Dès l'arrivée des organismes au laboratoire, il faut les acclimater le plus graduellement possible aux conditions dans lesquelles ils seront maintenus et/ou mis à l'essai, et ce, afin de leur éviter tout stress. Les conditions de maintien et d'essai doivent être les mêmes en ce qui a trait à des facteurs critiques comme la température, l'éclairage et la *photopériode*. Dans le cas des organismes expérimentaux qui seront utilisés dans les 24-48 h après leur arrivée au laboratoire d'essais, le fournisseur devrait les

élever dans une eau dont les qualités (p. ex., température, pH, alcalinité, dureté) sont semblables à celles de l'eau du laboratoire (c.-à-d. celle qui servira d'*eau sus-jacente*). Il est recommandé d'exposer graduellement les organismes à l'eau d'essai du laboratoire dans tous les cas, mais plus particulièrement lorsqu'il y a un écart marqué dans la qualité de l'eau à laquelle ils étaient acclimatés auparavant. On devrait se conformer aux indications fournies plus haut et à celles apparaissant en 4.1 au moment du transfert des amphipodes d'une source d'eau à une autre. L'acclimatation devrait commencer dès l'arrivée des organismes au laboratoire d'essais et prendre fin 2 jours avant la mise en route de l'essai (EC, 1999b).

2.3 Élevage

2.3.1 Généralités

La présente sous-section renferme des conseils et des recommandations pour l'élevage de *H. azteca* en vue d'essais toxicologiques sur un sédiment et *dans l'eau seulement*. Étant donné que « ce qui fonctionne bien dans un laboratoire risque de ne pas fonctionner dans un autre » (USEPA, 1994a, 2000), de nombreux aspects des conditions d'élevage, notamment le type de renouvellement de l'eau, le substrat, les aliments et les rations, sont laissés à la discrétion et à l'expertise du personnel de laboratoire. Pour déterminer si les organismes d'élevage conviennent aux essais et si les résultats des essais sont acceptables, on se sert de critères de performance⁹. Ainsi, pour convenir aux essais, les élevages doivent afficher un faible taux de mortalité, et les organismes doivent sembler en bonne santé, présenter un comportement normal dans leurs activités trophiques et autres, être âgés de 2-9 jours et présenter un écart d'âge de ≤ 3 jours (écart recommandé : ≤ 2 jours) au début

⁹ Les critères de performance comprennent ceux en lien avec la survie et l'état des organismes d'élevage destinés aux essais (v. 2.3.11), ceux établis quant à la validité de l'essai avec des organismes témoins (v. 4.2) et ceux ayant trait aux groupes d'organismes soumis à des essais toxicologiques de référence (v. 4.8).

de l'essai. Il faudrait également démontrer l'acceptabilité de l'élevage par des essais parallèles ou courants faisant appel à au moins un *toxique de référence* (v. 4.8). On devrait écarter tout *lot* d'organismes qui ne satisfait pas à ces critères.

Il revient au laboratoire de démontrer sa capacité d'obtenir des résultats cohérents et précis avec au moins un toxique de référence lorsqu'il se prépare à exécuter des essais toxicologiques sur un sédiment ou dans l'eau seulement avec *H. azteca*. À cette fin, il devrait déterminer la *précision* de ses essais intralaboratoires d'après le *coefficient de variation* (CV) des CL₅₀ respectives de ≥ 5 essais effectués avec différents lots d'organismes d'une même origine et avec le même toxique de référence, selon des modes opératoires et dans des conditions identiques (v. 4.8) (USEPA, 1994a, 2000). Le laboratoire devrait aussi confirmer la précision de tels essais en procédant à ≥ 5 essais de 14 jours pour mesurer *la survie et la croissance* de différents lots d'organismes dans un *sédiment témoin* (pour les essais sur un sédiment) et dans l'*eau témoin/de dilution* (pour les essais dans l'eau seulement) (USEPA, 1994a, 2000)¹⁰. Les

¹⁰ La surveillance continue des taux de survie et de croissance des amphipodes dans un sédiment témoin ou dans l'eau témoin/de dilution peut fournir des renseignements précieux sur la performance des organismes, la qualité du sédiment témoin et l'acceptabilité des conditions d'essai au fil du temps. Les données (sur la survie et la croissance) tirées des *traitements* témoins utilisés dans les essais définitifs, en plus de servir au calcul des résultats des essais (v. 4.7, 5.6, 6.5 et 7.7) et à la confirmation de la validité de l'essai (v. 4.2), peuvent être portées sur un graphique chronologique (c.-à-d. une carte de la performance des organismes témoins) afin d'évaluer l'acceptabilité continue du système d'essai et de détecter toute tendance susceptible de dénoter un biais dans ce système. Un tel diagramme est préparé de la même façon qu'une carte de contrôle relative aux toxiques de référence (v. 4.8), et on utilise les valeurs moyennes du taux de survie et de croissance plutôt que les CL₅₀ ou les CI₅₀. Comme il est indiqué en 4.8, chaque nouvelle valeur moyenne devrait être comparée aux valeurs limites du diagramme de performance des organismes témoins, et toute tendance observée dans les données devrait être évaluée. L'USEPA a proposé que les laboratoires puissent démontrer qu'ils

conditions et modes opératoires de cette deuxième série d'essais initiaux devraient être identiques et conformes aux exigences de la section 4 (essai sur un sédiment témoin) et/ou de la section 7 (essai dans l'eau seulement).

Tout programme courant d'essais toxicologiques avec *H. azteca* devrait comporter l'exécution mensuelle d'*essais avec un toxique de référence* (c.-à-d. dans les 14 jours précédant ou suivant la date de début de chaque essai) avec des organismes élevés dans le laboratoire, conformément aux conditions et modes opératoires énoncés en 4.8. À défaut d'un tel programme, on devrait évaluer, au moyen d'un essai avec un toxique de référence exécuté parallèlement à l'essai toxicologique, la performance de sujets provenant de l'élevage utilisé pour l'essai. On doit se conformer à cette dernière exigence lorsque les organismes expérimentaux proviennent d'une source externe et qu'ils sont destinés à une utilisation immédiate dans un essai sur un sédiment ou dans l'eau seulement (v. 4.8). En outre, on devrait vérifier à l'aide d'un essai avec un toxique de référence la performance de tout élevage venant d'être établi à partir de nouveaux géniteurs (v. 2.2), et les résultats devraient se révéler acceptables (v. 2.3.11 et 4.8) avant d'utiliser les sujets de cet élevage.

On devrait observer les élevages fréquemment et régulièrement (p. ex., tous les jours ou ≥ 3 fois par semaine en des journées non consécutives) et consigner le nombre estimatif d'adultes survivants, la production de jeunes dans chaque enceinte, les dates du renouvellement des élevages, le nombre et la classe d'âge des sujets transférés, les rations quotidiennes, les mesures de la qualité de l'eau, etc. (v. section 8).

maîtrisent bien les essais de 10 jours sur un sédiment s'ils obtiennent, dans ≤ 15 % des cas, des résultats inférieurs aux critères de validité des essais mesurant la survie et la croissance des organismes dans un sédiment témoin (USEPA, 2011).

L'annexe D résume les conditions et modes opératoires que les laboratoires gouvernementaux ont déjà appliqués dans l'élevage de *H. azteca*. On présume que les procédures détaillées qui y sont indiquées ont donné de bons résultats. À moins d'indication contraire, elles fournissent des conseils utiles sur l'application de la présente méthode. Le tableau 1 renferme une liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage de géniteurs de *H. azteca* dont les descendants serviront aux essais toxicologiques sur un sédiment.

2.3.2 Installations et appareillage

On doit élever *H. azteca* dans une installation à température contrôlée. L'équipement de régulation de la température (incubateur, bain d'eau à recirculation ou enceinte à température constante) doit maintenir celle-ci dans les plages exigées (v. 2.3.5). On doit isoler la zone d'élevage des locaux servant aux essais ou encore à la préparation ou à l'entreposage des échantillons, afin d'éviter la contamination provenant de ces locaux. La conception et l'aménagement de la zone d'élevage doivent permettre de prévenir la contamination des élevages (p. ex., absence de conduites ou de garnitures en cuivre ou en métal galvanisé d'où pourraient dégoutter des condensats contaminés par ces métaux). On devrait concevoir l'aération pour empêcher l'entrée ou la reprise d'air provenant du local servant aux essais ou de toute autre partie du laboratoire où des contaminants sont présents.

Tout l'équipement, tous les récipients et tous les accessoires risquant d'entrer en contact avec les organismes ou l'eau de la zone d'élevage doivent être propres, convenablement rincés et constitués de matériaux non toxiques (p. ex., verre, Téflon^{MC}, acier inoxydable 316, nylon, Nalgene^{MC}, porcelaine, polyéthylène, polypropylène, fibre de verre). Les matériaux toxiques (cuivre, zinc, laiton, métal galvanisé, plomb et caoutchouc naturel, notamment) ne doivent pas entrer en contact avec l'appareillage et l'équipement ni avec l'eau d'élevage. On devrait filtrer au besoin l'air comprimé alimentant directement l'installation d'élevage

pour s'assurer qu'il est exempt d'huile et d'émanations.

2.3.3 Éclairage

L'éclairage (fluorescent ou l'équivalent) devrait être vertical (par le haut), en spectre continu. La *photopériode* devrait être fixée à 16 h. L'intensité lumineuse à proximité de la surface de l'eau des enceintes d'élevage devrait être de 2000-2500 lux (MESI, 2010)¹¹.

2.3.4 Eau d'élevage

On peut utiliser pour l'élevage de *H. azteca* une eau souterraine, de surface ou reconstituée, mais elle ne doit pas être contaminée. On peut également la préparer par dilution d'eau naturelle avec une *eau distillée* ou *désionisée* très pure, jusqu'à ce qu'on obtienne le degré de dureté recherché. Pour être acceptable, l'eau d'élevage doit permettre d'atteindre des taux de survie, de croissance et de reproduction satisfaisants. Le plan d'expérience de certaines études propres à un *site* pourrait exiger que l'eau soit prélevée au même endroit que le sédiment. Si on utilise cette eau ou une autre eau de surface, on devrait la passer au tamis fin (p. ex., mailles de 30 µm) pour en éliminer les prédateurs ou les compétiteurs potentiels. On peut stériliser au moyen d'un stérilisateur aux ultraviolets l'eau qui pourrait être infectée par des pathogènes.

Il n'est pas recommandé d'employer de l'*eau déchlorée* pour l'élevage ou les essais, car sa qualité est souvent variable, et les concentrations de chlore, de chloramines, de fluorures, de cuivre, de plomb, de zinc ou d'autres contaminants pourraient y être inacceptables. Malgré cela, des laboratoires utilisent couramment et sans problème apparent

¹¹ Dans une étude récente multilaboratoire portant sur la mise au point d'une méthode, il a été établi que les laboratoires faisant appel à des intensités lumineuses plus élevées pour les élevages (soit 2000-2500 lux plutôt que la plage de 500-1000 lux recommandée dans la première édition de la présente méthode) avaient obtenu de meilleurs taux de reproduction (MESI, 2010).

Tableau 1. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour l'élevage des *H. azteca* destinés aux essais toxicologiques sur un sédiment¹²

Origine des amphipodes	– élevages commerciaux, laboratoires gouvernementaux ou privés; tous les sujets utilisés dans un essai ont la même origine; confirmation de l'identité de l'espèce
Acclimatation	– graduelle (≤ 2 °C par jour) par rapport à la température à l'arrivée
Origine de l'eau	– eau souterraine, de surface, reconstituée (non contaminée dans les trois cas) ou, au besoin, eau du robinet déchlorée; eau de mer reconstituée ou naturelle d'une salinité ≤ 15 ‰ pour essais spéciaux
Qualité de l'eau	– surveillance quotidienne de la température; surveillance au moins hebdomadaire de l'OD; mesure du pH, de la dureté, de l'alcalinité et de la teneur en ammoniac dans les 24 h précédant le début de l'essai
Renouvellement de l'eau	– intermittent ou continu; il est recommandé d'ajouter ≥ 1 volume par jour (minimum : 25-30 % par semaine), sauf si l'eau est recyclée par un système de filtration
Température	– moyenne quotidienne : 23 ± 1 °C; mesure instantanée : 23 ± 3 °C
Aération/oxygénation	– aération modérée; OD maintenu à ≥ 80 % de la valeur de saturation
Éclairage	– 2000-2500 lux au-dessus de la surface de l'eau; tubes (fluorescents ou l'équivalent, à large spectre de longueur d'onde) donnant un éclairage en spectre continu à la verticale; photopériode de 16 h
Substrat	– gaze hydrophile; autres choix autorisés (p. ex., v. tableau D-5 de l'annexe D)
Alimentation	– divers types d'aliments, en quantités et à des fréquences variables
Âge requis pour l'essai	– 2-9 jours au début de l'essai; écart d'âge de ≤ 2 jours (obligatoirement ≤ 3 jours)
Critères de santé	– élevages à l'interne : écarter le lot d'organismes destinés à l'essai si > 20 % des jeunes amphipodes meurent ou semblent stressés au cours des 48 h précédant l'essai élevages provenant d'une source externe : écarter le lot d'organismes destinés à l'essai si > 20 % des sujets meurent ou semblent stressés au cours des 24 h précédant l'essai

¹² Les conditions et modes opératoires listés s'appliquent principalement aux élevages d'âge connu (v. 2.3.10), ordinairement conservés dans des béciers ou des bocaux de 1-2 L; ils ne conviennent pas nécessairement aux gros élevages ou aux élevages de sujets d'âges mélangés.

l'eau du robinet déchlorée. Si on utilise de l'eau potable du réseau municipal, la déchloration¹³ doit la débarrasser de toute concentration nocive de chlore ou de chloramines¹⁴ résiduels.

Si on utilise de l'eau douce reconstituée, il est recommandé d'employer un MAN-5S (v. 1.4). La formule ci-dessous, qui donne une eau d'une dureté de 120-140 mg de CaCO₃ par litre, est tirée de Borgmann (1996), et la teneur en bromure¹⁵ y est plus élevée que dans d'autres formules couramment utilisées (p. ex., USEPA, 1985a, 1985b, 1991c, 1993, 1994a, 2000; EC, 1992b). De nombreux laboratoires ont

¹³ On peut procéder à une aération vigoureuse de l'eau pour éliminer une partie du chlore gazeux résiduel, puis à une filtration sur charbon actif (charbon d'os), suivie éventuellement d'une exposition aux rayons ultraviolets (Armstrong et Scott, 1974) pour supprimer la plus grande partie des chloramines et d'autres organochlorés résiduels. Le vieillissement de l'eau dans un bassin de garde aéré pendant 1-2 jours pourrait également être utile.

¹⁴ La teneur cible en chlore résiduel, recommandée pour la protection des organismes dulcicoles, est de $\leq 0,002$ mg/L (CCMRE, 1987). Des teneurs supérieures à cette valeur pourraient se traduire par une interaction entre la toxicité du chlore ou des chloramines et celle du ou des contaminants qui font l'objet de l'essai. La limite de détection de la technique d'analyse utilisée pour mesurer la teneur en chlore ou en chloramines résiduels dans l'eau déchlorée d'alimentation doit être suffisamment basse pour qu'on soit assuré d'obtenir une teneur en chlore résiduel de $\leq 0,002$ mg/L.

¹⁵ Les essais toxicologiques sur un milieu artificiel avec *H. azteca* n'ont pas toujours donné des résultats cohérents (USEPA, 1994a, 2000; Borgmann, 1996). Toutefois, Borgmann a signalé en 1996 avoir obtenu des résultats fructueux en ajoutant du bromure de sodium dans de l'eau reconstituée. Depuis, plusieurs études ont confirmé que le bromure peut être employé dans un milieu artificiel pour obtenir des taux plus cohérents et plus acceptables de survie, de croissance et de reproduction de *H. azteca* dans les essais toxicologiques (Borgmann, 1996, 2002; Ivey et coll., 2004). Dans une étude récente, Ivey et coll. (2011) ont aussi confirmé une amélioration du taux de survie, de la biomasse et du taux de reproduction de *H. azteca* dans divers types d'eau reconstituée avec l'ajout de $\geq 0,02$ mg/L de bromure, soit une teneur observée dans des eaux naturelles. En conséquence, une eau reconstituée d'une teneur en bromure aussi basse que 20 µg/L pourrait s'avérer adéquate pour la croissance et la reproduction des amphipodes.

constaté que cette formule convenait à l'élevage de *H. azteca*¹⁶. Pour préparer 40 L d'eau douce reconstituée employée comme MAN-5S, on utilise des substances chimiques de qualité réactif (sels anhydres) dans les proportions indiquées ci-dessous et on procède comme suit (Borgmann, 1996) :

- 1) Dans un bécher en verre contenant 100 mL d'eau distillée ou désionisée d'une grande pureté, ajouter les sels suivants :
 - chlorure de calcium (CaCl₂) – 4,44 g¹⁷
 - bicarbonate de sodium (NaHCO₃) – 3,36 g
 - sulfate de magnésium (MgSO₄) – 1,20 g
 - chlorure de potassium (KCl) – 149 mg
 - bromure de sodium (NaBr) – 41,2 mg
- 2) Remuer le contenu du bécher jusqu'à dissolution de tous les sels.
- 3) Verser ~20 L d'eau désionisée ou distillée d'une grande pureté dans un récipient ou une tourie propre (v. 3.1).
- 4) Vider le bécher (soit 100 mL d'eau renfermant les sels dissous) dans la tourie — s'assurer de vider le bécher entièrement (à cette fin, le rincer avec un peu d'eau distillée ou désionisée et verser celle-ci dans la tourie) —, puis remplir la tourie jusqu'à 40 L avec de l'eau désionisée ou distillée.
- 5) Aérer le mélange pendant ≥ 24 h à la température ambiante.
- 6) La qualité de l'eau reconstituée devrait présenter approximativement les caractéristiques suivantes : dureté de 120-140 mg/L exprimée en CaCO₃; alcalinité de 60-80 mg/L exprimée en CaCO₃; conductivité de 300-500 µS/cm; pH 6,5-8,5.

¹⁶ N'ayant obtenu que peu de succès dans l'élevage de *H. azteca* dans une eau reconstituée, des laboratoires préfèrent l'eau naturelle de puits ou de surface [G.A. Burton, Jr., Université d'État Wright, Dayton (OH), comm. pers., 1994].

¹⁷ Dans le cas de CaCl₂ · 2H₂O, la quantité est de 5,83 g.

On devrait aérer l'eau reconstituée pendant ≥ 24 h avant de l'utiliser afin que sa teneur en OD se situe dans une plage acceptable (v. 2.3.6) et que le pH se stabilise. On devrait mesurer la conductivité, le pH, la dureté, la teneur en OD et l'alcalinité de chaque lot d'eau reconstituée (USEPA, 1994a, 2000). L'eau reconstituée peut être entreposée pendant ≤ 1 mois à la température ambiante (20 ± 3 °C) si elle est conservée dans une tourie propre munie d'un bouchon pour prévenir la contamination (P. Jackman, LEEA, comm. pers., 2012). On peut ajuster la teneur en sels de cette eau en fonction de celle de l'eau réceptrice d'intérêt, mais le ratio Ca-Br doit être maintenu constant du fait que ces éléments sont essentiels pour *H. azteca* et qu'ils doivent être présents simultanément.

L'eau de mer naturelle ou reconstituée d'une salinité de ≤ 15 ‰ peut être employée comme eau d'élevage de *H. azteca* (USEPA, 1994a, 2000). On reconstitue l'eau de mer par ajout d'une saumure hypersaline, d'une préparation acceptable de sels de qualité réactif ou de sel de mer sec du commerce (p. ex., Instant Ocean^{MC}) à de l'eau désionisée ou distillée ou à une eau douce convenable, non contaminée, en quantité suffisante pour obtenir la salinité souhaitée (EC, 1992a, 1997c; USEPA, 1994b).

Les caractéristiques de l'eau d'élevage de *H. azteca* devraient être relativement uniformes afin d'augmenter les chances de réussite des élevages et de réduire au minimum les variations de l'état et du développement des organismes. Selon l'USEPA (1994a, 2000), la qualité de l'eau naturelle est considérée comme uniforme si, en un mois, la dureté, l'alcalinité et la conductivité spécifique s'écartent de < 10 % de leur moyenne respective et si le pH varie de $< 0,4$.

On devrait surveiller et consigner régulièrement la qualité de l'eau dans les enceintes d'élevage. On devrait aussi mesurer la température de l'eau quotidiennement et sa teneur en OD au moins

une fois par semaine. Il faudrait mesurer aussi souvent que nécessaire la dureté, l'alcalinité, le pH et la teneur en ammoniac de l'eau afin de documenter sa qualité. Il est recommandé de mesurer ces variables au moins tous les 3 mois de même que la veille d'un essai (USEPA, 1994a, 2000).

Afin de documenter la qualité de l'eau d'élevage de *H. azteca*, on devrait mesurer aussi souvent que nécessaire (p. ex., tous les 3 mois) les teneurs en nitrites, en solides en suspension, en gaz totaux dissous, en métaux, en pesticides et en tout autre contaminant préoccupant. La limite de détection de chaque méthode d'analyse devrait être largement inférieure (p. ex., 3-10 fois) à la concentration dans l'eau ou à la plus faible concentration qui s'est révélée nocive pour la survie, la croissance ou la reproduction de *H. azteca* ou de tout autre animal dulcicole sensible (EC, 1992b).

On devrait renouveler régulièrement l'eau des enceintes d'élevage¹⁸, soit manuellement, soit automatiquement à l'aide d'appareils et de techniques permettant un renouvellement continu ou *intermittent*. L'USEPA (1994a, 2000) recommande un taux de renouvellement équivalant à l'ajout de ≥ 1 volume d'eau par jour, mais une telle fréquence est sans doute inutile. Le renouvellement minimal admissible est de 25-30 % du volume par semaine (INRE, 1992), sauf si l'eau est recyclée à travers des filtres du commerce (fournitures pour aquariums).

2.3.5 Température

La température moyenne quotidienne de l'eau dans les enceintes d'élevage de *H. azteca* devrait être de 23 ± 1 °C (tableau 1) et la température instantanée, de 23 ± 3 °C.

¹⁸ Les filtres d'aquarium du commerce peuvent assurer en continu une bonne qualité de l'eau (G.A. Burton, Jr., comm. pers., 1994). Ils peuvent remplacer le système de renouvellement de l'eau ou servir comme appoint.

2.3.6 *Oxygène dissous*

On devrait aérer vigoureusement l'eau d'élevage immédiatement avant de l'employer à cette fin, et ce, pour s'assurer que la teneur en oxygène convient et empêcher la sursaturation des gaz. On devrait mesurer la teneur en OD au même moment afin de confirmer qu'elle est satisfaisante (p. ex., 90-100 % de la valeur de saturation).

On devrait aérer modérément les enceintes d'élevage (p. ex., 1 bulle par seconde et par litre d'eau; Brooke et coll., 1993) à l'air comprimé exempt d'huile et filtré. L'air devrait être distribué par des conduites jetables et des pipettes en verre ou en plastique à usage unique; dans les grosses enceintes, on utilisera plutôt des pierres poreuses pour aquarium. Pour s'assurer que la teneur en OD est propice à la survie et à la croissance optimales des amphipodes, il est recommandé de la maintenir à 80-100 % de la valeur de saturation.

2.3.7 *Substrat d'élevage*

Différents substrats d'élevage ont donné de bons résultats avec *H. azteca* (v. tableau D-5 de l'annexe D); le choix du substrat est laissé à la discrétion et à l'expertise du personnel de laboratoire. On utilise souvent de la gaze hydrophile (p. ex., de 5 cm × 10 cm ou de 3 cm², selon la taille de l'enceinte) préalablement mise à tremper, et c'est ce substrat qui est recommandé (Borgmann et coll., 1989; MPO, 1992). L'USEPA (1994a, 2000) recommande un trempage préalable dans l'eau pendant 24 h et le remplacement de la gaze hydrophile chaque semaine. Parmi les autres substrats, on compte le tulle de nylon Nitex^{MC}, les mailles en plastique et les essuie-tout déchiquetés.

2.3.8 *Alimentation*

Dans l'élevage de *H. azteca*, on a utilisé divers aliments et régimes d'alimentation (v. tableau D-6 de l'annexe D). Un régime mono-alimentaire constitué, par exemple, de

flocons d'aliments pour poissons (du commerce) (p. ex., Nutrafin®, Tetrafin®, TetraMin® ou Zeigler® Aquatox Feed) ou de nourriture pour lapin (Ingersoll et Nelson, 1990; INRE, 1992; MPO, 1992; Milani et coll., 1996), a donné de bons résultats, de même qu'un régime mixte à base d'algues filamenteuses et de LCT (USEPA, 1991b; Brooke et coll., 1993). Dans USEPA (1994a), il était recommandé d'employer un mélange de LCT en combinaison avec l'algue verte *Selenastrum capricornutum* et la diatomée *Navicula* sp., 3 fois par semaine. Toutefois, on trouve dans USEPA (2000) diverses options, dont un mélange de LCT et d'algues vertes, ou encore des flocons d'aliments pour poissons (du commerce). Le choix de l'aliment et du régime est laissé à la discrétion et à l'expertise du personnel de laboratoire. On trouvera en 4.4 (et à l'annexe H) des indications sur la préparation et l'entreposage du mélange de LCT; cette même section (et la note de bas de page n° 43 qui y est associée) renferme des conseils sur la préparation des flocons d'aliments pour poissons (du commerce).

2.3.9 *Manipulation des organismes*

Il faudrait éviter de manipuler les amphipodes. Si une manipulation est inévitable, on devrait procéder délicatement, soigneusement et rapidement afin de stresser les organismes le moins possible. On peut transférer les adultes ou les jeunes d'un récipient à un autre à l'aide d'une pipette en verre ou en plastique transparent à extrémité polie et à ouverture de 5-6 mm de diamètre. Les organismes devraient être relâchés sous la surface de l'eau. On ne doit pas utiliser pour les essais les sujets qui ont été échappés ou blessés, qui sont entrés en contact avec des surfaces sèches ou qui semblent stressés.

2.3.10 *Élevages d'âges mélangés et d'âge connu*

Divers choix sont possibles concernant le type, la taille et la densité de peuplement des enceintes d'élevage (tableau D-2 de

l'annexe D), l'eau d'élevage et sa méthode de renouvellement (tableau D-3), le substrat (tableau D-5), les types d'aliments et la fréquence des repas (tableau D-6), les techniques de prélèvement des jeunes destinés aux essais (tableau D-7). Dans la présente méthode, les choix relativement à ce qui précède sont laissés à la discrétion et à l'expertise du personnel de laboratoire. Cependant, les méthodes d'élevage doivent produire suffisamment d'amphipodes âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours (écart recommandé : ≤ 2 jours) pour les essais toxicologiques sur un sédiment et/ou avec un ou des toxiques de référence. En outre, les organismes d'élevage doivent satisfaire à des critères précis de performance (v. 2.3.11, 4.7 et 4.8).

Les laboratoires qui élèvent des *H. azteca* maintiennent souvent des élevages d'âges mélangés et d'âge connu. Nous recommandons cette pratique. Les élevages d'âges mélangés pourraient représenter un élevage massif d'amphipodes de divers âges qu'on maintient dans un ou des aquariums (tableau D-2)¹⁹. Les élevages d'âge connu renferment des sujets d'une classe d'âge donnée (p. ex., <1-7 jours ou 7-14 jours), qui ont été triés et qui sont maintenus dans des aquariums, des bocaux et d'autres enceintes d'élevage (tableau D-2 de l'annexe D) jusqu'à leur utilisation dans les essais toxicologiques. Diverses méthodes permettent l'élevage de sujets d'âge connu (USEPA, 1994a, 2000). Aux fins de la présente méthode, on peut utiliser celles que le personnel de laboratoire a appliquées avec succès pour obtenir des organismes expérimentaux. Dans chaque cas, on renouvelle régulièrement l'eau des enceintes.

La méthode décrite ci-dessous (Hamr et coll., 1994; Milani et coll., 1996) permet d'obtenir des *H. azteca* âgés de <1-7 jours et de les garder encore 2 jours (c.-à-d. jusqu'à ce qu'ils soient âgés de 2-9 jours) avant de les employer dans un essai toxicologique de 14 jours sur un sédiment. Hamr et coll. (1994) ont publié les motifs ainsi que les données expérimentales à l'appui du choix de cet intervalle d'âges et de cette durée d'essai. La méthode permettant d'obtenir cette classe d'âge a été adaptée de Borgmann et coll. (1989) et c'est celle qui est recommandée parmi les diverses façons d'obtenir un nombre adéquat d'organismes âgés de 2-9 jours (au moment où on les utilise pour les essais toxicologiques sur un sédiment).

Quelque 150 amphipodes adultes âgés de ≥ 30 jours, idéalement en amplexus, sont placés dans des enceintes de 20 L renfermant chacune ~ 15 L d'eau d'élevage et des bandes de gaze de coton qu'on aura fait tremper 24 h dans l'eau. On peut utiliser les bandes pendant ≤ 3 semaines avant de les remplacer. Chaque jour, on distribue dans chaque enceinte un mélange de LCT (v. annexe H). Une fois par semaine, on sépare les amphipodes de la bande de gaze et de l'eau en passant le contenu des enceintes au tamis à mailles de 500 μm , puis de 250 μm . Les amphipodes retenus par le premier tamis sont remis dans les enceintes auxquelles on ajoute ≥ 30 % d'eau fraîche et de la nourriture. Les amphipodes retenus par le second tamis (mailles de 250 μm) sont âgés de <7 jours. On les rince dans un bac en plastique blanc translucide disposé sur une table lumineuse et on les compte. À l'aide d'une pipette, on transfère les jeunes de chaque enceinte dans un bécher de 1 L renfermant 750 mL d'eau d'élevage fraîche. Dans les béchers, la densité maximale des amphipodes devrait être de 1 sujet/10 mL d'eau d'élevage (soit 75 sujets par bécher), et ce, pour ne pas inhiber leur croissance (K. Day, INRE, données inédites). On devrait y placer de la gaze hydrophile préalablement trempée, qui servira de substrat aux amphipodes. Chaque jour, on ajoute 10 mL du mélange de LCT dans chaque

¹⁹ Des laboratoires ont signalé une amélioration des taux de croissance et de reproduction d'élevages massifs lorsque les aquariums n'étaient pas tenus en parfait état et que la croissance d'algues était favorisée.

bécher, et on garde les amphipodes 2 jours avant d'entreprendre l'essai toxicologique. Les sujets sont donc âgés de 2-9 jours au début de l'essai. Chaque enceinte de 150 amphipodes donnera 100-150 jeunes par semaine, en moyenne.

Il faut entreprendre l'essai avec des sujets présentant un moins grand écart d'âge (soit ≤ 3 jours; écart recommandé : ≤ 2 jours) afin de réduire la variation éventuelle des résultats, car c'est le poids sec final (un indicateur de croissance) qui sert de principal paramètre de mesure. L'isolement de ~ 1500 adultes (750 couples) en amplexus, qui donneront ~ 800 jeunes en 24 h, exige ~ 6 heures-personnes de travail (USEPA, 1994a, 2000).

Il convient de consigner le nombre d'adultes survivants, de couples reproducteurs et de jeunes, le taux de survie de ces derniers, l'âge des géniteurs et la fréquence de redémarrage des élevages. Ces renseignements permettent de construire des diagrammes de performance qui aideront à déterminer si les élevages maintiennent un taux de reproduction vigoureux, signe de leur bonne santé. On peut s'attendre à un certain taux de mortalité des adultes dans les enceintes d'élevage, mais un taux excessif devrait soulever des préoccupations. L'altération de la qualité de l'eau ou de la nourriture, ou encore la dégradation de l'état de santé des géniteurs, pourrait abaisser le taux de reproduction. La performance des élevages dépend de l'âge des adultes et elle peut suivre une évolution cyclique. Les femelles adultes continuent de se reproduire pendant plusieurs mois; toutefois, leur fertilité diminue graduellement après ~ 3 mois (USEPA, 1994a, 2000).

2.3.11 Critères de santé

On devrait vérifier l'état de santé des amphipodes des élevages ≥ 3 fois par semaine (p. ex., le lundi, le mercredi et le vendredi), de préférence tous les jours. Les sujets qui

semblent en mauvais état de santé (p. ex., décolorés ou stressés), inactifs ou morts lorsqu'on les stimule délicatement ne doivent

pas servir aux essais. Si $>20\%$ des amphipodes dans une enceinte d'élevage d'âge connu semblent morts ou inactifs dans les 48 h précédant l'essai, il faut éliminer tout le groupe de l'enceinte (USEPA, 1994a, 2000).

Idéalement, un essai toxicologique de référence devrait être exécuté parallèlement à chaque essai toxicologique sur un sédiment. Les laboratoires qui procèdent régulièrement à des essais sur des sédiments avec *H. azteca* peuvent effectuer l'essai toxicologique de référence une fois par mois, mais obligatoirement dans les 14 jours précédant ou suivant la mise en route de chaque essai toxicologique. Tous les essais avec des toxiques de référence devraient avoir lieu dans les conditions et selon les modes opératoires exposés en 4.8. Les critères dont on se sert pour juger de la santé et de la sensibilité des élevages pour les besoins des essais sont décrits en 4.7 et en 4.8.

Des mesures biochimiques, telles que la mesure du taux de lipides chez les amphipodes d'élevage ou le nombre moyen de jeunes produits par semaine et par adulte, pourraient fournir des renseignements précieux sur la santé des élevages (USEPA, 1994a, 2000). Il est conseillé de consigner systématiquement les résultats de ces mesures ou d'autres indices sur l'état de santé des élevages, car de telles données se révéleront sans doute utiles. On n'a pas encore établi de critères sanitaires précis en ce qui a trait aux mesures physiologiques, bien que cela puisse se faire à l'avenir.

Section 3

Systeme d'essai

3.1 Installations et appareillage

L'essai peut se dérouler dans un bain d'eau, une enceinte environnementale ou une installation semblable où le contrôle de la température et de l'éclairage est acceptable (v. 3.2). L'installation d'essai doit maintenir le sédiment et l'eau des récipients d'essai à une température moyenne quotidienne de 23 ± 1 °C (v. 4.2). Elle devrait être bien aérée afin de protéger le personnel des émanations nocives et être isolée de toute perturbation physique ou de tout contaminant susceptible de nuire aux organismes. La zone de préparation des sédiments en vue des essais devrait également être bien aérée.

L'installation d'essai devrait être isolée de la zone d'élevage des amphipodes afin d'éviter la contamination éventuelle des élevages. En outre, elle ne devrait pas se trouver dans les locaux servant à la préparation ou à l'entreposage des échantillons, et ce, pour prévenir tout risque de contamination des récipients d'essai et de leur contenu par ces sources. Le système de ventilation devrait être conçu et utilisé de façon à empêcher l'air de l'installation d'essai de contaminer la zone d'élevage, et il devrait faire l'objet d'inspections à cet égard. L'air de reprise des locaux de manipulation et d'entreposage des échantillons ou des zones de traitement ou d'essai des substances chimiques ne devrait pas retourner vers la partie du laboratoire servant aux essais. Tout matériau de construction qui pourrait entrer en contact avec les organismes, l'eau ou les récipients d'essai doit être non toxique (v. 2.3.2).

L'air comprimé qui sert à l'aération de l'eau doit être exempt d'huile et d'émanations. Si possible, on devrait utiliser des pompes pneumatiques sans huile. Des filtres en circuit, qu'on remplace au besoin afin d'en assurer l'efficacité, devraient

arrêter toute l'huile ou toute particule présente dans l'air d'arrivée.

On devrait choisir l'équipement et les fournitures entrant en contact avec l'eau, les sédiments ou les récipients d'essai de façon à réduire au minimum la sorption de substances chimiques. On devrait utiliser, dans toute la mesure du possible, le verre borosilicaté, le nylon, le polyéthylène haute densité, les polycarbonates, les plastiques fluorocarbonés et l'acier inoxydable 316 pour réduire au minimum la sorption et la lixiviation des substances chimiques. On doit éviter les appareils et les fournitures faits de matériaux toxiques (v. 2.3.2).

L'essai toxicologique sur un sédiment doit se dérouler en conditions statiques (sans renouvellement de l'eau sus-jacente). Toutefois, si l'eau d'essai recouvrant un *sédiment de référence* se dégrade à cause de sa forte teneur en ammoniac, de sa teneur en OD trop faible ou d'un pH se situant à l'extérieur de la plage de tolérance de *H. azteca*, et si les effets de ces facteurs confusionnels sont exclus de l'évaluation du toxique, l'essai doit alors être exécuté ou poursuivi en tant qu'essai à renouvellement intermittent, où l'eau sus-jacente des récipients d'essai est renouvelée ≥ 3 fois par semaine (c.-à-d. ≥ 6 fois pendant l'essai) (v. section 4). La présence d'ammoniac dans un sédiment d'eau douce est attribuable aux processus naturels de décomposition de la matière organique incorporée dans le sédiment, de même qu'à des sources anthropiques. Une nourriture trop abondante ou non consommée peut aussi hausser la teneur en ammoniac de l'eau sus-jacente. De plus, pendant l'essai, l'oxydation des sulfures des échantillons de sédiment peut entraîner une baisse du pH à une valeur extrêmement basse (p. ex., pH 4) et

causer la mort de tous les *H. azteca* dans un sédiment de référence non contaminé (Borgmann et Norwood, 1999). *H. azteca* peut survivre à une exposition à une concentration extrêmement faible d'OD, mais cela peut influencer sur sa croissance (v. 1.4). Des teneurs élevées en ammoniac, un pH bas et une faible teneur en OD (c.-à-d. les facteurs ayant une incidence sur la survie et/ou la croissance de *H. azteca*) dans le sédiment de référence (présupposé non contaminé) prélevé sur le terrain pourraient fausser l'interprétation des résultats d'un essai toxicologique sur un sédiment. Dans la présente version révisée et actualisée du rapport SPE 1/RM/33, on recommande que la teneur en ammoniac ($>0,2$ mg de $\text{NH}_3\text{-N}$ non ionisé par litre²⁰), le pH ($<6,0$ ou $>8,0$) et la teneur en OD

²⁰ Cette recommandation dépend des objectifs poursuivis. Elle se fonde sur les résultats d'une étude du LEEA visant à déterminer l'effet de facteurs confusionnels (en l'occurrence, l'ammoniac) dans les essais toxicologiques sur un sédiment. Dans cette étude, un sable siliceux enrichi avec du chlorure d'ammonium a été mis à l'essai avec une eau sus-jacente également enrichie avec du chlorure d'ammonium et, dans un deuxième essai, une eau sus-jacente non contaminée (c.-à-d. non enrichie). Les CL_{25} 14 jours de la croissance de *H. azteca* étaient de 0,2-1 mg et de 0,2-0,4 mg de $\text{NH}_3\text{-N}$ non ionisé par litre d'après les teneurs en ammoniac de l'eau de porosité et de l'eau sus-jacente, respectivement (Jackman et Doe, 2000). On a aussi compilé des données de diverses sources documentaires afin de faciliter la détermination de la concentration d'ammoniac pouvant être considérée comme nocive pour *H. azteca* et pouvant servir de fondement à la décision de procéder à un essai à renouvellement intermittent, mais bon nombre de ces sources n'étaient pas pertinentes (les essais prévoyaient une exposition dans l'eau seulement, différentes durées d'essai, etc.) et aucune n'incluait de paramètres *sublétaux*. Les deux études les plus pertinentes (Besser et coll., 1998 ainsi que Whiteman et coll., 1996) comportaient des essais de 4 jours sur des sédiments avec *H. azteca*, et les CL_{50} signalées étaient du même ordre que celles obtenues dans l'étude sur l'ammoniac du LEEA. Les résultats qu'ont obtenus Whiteman et coll. ainsi que le LEEA montrent que la CL_{50} d'ammoniac dans l'eau de porosité était ~10 fois plus élevée que dans l'eau sus-jacente. Whiteman et coll. (1996) attribuent cet écart au comportement d'évitement de *H. azteca* dans le sédiment. Ces données indiquent également que la teneur en ammoniac de l'eau sus-jacente est peut-être associée plus directement à des effets toxiques sur *H. azteca* que celle

(<40 % de la valeur de saturation²¹) de l'eau d'essai recouvrant le sédiment de référence soient utilisés pour déterminer si on doit procéder à un essai à renouvellement intermittent plutôt qu'à un essai en conditions statiques lorsque l'objet de l'essai est d'évaluer les effets toxiques attribuables à des substances ou matières, mais sans les effets de ces facteurs confusionnels.

Dans les essais toxicologiques dans l'eau seulement, obligatoirement assortis d'un renouvellement intermittent, il faut renouveler les solutions d'essai ≥ 3 fois par semaine (soit ≥ 6 fois pendant l'essai) (v. 7.5.3).

Le renouvellement de l'eau sus-jacente peut être manuel (v. 4.1 et 7.5.3) ou automatique (USEPA, 2000). Plusieurs modèles d'appareils assurent la distribution et le renouvellement automatisés de l'eau sus-jacente dans les récipients d'essai (p. ex., Maki, 1977; Benoit et coll., 1993; Zumwalt et coll., 1994). On pourrait utiliser, par exemple, un appareil qui permet le renouvellement minuté et *intermittent* de l'eau sus-jacente de chaque récipient d'essai à raison de 2 volumes d'eau par jour (USEPA, 1994a, 2000). On trouvera dans USEPA (2000) des conseils utiles sur la conception d'un tel appareil et d'autres systèmes de renouvellement automatisé de l'eau sus-jacente.

Pour l'aération continue (à faible débit) de chaque récipient d'essai, on se sert d'un jeu

de l'eau de porosité et qu'il faudrait sans doute une concentration plus élevée d'ammoniac dans cette dernière (soit $>0,2$ mg de $\text{NH}_3\text{-N}$ non ionisé par litre) pour induire une toxicité attribuable à l'ammoniac. Il a été démontré que de nombreux facteurs influent sur la toxicité de l'ammoniac pour *H. azteca*, ce qui ajoute à la confusion. Ces facteurs incluent la température, le pH, la dureté et la composition ionique (sodium, potassium, bromure et chlorure) du milieu dans lequel *H. azteca* est mis à l'essai (Borgmann, 1994, 1996; Ankley et coll., 1995; Borgmann et Borgmann, 1997; Wang et coll., 2008).

²¹ Le pH et les concentrations d'OD recommandés ici se fondent sur les données d'ouvrages scientifiques relatifs à la tolérance de *H. azteca* quant au pH et à l'OD (v. 1.4).

de pipettes en verre jetables et de conduites d'air pour aquarium. Pour réguler le débit d'air, il est recommandé d'utiliser des robinets multiples en acier inoxydable (plutôt qu'en laiton). De plus, il faut disposer d'un approvisionnement de verres de montre ou de couvercles de la bonne taille pour couvrir chaque récipient d'essai.

L'installation d'essai doit comporter les instruments de base exigés pour surveiller la qualité (p. ex., température, pH, OD, conductivité) de l'eau d'essai et de l'eau de porosité. En outre, le laboratoire devrait être équipé des instruments permettant de procéder à des analyses rapides et précises, dans des limites acceptables de détection, de variables telles que la dureté, l'alcalinité, la teneur en ammoniac et (si on utilise l'eau déchlorée du robinet pour l'élevage ou les essais) le chlore résiduel.

Tous les récipients d'essai, tout l'équipement et toutes les fournitures susceptibles d'entrer en contact avec le sédiment ou l'eau d'essai doivent être propres et rincés avant usage à l'eau d'essai, à l'eau désionisée ou à l'eau distillée. On devrait laver après usage toutes les fournitures non jetables. On recommande la méthode de nettoyage suivante (USEPA, 1994a, 2000) :

- 1) trempage dans l'eau du robinet pendant 15 min; récurage avec un détergent ou lavage au lave-vaisselle automatique;
- 2) double rinçage à l'eau du robinet;
- 3) rinçage soigneux à l'acide nitrique (HNO_3) ou chlorhydrique (HCl) frais dilué (10 % en volume²²), afin d'éliminer le tartre, les métaux et les bases;
- 4) double rinçage à l'eau désionisée;

- 5) rinçage à l'acétone non diluée, de qualité pesticide, afin d'éliminer les composés organiques (travailler sous une hotte);
- 6) triple rinçage à l'eau désionisée de grande qualité.

Les récipients d'essai et l'appareillage susceptibles d'entrer en contact avec le sédiment ou l'eau d'essai devraient être rincés à fond à l'eau d'essai immédiatement avant l'emploi.

Avant d'entreprendre des essais toxicologiques dans une nouvelle installation, on devrait réaliser ≥ 5 essais toxicologiques de référence de 96 h dans l'eau seulement, et ≥ 5 essais de mesure *de la survie et de la croissance*, d'une durée de 14 jours, sur un sédiment témoin (pour les essais sur un sédiment) ou dans l'eau témoin/de dilution (pour les essais dans l'eau seulement), avec différents lots d'organismes expérimentaux, afin de confirmer que la nouvelle installation permettra d'obtenir une performance acceptable de *H. azteca* dans les conditions d'élevage et d'essai précisées dans la présente méthode (v. 2.3.1 et sections 4 et 7). Dans chaque essai avec un toxique de référence, un sédiment témoin ou une eau témoin/de dilution, on devrait employer un *lot* différent d'organismes d'élevage. On devrait comparer les résultats de ces essais préliminaires en calculant et en estimant le CV des séries respectives d'essais et de paramètres.

3.2 Éclairage

L'éclairage de tous les récipients d'essai devrait être direct et vertical, en spectre continu (p. ex., éclairage fluorescent ou l'équivalent), et être assez intense pour fournir 500-1000 lux près de la surface de l'eau. Il devrait être aussi uniforme que possible pour tous les récipients. On devrait régler la photopériode à 16 h.

²² Pour préparer une solution d'acide titrant 10 %, ajouter lentement 10 mL d'acide concentré à 90 mL d'eau désionisée.

3.3 Récipients d'essai

Il faut utiliser des béciers ou des bocaux en verre comme récipients d'essai. Il est recommandé d'employer des récipients en verre de forme haute, d'une capacité de 300 mL et d'un diamètre intérieur de ≥ 7 cm (USEPA, 1994a, 2000; ASTM, 1995a, 2010; EC, 1997a). Chaque bécier ou bocal doit être nettoyé à fond avant et après usage (v. 3.1) et être bien rincé à l'eau d'essai immédiatement avant l'emploi. Il convient de couvrir les récipients de tous les essais, surtout si le *sédiment d'essai* renferme des concentrations détectables de gaz volatils. Les verres de montre propres ou les couvercles en verre ou en plastique conviennent à cette fin.

3.4 Eau d'essai et eau témoin/ de dilution

Selon le plan d'expérience et l'objectif poursuivi (v. sections 5 et 6), l'eau d'essai (c.-à-d. l'eau recouvrant le sédiment) et l'eau témoin/de dilution (c.-à-d. l'eau servant à préparer les dilutions des substances chimiques d'essai et employée comme eau témoin dans les essais *dans l'eau seulement*) peuvent provenir d'une source non contaminée d'eau douce ou estuarienne naturelle; on peut aussi utiliser une eau reconstituée. On emploie souvent l'eau qui a servi à l'élevage de *H. azteca* (v. 2.3.4). Toutefois, l'eau trouvée sur le site à l'étude ou une eau non contaminée dont on a ajusté la dureté pour qu'elle corresponde à la valeur de celle de l'eau du lieu de prélèvement peut constituer un bon choix (v. 5.4). La qualité de l'eau d'essai et de l'eau témoin/de dilution est extrêmement importante – on doit avoir démontré qu'elle permet des taux de survie et de croissance acceptables des organismes au cours d'essais de 14 jours sur un sédiment témoin (v. 4.7), et ce, avant de servir dans des essais toxicologiques²³. Lorsque l'eau d'essai provient

du site à l'étude, il faut préparer un deuxième jeu de *témoins* avec l'eau du laboratoire qui a permis antérieurement à ce dernier d'obtenir des résultats valides dans un essai de 14 jours sur la survie et la croissance de *H. azteca*²⁴. Sauf si les organismes expérimentaux proviennent d'une source externe, le laboratoire doit utiliser l'eau dans laquelle il a élevé les amphipodes. Dans le cas d'organismes provenant d'une source externe, le laboratoire peut utiliser comme deuxième solution *témoin* une autre source d'eau non contaminée avec laquelle il a obtenu des résultats d'essai valides (p. ex., une eau reconstituée employée comme MAN-5S). On trouvera en 2.3.4 des conseils sur la préparation d'eau douce ou d'eau estuarienne reconstituée (salinité de ≤ 15 ‰).

Avant l'emploi, il faut ajuster la température de l'eau d'essai et de l'eau témoin/de dilution en fonction de celle exigée pour l'essai (23 ± 1 °C). À cette température, la teneur en OD de l'eau devrait être de 90-100 % de la valeur de

aliments et l'eau utilisés pour les essais sur un sédiment avec des amphipodes conviennent (USEPA, 2011). Ainsi, les laboratoires peuvent mener un essai de 14 jours comportant l'utilisation de récipients d'essai renfermant une fine couche de sable quartzueux, de même que l'eau d'essai et/ou l'eau témoin/de dilution et la nourriture normalement utilisées pour l'essai définitif. Si les critères de validité de l'essai sont respectés (c.-à-d. un taux de survie de ≥ 80 % et un poids final de $\geq 0,1$ mg par organisme), alors les aliments et l'eau utilisés peuvent être considérés comme adéquats.

²⁴ Si l'essai a pour objet de mesurer à quel point une eau réceptrice donnée peut modifier la toxicité du sédiment ou de la matière d'essai à cause de ses caractéristiques physicochimiques (p. ex., dureté, pH, *turbidité*, teneur en acide humique ou fulvique) et/ou de la présence d'autres contaminants, le chercheur peut choisir d'utiliser de l'*eau d'amont* comme eau d'essai (c.-à-d. comme eau sus-jacente ou eau témoin/de dilution). Une comparaison des témoins de cette eau et des témoins maintenus dans l'eau du laboratoire permettra de relever les effets toxiques susceptibles d'être attribuables à l'eau d'amont. Pour mieux connaître l'influence de chaque type d'eau d'essai ou d'eau témoin/de dilution sur la toxicité de la matière d'essai, on peut comparer un à un les effets toxiques de chaque type d'eau utilisée pour préparer les traitements.

²³ L'USEPA a publié récemment des conseils sur la façon dont les laboratoires peuvent démontrer, d'après la performance des organismes expérimentaux, que les

saturation. Au besoin, on devrait aérer vigoureusement le volume exigé d'eau (à l'air comprimé, exempt d'huile, traversant des pierres poreuses) immédiatement avant l'emploi et on devrait vérifier que la teneur en OD atteint 90-100 % de la valeur de saturation. Le pH de l'eau devrait être mesuré et rester stable avant l'emploi.

3.5 Sédiment témoin

Chaque essai toxicologique sur un sédiment doit inclure un sédiment témoin réparti dans ≥ 5 récipients de répétition (bêchers ou bocaux). Essentiellement, un sédiment témoin est exempt de tout contaminant susceptible de nuire à la survie, à la croissance ou au comportement de *H. azteca* au cours de l'essai. Ce sédiment témoin permet de s'assurer que l'essai est acceptable (le taux moyen de survie à la fin de l'essai doit être de ≥ 80 %) et que les organismes expérimentaux sont en bonne santé et se comportent normalement, en plus de servir de point de comparaison pour l'interprétation des résultats de l'essai sur un sédiment.

Deux types de sédiment témoin peuvent être utilisés : 1) un sédiment prélevé dans la nature, à l'écart de sources connues de contaminants, dont on sait par expérience qu'il permet une survie et une croissance acceptables de *H. azteca* dans les conditions de l'essai²⁵; 2) un

²⁵ Le sédiment témoin devrait assurer le maintien des organismes expérimentaux, mais il ne devrait pas être « riche » au point de favoriser une croissance des organismes supérieure à celle obtenue pour la plupart des sédiments prélevés sur le terrain. Si le sédiment témoin du laboratoire est trop « nutritif », il est possible que le sédiment d'essai non contaminé et moins nutritif paraisse toxique. Pour évaluer la qualité d'un sédiment témoin, le laboratoire devrait mener un essai sur ce dernier et sur un sable quartzéux témoin. Si la croissance dans le sédiment témoin habituel dépasse de >20 % celle mesurée dans le sable quartzéux témoin, alors le sédiment témoin peut être considéré comme acceptable. L'USEPA (2011) recommande aux laboratoires d'employer des sédiments témoins satisfaisant à ce critère (à savoir un écart de <20 % dans le taux de croissance de *H. azteca* par rapport à un sable quartzéux témoin).

sédiment artificiel²⁶. Le choix du sédiment témoin qui convient dépend de considérations telles que le plan d'expérience, les caractéristiques physicochimiques du ou des sédiments d'essai et la disponibilité d'un *sédiment non contaminé* adéquat possédant les propriétés recherchées. Le sédiment devrait également avoir permis d'obtenir des valeurs acceptables et cohérentes quant aux paramètres biologiques établis pour *H. azteca* dans l'application de la présente méthode. Si des sédiments naturels non contaminés ont longtemps servi comme sédiments témoins dans des essais toxicologiques avec *H. azteca*, les sédiments artificiels sont un gage de constance et d'uniformité plus grandes, que recherchent activement de nombreux scientifiques (Smith et coll., 1992b; Dwyer et coll., 1993; Suedel et Rodgers, 1994a, 1994b; USEPA, 1994a, 2000; Suedel et coll., 1996).

Il existe différentes méthodes acceptables de préparation et de conditionnement d'un sédiment artificiel (USEPA, 2000; ISO, 2010). En règle générale, au moment de choisir la formule qui sera employée pour préparer un sédiment témoin ou d'essai, on devrait tenir compte des attributs suivants :

- 1) le sédiment devrait assurer la survie, la croissance ou la reproduction de diverses espèces d'organismes benthiques;

²⁶ Un sédiment artificiel (aussi appelé sédiment reconstitué ou sédiment synthétique) renferme généralement du sable, du limon, de l'argile et des constituants organiques non toxiques du commerce. On le mouille avec de l'eau reconstituée ou naturelle. On peut le préparer de façon à simuler différents sédiments naturels sur le plan de la granulométrie, de la teneur en carbone organique, du pH, de la capacité d'échange cationique, etc. (Suedel et Rodgers, 1994b; Milani et coll., 1996). Il existe aussi des formules permettant de préparer un ou des sédiments témoins normalisés, qu'on utilisera de façon régulière dans les essais toxicologiques sur un sédiment d'eau douce, avec *H. azteca* ou d'autres espèces endofauniques (Suedel et coll., 1996).

- 2) le sédiment devrait donner des résultats cohérents et acceptables quant aux paramètres biologiques établis pour diverses espèces;
- 3) le sédiment devrait être constitué de composants standard que les laboratoires d'essais peuvent se procurer facilement;
- 4) le sédiment devrait être exempt de contaminants à des concentrations susceptibles d'avoir des effets indésirables sur les organismes expérimentaux.

Un sédiment artificiel préparé selon la formule suivante peut servir comme témoin dans les essais sur un sédiment d'eau douce ou en tant que matière non contaminée qui sera enrichie avec une substance chimique d'essai (ISO, 2010).

Mélanger les ingrédients secs suivants dans les proportions (pourcentage de la fraction massique) indiquées :

- 40 % sable siliceux (0,1-0,4 mm)²⁷
- 30 % sable siliceux (W4 – taille moyenne des particules : 0,063 mm de diamètre)
- 20 % alumine (Al₂O₃)
- 4,5 % oxyde de fer(III) (Fe₂O₃)
- 4 % tourbe (tourbe décomposée provenant d'une tourbière haute, non traitée, broyée finement et tamisée dans un tamis à mailles de <1 mm)
- 1 % CaCO₃
- 0,5 % dolomite (argile)

Cette formule se fonde sur celle recommandée dans ISO (2010) (essais avec des nématodes) et ISO (2011) (essais avec *H. azteca*).

²⁷ Le sable siliceux renferme de la silice cristalline, une *substance désignée* aux termes de la *Loi sur la santé et la sécurité au travail* de l'Ontario. Une substance désignée est une substance à laquelle « le travailleur ne doit pas être exposé ou dont le contact est régi, restreint, limité ou contrôlé ». On devrait consulter la fiche signalétique du sable siliceux avant d'employer cette substance, et le personnel devrait prendre les mesures de précaution qui s'imposent pour prévenir toute inhalation et tout contact avec cet ingrédient.

Section 4

Modes opératoires universels

Les conditions et modes opératoires généraux exposés ci-après s'appliquent à chacun des essais toxicologiques décrits (essais sur des échantillons de sédiment, de déchets particuliers ou de substances chimiques), de même qu'aux essais toxicologiques de référence. La section 5 présente des modes opératoires plus spécifiques pour les essais sur des échantillons de sédiment ou d'autres matières particulières semblables (p. ex., boues, résidus miniers essorés, résidus de boues de forage) prélevés sur le terrain. La section 6 renferme des conseils et décrit des modes opératoires relativement à des essais sur des échantillons témoins ou des échantillons enrichis en laboratoire avec une ou des substances chimiques, des sédiments contaminés ou des déchets particuliers. La section 7 décrit la marche à suivre pour effectuer des essais toxicologiques de 14 jours dans l'eau seulement, c'est-à-dire avec des échantillons d'eaux usées, d'eau réceptrice ou de substances chimiques.

Il faut intégrer dans les modes opératoires universels tous les aspects du système d'essai décrit dans la section 3. Le tableau 2 présente une liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés, non seulement en ce qui a trait aux procédures universelles, mais aussi à celles applicables aux essais sur des types précis de substances ou matières.

Les modes opératoires universels décrits ici s'appliquent à un essai toxicologique de 14 jours²⁸ sur un sédiment, en conditions

statiques ou à renouvellement intermittent, selon la stabilité des caractéristiques chimiques et la qualité de l'eau d'essai recouvrant le ou les sédiments de référence et selon les objectifs de l'essai (v. 1.1 et 3.1). Normalement, l'essai doit être exécuté en conditions statiques – pendant l'exposition, l'eau sus-jacente n'est pas renouvelée (sauf pour compenser les pertes dues à l'évaporation) et elle est aérée en continu. Toutefois, si la qualité de l'eau d'essai recouvrant le sédiment provenant d'une station d'échantillonnage de référence se dégrade à cause de la hausse de la teneur en ammoniac (à >0,2 mg de NH₃-N par litre), d'une dérive du pH à l'extérieur de la plage de tolérance de *H. azteca* (<6,0 ou >8,0) et/ou de teneurs extrêmement basses en OD (<40 % de la valeur de saturation) pendant l'essai, et que les objectifs de l'essai exigent l'exclusion de ces facteurs confusionnels des mesures des effets totaux de l'échantillon, l'essai doit être exécuté (entrepris) ou poursuivi²⁹ en tant qu'essai à renouvellement intermittent. Dans ce dernier type d'essai, l'eau sus-jacente de tous les récipients d'essai (c.-à-d. ceux contenant le sédiment de référence, le sédiment d'essai et le sédiment témoin du laboratoire) doit être renouvelée ≥3 fois par semaine en des journées non consécutives (donc 6 fois pendant l'essai), par l'ajout de 2 volumes d'eau sur 24 h, et les récipients d'essai doivent être

dimorphisme sexuels qui s'observent alors (Borgmann et coll., 1989). Les modes opératoires décrits ici, appliqués tels quels ou modifiés au besoin pour prolonger l'essai à >4 semaines, permettraient de discerner et de mesurer les effets sur la reproduction de *H. azteca* (Borgmann et coll., 1989; ASTM, 1991a, 1993).

²⁹ Un essai entrepris en conditions statiques peut être poursuivi en tant qu'essai à renouvellement intermittent, selon les résultats des analyses de la qualité de l'eau (ammoniac, pH et OD de l'eau recouvrant le sédiment de référence) effectuées pendant toute la durée de l'essai et selon les objectifs de l'essai (v. 3.1).

²⁸ On a souvent effectué des essais toxicologiques de ≤4 semaines avec *H. azteca* (p. ex., Nebeker et coll., 1984; Borgmann et Munawar, 1989; Ingersoll et Nelson, 1990; ASTM, 1991a, 1993; INRE, 1992; Borgmann et Norwood, 1993). Après 14 jours, on peut parfois mieux discerner les effets toxiques sur la survie des amphipodes, mais la sensibilité du paramètre de croissance pourrait ne pas être améliorée en raison de la maturation et du

Tableau 2. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques sur un sédiment avec *H. azteca*

Essai universel	
Type d'essai	– essai toxicologique de 14 jours sur un sédiment entier; normalement, essai en conditions statiques (aucun renouvellement); possibilité d'un renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente si les valeurs suivantes sont atteintes : >0,2 mg de NH ₃ -N non ionisé par litre, pH <6,0 ou >8,0 et/ou OD de <40 % de la valeur de saturation, ou si les objectifs de l'essai l'exigent
Renouvellement de l'eau	– normalement, aucun renouvellement de l'eau sus-jacente, sauf pour compenser les pertes dues à l'évaporation; sinon, renouvellement de l'eau sus-jacente ≥3 fois par semaine en des journées non consécutives (c.-à-d. ≥6 fois pendant l'essai), par l'ajout de 2 volumes d'eau sur 24 h
Eau d'essai (sus-jacente)	– eau d'élevage, eau souterraine ou eau de surface, non contaminée; eau du site à l'étude; eau dont la dureté a été appariée à celle de l'eau du site à l'étude; eau douce reconstituée pour une plus grande normalisation; eau de mer naturelle ou reconstituée d'une salinité de ≤15 ‰ pour les essais sur un sédiment estuarien; teneur en OD de 90-100 % de la valeur de saturation
Acclimatation	– acclimatation recommandée des organismes expérimentaux à l'eau d'essai si celle-ci diffère de l'eau d'élevage; l'acclimatation devrait avoir lieu le jour précédant la mise en route de l'essai (jour -1); pour un essai sur un sédiment estuarien, les organismes devraient être acclimatés graduellement à une eau d'essai dont la salinité est semblable à celle de l'eau de porosité du sédiment d'essai
Sédiment témoin	– échantillon de sédiment naturel ou artificiel, non contaminé, pour évaluer la performance des organismes expérimentaux et l'acceptabilité de l'essai
Amphipodes	– prélevés dans un élevage d'âge connu, âgés de <1-7 jours, puis gardés dans 750 mL d'eau d'élevage dans un béccher de 1 L, pendant 2 jours avant l'essai, nourris quotidiennement avec 10 mL de LCT; au début de l'essai, les amphipodes sont âgés 2-9 jours et présentent un écart d'âge de ≤3 jours (écart recommandé : ≤2 jours); 10 amphipodes par récipient d'essai
Récipient d'essai	– béccher ou bocal en verre d'une capacité de 300 mL (recommandé) et de forme haute, d'un diamètre intérieur de ≥7 cm (recommandé); normalement couvert
Volume de sédiment humide	– 100 mL (recommandé) ou ≥55 mL (facultatif); épaisseur obligatoire de ≥2 cm
Volume d'eau d'essai	– 175 mL (recommandé) ou volume (facultatif) donnant un rapport sédiment-eau de 1:4 (p. ex., 55 mL de sédiment et 220 mL d'eau d'essai, ou 100 mL de sédiment et 400 mL d'eau d'essai)

Nombre de réplicats et de répétitions	– obligatoirement, ≥ 5 <i>réplicats</i> , chacun étant un échantillon distinct (différent) provenant de la même <i>station d'échantillonnage</i> ; obligatoirement, ≥ 5 répétitions pour les essais à concentrations multiples (p. ex., sédiment enrichi) et les essais sur un sédiment témoin
Température	– moyenne quotidienne : 23 ± 1 °C; instantanée : 23 ± 3 °C
Éclairage	– éclairage vertical en spectre continu (fluorescent ou l'équivalent); 500-1000 lux; photopériode de 16 h
Aération	– continue et minimale (p. ex., 2-3 bulles/s, dans chaque récipient d'essai)
Alimentation	– suspension aqueuse de LCT, flocons moulus d'aliments pour poissons (du commerce) (p. ex., Nutrafin®, Tetrafin®, TetraMin® ou Zeigler® Aquatox Feed) ou mélange à 50/50 de ces deux types d'aliments, qu'on distribue dans chaque récipient d'essai quotidiennement ou 3 fois par semaine (en des journées non consécutives) : 2,7 mg de solides (poids sec) (ou l'équivalent) par jour ou 6,3 mg de solides (poids sec) (ou l'équivalent) 3 fois par semaine
Observations	– facultatives : dans chaque récipient, nombre d'amphipodes sortis du sédiment et comportement des amphipodes (observations quotidiennes ou plus espacées)
Mesures des caractéristiques de l'eau sus-jacente	– ≥ 3 fois par semaine : teneur en OD et température dans chaque <i>traitement</i> ; teneur en ammoniac et pH de chaque échantillon de sédiment de référence au début et à la fin de l'essai : pH, conductivité et teneur en ammoniac de chaque traitement; recommandé : dureté et/ou alcalinité au début et à la fin de l'essai
Paramètres	– taux de survie et poids sec final notablement inférieurs à ceux des organismes des traitements témoins ou de référence (d'après le taux moyen de survie et le poids sec moyen, dans chaque traitement); CL_{50} 14 jours pour les essais à concentrations multiples, s'il y a lieu; CI_p du gain de poids, s'il y a lieu
Validité de l'essai	– essai invalide si, après 14 jours, le taux moyen de survie des amphipodes exposés au sédiment témoin est de < 80 %; essai invalide si le poids sec moyen par amphipode dans les groupes témoins des répétitions est de $< 0,1$ mg à la fin de l'essai

Sédiment ou matière particulaire semblable prélevé sur le terrain

Transport et entreposage	– si la température de l'échantillon est de > 7 °C, refroidir celui-ci à 7 °C (avec de la glace ou des blocs réfrigérants); transport dans l'obscurité à 1-7 °C (de préférence à 4 ± 2 °C); entreposage dans l'obscurité à 4 ± 2 °C; l'essai devrait débuter dans les 2 semaines, obligatoirement dans les 6 semaines après le prélèvement de l'échantillon
Sédiment de référence	– extrait d'au moins une station d'échantillonnage pour les essais sur un sédiment prélevé sur le terrain, en des endroits présumés non contaminés, mais se trouvant dans les environs du site de prélèvement du sédiment d'essai (c.-à-d. dans la même masse d'eau); souvent choisi pour l'essai toxicologique en raison de ses similitudes physicochimiques (p. ex., granulométrie et/ou teneur en carbone organique) avec le sédiment d'essai

Caractérisation de l'échantillon	– analyses minimales : granulométrie (pourcentage de sable, de limon et d'argile), carbone organique total, pourcentage d'eau, pH de l'eau de porosité, teneur en ammoniac de l'eau de porosité
Préparation de l'échantillon	– uniquement s'il le faut, enlever les débris et les macro-organismes indigènes à l'aide de pincettes; homogénéiser l'échantillon (y compris tout surnageant) avant de l'utiliser dans l'essai; au besoin, le débarrasser des petits macro-organismes par passage au tamis fin (p. ex., mailles de 0,25-0,5 mm) par pression mécanique ou par lavage au liquide qui s'est séparé de l'échantillon au cours du transport et de l'entreposage, puis mélanger de nouveau ce liquide avec l'échantillon tamisé
Échantillon enrichi	
Caractérisation de la ou des substances chimiques	– information exigée sur la stabilité, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la pureté et la biodégradabilité des substances chimiques ajoutées au sédiment témoin
Solvant	– l'eau d'essai est le solvant de premier choix; si on utilise un solvant organique, l'essai doit comprendre un témoin sédiment-solvant
Préparation des mélanges	– les procédures dépendent du plan et des objectifs de l'essai; pourraient comprendre une ou plusieurs concentrations de la ou des substances chimiques ajoutées au sédiment témoin ou au sédiment d'essai, ou des concentrations d'une substance chimique donnée ajoutée à l'eau d'essai recouvrant le sédiment témoin; on peut préparer les mélanges de substances chimiques et de sédiment sous forme de suspension épaisse, soit à la main, soit par agitation mécanique
Concentration de la ou des substances chimiques ajoutées	– normalement mesurée au début et à la fin de l'essai, en 3 titres au moins : élevé, moyen et faible
Eau d'essai et eau de dilution	– eau reconstituée si l'essai exige un degré élevé de normalisation

aérés³⁰. Si les ressources et les objectifs de l'étude le permettent, on peut exécuter en

³⁰ Les deux options ont donné des résultats en apparence semblables quand on les a utilisées selon les modes opératoires décrits ici. On a comparé le rendement des deux options à l'aide d'essais parallèles et d'échantillons de sédiment prélevés sur le terrain ou enrichis avec un contaminant (Milani et coll., 1996). Les essais interlaboratoires avec *H. azteca* ont montré que la précision et la sensibilité des deux systèmes étaient similaires (Milani et coll., 1996). Les CV interlaboratoires de la moyenne générale (tous les laboratoires) des

données sur le taux de survie après 14 jours pour chacun des 4 échantillons de sédiment prélevés sur le terrain variaient de 3,6 à 19,6 % en conditions statiques et de 2,5 à 11,0 % dans le système à renouvellement intermittent. Dans les deux systèmes, le taux de croissance a été plus variable, les CV du poids sec des amphipodes à la fin de l'essai variant de 28,4 à 48,8 % en conditions statiques et de 26,0 à 35,7 % dans le système à renouvellement intermittent. On a inclus la possibilité d'une exposition avec renouvellement intermittent, selon les objectifs de l'essai, étant donné que, pendant un essai sur un sédiment, la qualité de l'eau sus-jacente

parallèle des essais en conditions statiques et à renouvellement intermittent afin de déterminer les effets des facteurs confusionnels sur la toxicité de l'échantillon.

Des situations particulières peuvent exiger un renouvellement plus fréquent de l'eau sus-jacente (p. ex., tous les jours, à raison de 2 volumes d'eau). Le renouvellement de l'eau peut être quotidien si (et seulement si) la qualité de l'eau recouvrant un sédiment de référence est présumée très instable (en d'autres termes, la teneur en ammoniac, le pH et/ou la teneur en OD de l'eau sus-jacente continuent de varier au-delà des plages acceptables décrites ci-dessus, et ce, chaque jour) et que les objectifs de l'essai exigent d'exclure les effets que peut avoir une eau sus-jacente dont la qualité se dégrade³¹.

Dans tous les essais, on nourrit les amphipodes avec une suspension aqueuse de LCT, de flocons moulus d'aliments pour poissons (du commerce) ou d'un mélange à 50/50 de ces 2 types d'aliments, soit quotidiennement, soit 3 fois par semaine en des journées non consécutives (v. 4.4). Les paramètres biologiques mesurés dans la présente méthode sont le taux de survie et le poids sec à la fin de l'essai.

(ammoniac, pH ou OD) peut ne pas favoriser la survie des amphipodes.

³¹ Dans un essai à renouvellement quotidien, l'eau recouvrant le sédiment dans chaque récipient d'essai devrait être renouvelée le jour précédant la mise en route de l'essai (jour -1), de même que pendant toute la durée de l'essai, à raison de 2 volumes d'eau par jour (USEPA, 1994a, 2000). Normalement, ce type d'essai n'exige pas l'aération de l'eau sus-jacente. La teneur en OD de l'eau sus-jacente ne s'abaissera pas à <40 % de la valeur de saturation parce que l'eau est renouvelée quotidiennement, sauf si l'échantillon de sédiment utilisé dans l'essai présente une demande en oxygène anormalement élevée. Toutefois, si elle s'abaisse à <40 % de la valeur de saturation dans un ou plus d'un récipient d'essai, il faudrait aérer l'eau sus-jacente de tous les récipients, y compris les témoins, conformément aux procédures décrites en 4.3 (USEPA, 1994a, 2000).

4.1 Début de l'essai

Chaque récipient d'essai (v. 3.3) de l'installation doit être clairement codé ou étiqueté afin qu'on puisse identifier l'échantillon ou sa concentration. Il faut consigner la date et l'heure du début de l'essai, soit directement sur les étiquettes, soit sur des feuilles de données distinctes réservées à l'essai. On devrait disposer les récipients d'essai de façon à faciliter les observations et les mesures. Les traitements devraient être répartis au hasard dans l'installation d'essai (USEPA, 1994a, 2000).

La journée du début de l'exposition des amphipodes aux échantillons de substance ou matière d'essai est désignée jour 0. La veille (c.-à-d. le jour -1)³², on devrait mélanger à fond³³ chaque échantillon ou sous-échantillon de sédiment d'essai (ou de matière particulaire semblable), y compris de sédiment témoin et de sédiment de référence, jusqu'à homogénéisation de la couleur, de la texture et de la teneur en eau (v. 5.3 et 6.2). Les mesures quantitatives de l'homogénéité pourraient englober la granulométrie, le carbone organique total, le taux d'humidité et les concentrations de substances chimiques données.

Immédiatement après le mélange, on devrait transférer des volumes identiques de sédiment dans les récipients d'essai. Deux ratios sédiment-eau sont recommandés. Pour le ratio standard de 1:1,75, on devrait employer 100 mL de sédiment. Le deuxième ratio, qui ne devrait être utilisé que lorsque des volumes plus élevés d'eau sont nécessaires aux analyses chimiques de l'eau sus-jacente, est de 1:4, soit ≥55 mL de sédiment d'une épaisseur de ≥2 cm (p. ex., 55 mL de sédiment et 220 mL d'eau d'essai, ou

³² Dans certains cas, il faudra peut-être prévoir un temps d'équilibre plus long (p. ex., ≥7 jours avant l'essai), selon les caractéristiques du sédiment prélevé sur le terrain et/ou les objectifs de l'étude.

³³ On doit réincorporer dans l'échantillon tout liquide qui s'en est séparé pendant le transport ou l'entreposage.

100 mL de sédiment et 400 mL d'eau d'essai). Pour les essais à concentration unique, il faut prévoir ≥ 5 *réplicats* (c.-à-d. des échantillons prélevés sur le terrain ou des échantillons distincts extraits d'un carottier ou d'une benne) par *station d'échantillonnage* et par station de référence (EC, 1992a, 1994, 1997a; USEPA, 1994a, 2000). Ces échantillons constituent un seul *réplicat* aux fins des essais toxicologiques avec *H. azteca* (en d'autres termes, on utilise un seul récipient d'essai par réplicat; v. 5.1)³⁴. Pour les essais à concentrations multiples (p. ex., essai sur un sédiment enrichi et essai dans l'eau seulement; v. 6.2 et 7.3, respectivement), il faut prévoir ≥ 5 récipients de répétition (ou réplicats de laboratoire) par *traitement*³⁵. Dans tous les essais, il faut aussi prévoir ≥ 5 récipients de répétitions (ou réplicats de laboratoire) du sédiment témoin. On devrait lisser le sédiment transféré dans chaque récipient d'essai à la spatule ou en frappant légèrement la paroi du récipient du tranchant de la main. On verse ensuite l'eau d'essai (v. 3.4) doucement le long de la paroi du bécher ou du bocal. Afin de perturber le moins possible le sédiment, on peut placer sur sa surface, avant de verser l'eau, un disque de Téflon^{MC}, de polyéthylène ou de nylon, découpé aux dimensions intérieures du récipient d'essai³⁶ (EC, 1992a). On devrait alors ajouter dans le récipient un volume d'eau d'essai (ou de solution d'essai, selon la nature

de l'essai) afin que le ratio sédiment-eau soit de 1:1,75 (p. ex., 100 mL de sédiment pour 175 mL d'eau), soit de 1:4 (100 mL de sédiment pour 400 mL d'eau); on peut se faire une idée du volume d'eau à ajouter en faisant sur la paroi du récipient une marque à la hauteur correspondant au volume total requis (p. ex., 275 ou 500 mL). On peut d'abord ajouter un plus petit volume d'eau d'essai (p. ex., 125-145 mL) afin de disposer d'un peu d'espace pour l'addition d'eau au moment du transfert des organismes. Dans le cas d'applications spéciales (p. ex., un site donné ou une recherche), l'expérimentateur pourrait souhaiter utiliser un ratio sédiment-eau plus élevé (soit 1:67) afin que l'exposition puisse se dérouler en conditions statiques. Un tel ratio conviendrait, en particulier, lorsque les caractéristiques chimiques de l'eau sus-jacente doivent être plus stables, comme pour des essais à long terme (p. ex., 28 ou 42 jours), dont des essais sur la bioaccumulation ou la reproduction³⁷.

³⁴ Dans la version précédente de SPE 1/RM/33, ≥ 5 récipients de répétition (ou réplicats de laboratoire) étaient exigés pour les essais à concentration unique sur un sédiment prélevé sur le terrain (v. 5.1).

³⁵ L'USEPA (1994, 2000) exige ≥ 4 récipients de répétition par traitement et en recommande 8 par traitement pour les essais toxicologiques sur un sédiment.

³⁶ Pour faciliter la récupération du disque, on peut y attacher une longueur suffisante de monofilament de nylon (ou d'un matériau équivalent non toxique). On peut aussi découper le disque à même un sac de polyéthylène en lui donnant la forme d'un trou de serrure. La languette rattachée au cercle permet sa récupération. On devrait rincer le disque à l'eau d'essai si on le réutilise pour préparer les répétitions des traitements. On devrait prévoir un disque distinct pour chaque traitement.

³⁷ On pourrait employer des ratios sédiment-eau plus élevés à des fins particulières (p. ex., pour des applications à un site donné ou à une recherche). L'INRE a mis au point la « méthode du cône », qui prévoit un ratio sédiment-eau de 1:67, afin de surmonter les difficultés connexes à une eau sus-jacente aux caractéristiques particulièrement instables (Borgmann et Norwood, 1999), et cette méthode a été utilisée largement dans des essais de 4 semaines sur la survie et la croissance d'organismes expérimentaux (Borgmann et coll., 2001a, 2001b, 2004; Norwood et coll., 2009). Elle a aussi été appliquée dans des essais sur la bioaccumulation (Borgmann et Norwood, 2002; Borgmann et coll., 2004; Nowierski et coll., 2005), de même que dans des essais de 8-10 semaines sur la reproduction dans un sédiment, en conditions statiques (Borgmann, 2002; Bartlett et coll., 2004; Bartlett et Brown, 2011). Lorsqu'on utilise un ratio sédiment-eau plus élevé (c.-à-d. 1:67, ce qui correspond à 15 mL de sédiment et 1000 mL d'eau sus-jacente) dans un cône à sédimentation d'Imhoff (récipient de 1 L en polycarbonate ou en verre, en forme d'entonnoir, qui sert habituellement à mesurer le volume de solides en suspension), on n'a plus besoin de renouveler l'eau sus-jacente à cause de son volume même, et la forme du cône assure le maintien d'une épaisseur raisonnable de sédiment (~2,3 cm). Cette méthode est décrite en détail dans Borgmann et Norwood (1999), Borgmann (2002) et Borgmann et coll. (2005a).

Dans un essai à renouvellement intermittent, on doit renouveler l'eau recouvrant le sédiment (de référence, d'essai et témoin du laboratoire) de chaque récipient d'essai ≥ 3 fois par semaine en des journées non consécutives, tout au long de l'essai (soit 6 fois pendant un essai de 14 jours), par l'ajout de 2 volumes d'eau sur 24 h³⁸. On devrait éviter un taux de renouvellement supérieur à ce volume afin de prévenir l'entraînement et la dilution inutiles des contaminants du sédiment par leur lixiviation dans l'eau sus-jacente. On peut renouveler cette dernière manuellement ou à l'aide d'un appareil assurant un renouvellement automatique et à heures fixes dans chaque récipient d'essai, à un débit approprié (v. 3.1). Si on utilise un système automatisé, on devrait l'étalonner avant l'essai afin d'en vérifier le rendement; d'un récipient d'essai à un autre, le débit ne devrait jamais différer de $>10\%$ au cours de l'essai (USEPA, 1994a, 2000; ASTM, 1995a, 2010). Si on renouvelle l'eau sus-jacente par siphonnement, on devrait veiller à ne pas perturber le sédiment ou à ne pas perdre accidentellement d'amphipodes sortis du sédiment au cours de l'opération. On ne devrait pas siphonner et remplacer $>90\%$ de l'eau, et l'extrémité du tube ne doit pas toucher le sédiment.

Il faudrait aérer l'eau sus-jacente de chaque récipient d'essai pendant la nuit précédant le transfert des organismes et poursuivre l'aération pendant tout l'essai (v. 4.3). On devrait couvrir chaque béccher ou bocal (avec un verre de montre ou un couvercle en plastique) avant et pendant l'essai, afin de réduire au minimum l'évaporation de l'eau et le risque de contamination. Le jour 7 de l'essai (ou auparavant/plus souvent si on le souhaite ou si c'est nécessaire), toute eau sus-jacente perdue par évaporation devrait être remplacée par l'ajout d'eau d'essai dont on aura ajusté la température et qu'on laissera couler lentement le

long de la paroi du récipient. Une marque sur la paroi du récipient (p. ex., à hauteur de 275 mL) facilitera l'évaluation du volume à ajouter.

L'essai est mis en route avec des organismes expérimentaux âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours (écart recommandé : ≤ 2 jours) (v. 2.3). Souvent, mais pas obligatoirement, l'eau d'élevage sert d'eau sus-jacente. Les objectifs d'un essai donné peuvent exiger l'utilisation d'une eau d'essai autre que l'eau d'élevage (p. ex., celle du lieu à l'étude). Dans un tel cas, il n'est pas nécessaire d'*acclimater* les organismes (USEPA, 1994a, 2000), bien que cela puisse être conseillé afin de réduire au minimum le stress causé par une eau dont les caractéristiques sont différentes. S'il faut acclimater les organismes, on peut procéder comme suit : maintien pendant 2 h dans un mélange à 50/50 d'eau d'élevage et d'eau d'essai, puis 2 h dans un mélange à 25/75 et, enfin, 2 h dans l'eau d'essai seulement, avant le transfert des amphipodes dans les récipients d'essai (Ingersoll et Nelson, 1990). Une autre méthode utile consiste à siphonner 20-30 % de l'eau d'élevage toutes les 2-3 h et à remplacer ce volume par de l'eau d'essai, tout en s'assurant que la température reste constante pendant ce temps. L'acclimatation devrait se faire la veille (jour -1) de la mise en route de l'essai.

Si on prévoit mener des essais sur un sédiment estuarien, il est recommandé d'acclimater graduellement les organismes à une eau estuarienne de salinité semblable à celle de l'*eau de porosité* du sédiment d'essai. On pourrait aussi inclure dans l'étude des témoins supplémentaires, c'est-à-dire un sédiment témoin dont l'eau de porosité possède une salinité semblable à celle du sédiment d'essai.

Le jour 0, on répartit au hasard 10 amphipodes par récipient d'essai. On devrait les manipuler le moins possible et avec le plus grand soin (v. 2.3.9) au cours du transfert (v. 2.3.10). Il faut les relâcher dans l'eau sus-jacente, c'est-à-dire

³⁸ Ce taux correspond à celui recommandé dans USEPA (1994, 2000).

sous l'interface air-eau. On peut les transférer directement à la pipette de l'enceinte d'élevage à l'eau sus-jacente de chaque récipient d'essai (Ankley et coll., 1993a). On peut aussi compter 10 amphipodes qu'on place dans un récipient de transfert (p. ex., un gobelet en plastique de 30 mL) rempli d'eau d'essai à la température d'essai également, puis on les compte de nouveau avant leur transfert dans l'eau sus-jacente (Ingersoll et Nelson, 1990; USEPA, 1994a, 2000). Cette façon de faire est particulièrement utile puisqu'elle permet de compter 2 fois les organismes transférés dans le récipient d'essai. Après le transfert, on devrait augmenter au besoin le volume d'eau sus-jacente jusqu'à la marque (p. ex., 275 mL) inscrite sur la paroi du récipient.

4.2 Conditions d'essai

- L'essai mesure la toxicité d'un sédiment entier. L'eau sus-jacente n'est habituellement pas renouvelée, mais on peut en ajouter périodiquement pour compenser les pertes dues à l'évaporation (en d'autres termes, l'essai se déroule en conditions statiques). Toutefois, si la qualité de l'eau d'essai recouvrant un sédiment de référence se dégrade (hausse de la teneur en ammoniac, dérive du pH et/ou baisse de la teneur en OD), et si les objectifs de l'essai prévoient l'exclusion de ces facteurs confusionnels de la mesure de la réponse globale des organismes expérimentaux, il faut renouveler la solution d'essai ≥ 3 fois par semaine en des journées non consécutives, par l'ajout de 2 volumes d'eau sur 24 h (l'essai devient donc un essai à renouvellement intermittent).
- L'essai dure normalement 14 jours³⁹.
- L'essai doit se dérouler à une température moyenne quotidienne (de l'eau sus-jacente) de 23 ± 1 °C. En outre, la température instantanée doit être de 23 ± 3 °C (USEPA, 1994a, 2000; ASTM, 1995a, 2010).
- Les récipients d'essai doivent être en verre. On recommande d'utiliser des béciers ou des bocaux de forme haute, d'une capacité de 300 mL et d'un diamètre intérieur de ≥ 7 cm.
- Les sédiments témoins et d'essai doivent former une couche uniforme et être recouverts d'eau. Le ratio sédiment-eau standard est de 1:1,75 (soit 100 mL de sédiment et 175 mL d'eau sus-jacente), mais on peut utiliser un ratio de 1:4 (p. ex., 100 mL de sédiment et 400 mL d'eau sus-jacente) si on a besoin d'un plus grand volume d'eau sus-jacente pour les analyses chimiques. Le sédiment doit avoir ≥ 2 cm d'épaisseur.
- On devrait couvrir les récipients d'essai⁴⁰.
- Il convient d'aérer en continu l'eau sus-jacente de chaque récipient d'essai, à un débit minimal (v. 4.3). Pendant toute la durée de l'essai, on doit nourrir les organismes de chaque récipient d'essai, soit 3 fois par semaine (en des journées non consécutives), soit quotidiennement (v. 4.4).
- Les récipients d'essai sont exposés à une photopériode de 16 h, fournie par un éclairage vertical en spectre continu (fluorescent ou l'équivalent). L'intensité lumineuse à la surface de l'eau devrait être de 500-1000 lux.

³⁹ Voir la note de bas de page n° 28.

⁴⁰ Dans le cas des essais avec renouvellement de l'eau sus-jacente, on devrait couvrir les récipients d'essai afin de réduire au minimum la perte de substances volatiles du sédiment ou pour réduire le risque de contamination.

- Pour que l'essai soit valide, le taux moyen de survie des amphipodes dans le sédiment témoin doit être de $\geq 80\%$ à la fin de l'essai. En outre, le poids sec minimal de chaque amphipode des groupes témoins des répétitions doit être en moyenne de $\geq 0,1$ mg à la fin de l'essai (jour 14)⁴¹.

4.3 Oxygène dissous et aération

H. azteca peut tolérer des conditions hypoxiques (v. 1.4). La teneur en OD de l'eau sus-jacente de tous les récipients d'essai, y compris les témoins, devrait être maintenue à 40-100 % de la valeur de saturation. On devrait aérer en continu l'eau sus-jacente de chaque récipient d'essai à compter de la nuit précédant le début de l'essai (v. 4.1), de même que pendant l'essai. Pour ce faire, on devrait distribuer dans chaque récipient d'essai de l'air comprimé préalablement filtré pour qu'il soit exempt d'huile, au moyen d'une conduite d'air et d'un tube jetable en plastique ou en verre (p. ex., tube capillaire ou pipette munie d'une pointe Eppendorf) à petite ouverture (p. ex., 0,5 mm de diamètre intérieur). L'extrémité du tube d'où sort l'air devrait être à ~ 3 cm au-dessus de la surface du sédiment. L'aération de chaque enceinte doit être modérée et régulée (p. ex., 2-3 bulles/s) et elle ne devrait pas perturber la surface du sédiment (Zumwalt et coll., 1994). Pendant toute la durée de l'essai, on devrait vérifier régulièrement (p. ex., tous les jours) le débit d'air vers chaque récipient d'essai et le rajuster au besoin pour qu'il reste modéré. Toute aération du milieu doit être consignée dans le rapport d'essai (section 8).

⁴¹ D'après un examen des données sur le poids sec de groupes témoins de *H. azteca* soumis à des essais de 14 jours en conditions statiques ou à renouvellement intermittent, Milani et coll. (1996) concluent que le critère de validité de $\geq 0,1$ mg par organisme serait normalement réaliste et sensible pour cette espèce. C'est pourquoi ils recommandent ce critère, quelle que soit l'option retenue.

4.4 Alimentation

On doit nourrir les organismes pendant tout l'essai, soit quotidiennement, soit 3 fois par semaine (en des journées non consécutives). Comme le poids sec des amphipodes est un paramètre essentiel, il faut distribuer dans chaque récipient d'essai une ration identique à chaque repas. Cette ration doit permettre des taux de survie et de croissance acceptables de *H. azteca* pendant l'essai (v. 4.2), sans être trop généreuse⁴².

On nourrit les amphipodes selon une des trois options suivantes : 1) mélange aqueux de LCT (v. annexe H); 2) flocons finement moulus d'aliments pour poissons (du commerce) (p. ex., Nutrafin®, Tetrafin®, TetraMin® ou Zeigler® Aquatox Feed); 3) mélange à 50/50 de LCT et de flocons finement moulus d'aliments pour poissons⁴³. Si on choisit de nourrir les

⁴² L'alimentation est essentielle pour assurer un taux de survie convenable ($\geq 80\%$) et une croissance acceptable des organismes (Ankley et coll., 1993a, 1994; Milani et coll., 1996). Il faut éviter une nourriture trop généreuse ou l'ajout de types d'aliments autres que ceux prévus ici, étant donné que cela pourrait modifier la biodisponibilité des contaminants du sédiment et/ou favoriser la croissance de champignons microscopiques ou de bactéries à la surface du sédiment (USEPA, 1994a, 2000).

⁴³ Il a été démontré que ces types d'aliments et les rations recommandées convenaient à *H. azteca* dans les conditions d'essai définies (Borgmann et coll., 1989; INRE, 1992; Ankley et coll., 1993a; 1994; USEPA, 1994a, 2000; ASTM, 1995a, 2010; Milani et coll., 1996; Hockett et coll., 2011; P. Jackman, LEEA, comm. pers., 2012). D'autres types d'aliments et d'autres rations, notamment les régimes mono-alimentaires pour lapin (Ingersoll et Nelson, 1990; ASTM, 1991a, 1993) ou les régimes mixtes à base d'algues et de luzerne plus des flocons d'aliments pour poissons, notamment, ont donné un taux de survie convenable ($\geq 80\%$) et un taux de croissance acceptable chez les animaux témoins en regard des conditions et modes opératoires précisés pour l'essai. Toutefois, il n'est pas recommandé d'employer d'autres aliments ou rations que ceux précisés ici [c.-à-d. LCT et/ou flocons d'aliments pour poissons, à raison de 2,7 mg (poids sec) par récipient d'essai et par repas, quotidiennement, ou à raison de 6,3 mg (poids sec) par récipient d'essai et par repas, 3 fois par semaine], car cela pourrait modifier la biodisponibilité des contaminants et

amphipodes quotidiennement, il faut, du jour 0 jusqu'à la fin de l'essai, distribuer dans chaque récipient d'essai 2,7 mg (poids sec) d'aliments ou l'équivalent (c.-à-d. 2,7 mg de flocons moulus d'aliments pour poissons, un inoculum de ~1,5 mL de LCT ou 0,75 mL de LCT combiné à 1,35 mg de flocons d'aliments pour poisson dans le cas du mélange à 50/50 de LCT et d'aliments pour poissons). Si on choisit 3 repas par semaine, il faut ajouter, à compter du jour 0 jusqu'à la fin de l'essai, en des journées non consécutives (p. ex., le lundi, le mercredi et le vendredi), 6,3 mg (poids sec) d'aliments ou l'équivalent (c.-à-d. 6,3 mg de flocons d'aliments pour poissons, un inoculum de ~3,5 mL de LCT ou 1,75 mL de LCT combiné à 3,15 mg de flocons d'aliments pour poissons dans le cas du mélange à 50/50 de LCT et d'aliments pour poissons). Les amphipodes ne sont pas nourris la dernière journée (jour 14) de l'essai. Les deux rations représentent la même quantité globale de nourriture, soit 18,9 mg d'aliments secs (l'équivalent de ~10,5 mL de LCT, ou un mélange de 5,25 mL de LCT et 9,45 mg d'aliments secs dans le cas du mélange à 50/50) par semaine et par récipient d'essai. La ration quotidienne est préférable parce qu'elle permet de répartir également la nourriture disponible, mais on pourrait privilégier les 3 rations par semaine afin de réduire au minimum le travail de fin de semaine (Milani et coll., 1996)⁴⁴.

nuire à la normalisation des conditions d'essai. Il faudrait mouliner finement les flocons (à l'aide d'un mortier et d'un pilon) et les passer dans un tamis à mailles de 500-700 µm) afin de s'assurer que les organismes peuvent les ingérer et que leur taille est uniforme. On peut préparer les aliments sous forme de bouillie aqueuse (p. ex., 2,7 mg dans 1,5 mL d'eau, ou 1,35 mg mélangé avec 0,75 mL de LCT pour inoculer chaque récipient d'essai quotidiennement) ou les répandre sur la surface de l'eau de chaque récipient d'essai. Si les aliments restent en surface, les amphipodes n'y ont pas accès; il faut donc bien vérifier que les aliments s'enfoncent jusqu'au fond du récipient. V. l'annexe H pour la préparation du mélange de LCT.

⁴⁴ Des expériences parallèles de 14 jours avec les deux régimes ont montré que la survie et la croissance (poids

À chaque repas, on devrait prendre des notes détaillées sur le type d'aliment et la ration distribuée dans chaque récipient d'essai. On devrait aussi consigner simultanément l'aspect de la surface du sédiment (c.-à-d. tout signe d'une croissance bactérienne ou fongique).

4.5 Observations et mesures pendant l'essai

Selon les objectifs de l'étude, il pourrait être indiqué de vérifier régulièrement chaque récipient d'essai (de préférence quotidiennement) pour observer et consigner le nombre d'amphipodes qui nagent dans l'eau sus-jacente, flottent à sa surface, se tiennent à la surface du sédiment ou s'y nourrissent⁴⁵. On devrait pousser délicatement tout animal flottant à la surface de l'eau vers le fond, à l'aide d'une tige ou d'une pipette en verre.

Il faut mesurer la température de l'eau sus-jacente au début de l'essai et, par la suite, ≥3 fois par semaine en des journées non consécutives (p. ex., le lundi, le mercredi et le vendredi) jusqu'à la fin de l'essai. Ces mesures doivent se faire dans au moins un récipient d'essai représentant chaque *traitement*; il est toutefois recommandé de procéder à des mesures plus fréquentes (c.-à-d. tous les jours). En outre, il est conseillé d'enregistrer en continu la température d'un bain d'eau et/ou de l'air d'une pièce ou d'une enceinte à température contrôlée.

sec à la fin de l'essai) de *H. azteca* ne diffèrent pas significativement d'un régime à un autre, tant en conditions statiques qu'avec renouvellement intermittent de l'eau sus-jacente (Milani et coll., 1996; MESI, 2010).

⁴⁵ Le nombre d'amphipodes sortis du sédiment peut faciliter l'évaluation du comportement d'évitement. Toutefois, ces observations ne valent pas nécessairement la peine puisque *H. azteca* est un amphipode épibentique qui sort souvent d'un sédiment non contaminé, et elles ne sont pas exigées dans la présente méthode.

On doit mesurer au début de l'essai et, par la suite, ≥ 3 fois par semaine, en des journées non consécutives (p. ex., le lundi, le mercredi et le vendredi), jusqu'à la fin de l'essai, la teneur en OD de l'eau sus-jacente d'au moins un récipient d'essai représentant chaque traitement. Des mesures plus fréquentes (p. ex., quotidiennes; ASTM, 1995a, 2010) seraient indiquées et pourraient être justifiées pour les sédiments présentant une forte demande en oxygène. On recommande d'employer à cette fin une sonde d'oxygéno-mètre étalonnée. On doit examiner soigneusement la sonde après chaque lecture pour s'assurer qu'aucun organisme n'y adhère, et il faut la rincer à l'eau désionisée ou distillée avant de la plonger dans un autre échantillon afin de réduire au minimum le risque de contamination croisée. Si les béciers ou les bocaux sont aérés au cours de l'essai (v. 4.3), il faudrait vérifier fréquemment et régulièrement la position de l'extrémité de la pipette dans chacun ainsi que le débit d'aération, puis effectuer les ajustements nécessaires.

Pour chaque sédiment de référence, il faut mesurer la teneur en ammoniac et le pH de l'eau sus-jacente au début de l'essai, puis ≥ 3 fois par semaine en des journées non consécutives (p. ex., le lundi, le mercredi et le vendredi), jusqu'à la fin de l'essai. Des mesures plus fréquentes (p. ex., quotidiennes) pourraient être indiquées et seraient justifiées dans le cas d'un sédiment de référence associé à de fortes teneurs en ammoniac et/ou à des variations rapides du pH de l'eau sus-jacente⁴⁶. Pour tous les autres traitements (c.-à-d. au moins un récipient d'essai

⁴⁶ La mesure de la teneur en ammoniac et du pH des échantillons d'un sédiment de référence permet de surveiller tout changement de la qualité de l'eau sus-jacente. Il faut passer à un renouvellement intermittent si la qualité de l'eau sus-jacente de tout sédiment de référence se dégrade à cause d'une teneur élevée en ammoniac et/ou d'une dérive du pH et si les objectifs de l'essai sont l'évaluation d'un effet toxique à l'exclusion des effets confusionnels associés à la dégradation de la qualité de l'eau. C'est pour cette même raison qu'on doit surveiller plus fréquemment la teneur en OD de l'eau sus-jacente.

représentant chaque traitement ou répétition, y compris le sédiment de référence), il faut mesurer la teneur en ammoniac et le pH de l'eau sus-jacente au début et à la fin de l'essai. Pour chaque mesure de la teneur en ammoniac (v. APHA et coll., 2005), il faudrait calculer la concentration d'ammoniac non ionisé en tenant compte des valeurs concomitantes du pH et de la température de l'eau sus-jacente (Trussell, 1972; USEPA, 1985c, 1999; EC, 2008).

Dans le cas des essais à renouvellement intermittent, il est indiqué de mesurer la qualité de l'eau au début et à la fin de chaque période de renouvellement, tant dans l'eau sus-jacente fraîche que dans l'eau usée, juste avant ou juste après le renouvellement.

Il faut mesurer, au début et à la fin de l'essai, la *conductivité* de l'eau sus-jacente d'au moins un récipient d'essai représentant chaque traitement. Il convient de procéder de la même façon quant à la dureté et/ou à l'alcalinité de l'eau (USEPA, 1994a, 2000). On peut mesurer la conductivité et le pH à l'aide d'une sonde et d'un appareil étalonné. On pourra doser l'ammoniac au moyen d'une électrode spécifique à l'ion ou par prélèvement d'une aliquote d'eau sus-jacente aux fins de l'analyse. Comme dans le cas des mesures de l'OD, on doit examiner soigneusement la sonde immédiatement après chaque lecture et la rincer à l'eau désionisée avant de la plonger dans un autre récipient d'essai. Pour les mesures de la dureté, de l'alcalinité et de la teneur en ammoniac, qui exigent des aliquotes d'échantillons, on devrait prélever celles-ci dans les récipients de répétition supplémentaires prévus à des fins de surveillance ou directement à même les récipients d'essai, immédiatement avant le transfert des organismes et à la fin de l'essai⁴⁷.

⁴⁷ Lorsque le ratio sédiment-eau est de 1:1,75, il pourrait être nécessaire de regrouper les échantillons d'eau provenant de chaque récipient de répétition ou de prévoir des répétitions supplémentaires afin d'obtenir un volume d'eau adéquat pour les mesures. On peut aussi utiliser un

Pour ces mesures, on ne devrait pas prélever >10 % du volume d'eau sus-jacente d'un récipient d'essai (c.-à-d. $\leq 17,5$ mL pour un volume d'eau sus-jacente de 175 mL ou ≤ 40 mL pour un volume de 400 mL). On devrait utiliser une pipette pour prélever soigneusement l'eau à ~1-2 cm au-dessus de la surface du sédiment. Il convient de vérifier la pipette pour s'assurer qu'on n'a aspiré aucun amphipode au cours du prélèvement.

Les mesures de la qualité de l'eau de chaque traitement, effectuées au début et à la fin de l'essai, donnent une indication de l'influence du sédiment sur la qualité de l'eau qui le recouvre. Si, dans un traitement, on observe une variation marquée (p. ex., >50 %; USEPA, 1994a, 2000) d'au moins un paramètre de qualité de l'eau, entre les mesures initiale et finale, il est recommandé de vérifier les conditions et modes opératoires propres à l'essai (p. ex., avec ou sans renouvellement de l'eau sus-jacente et fréquence du renouvellement de cette eau, le cas échéant) et d'examiner soigneusement les caractéristiques physicochimiques du sédiment utilisé⁴⁸.

4.6 Fin de l'essai

L'essai prend fin après 14 jours. Immédiatement avant de tamiser le contenu d'un récipient d'essai, il faudrait récupérer à la pipette tous les amphipodes vivants et apparemment morts qui se trouvent dans la colonne d'eau ou à la surface du sédiment. Les animaux complètement inactifs mais qui ne semblent pas morts (p. ex., ils ne sont pas en état de décomposition) devraient être placés dans une boîte de Petri ou

un récipient convenable renfermant de l'eau d'essai, puis être examinés de près au microscope de faible puissance ou à la loupe. On devrait les pousser délicatement du bout d'une pointe fine pour confirmer l'absence de signe de vie (p. ex., aucune contraction des pléopodes) et les compter au nombre des amphipodes morts.

On devrait consigner le nombre de *H. azteca* morts et survivants. On devrait éliminer les premiers et transférer les deuxièmes dans une nacelle de pesée numérotée ou tout autre petit récipient renfermant assez d'eau d'essai pour qu'on puisse y rincer les amphipodes et les y garder brièvement, c'est-à-dire jusqu'à ce que tous les survivants aient été récupérés par tamisage du sédiment des récipients d'essai.

Le temps consacré au tamisage et à l'examen de tous les organismes vivants ou morts devrait être le même d'un récipient à un autre. Pour qu'on puisse s'assurer que la procédure de récupération des amphipodes est adéquate, les personnes chargées du tamisage devraient avoir montré leur capacité de récupérer d'un sédiment ≥ 90 % des *H. azteca* de taille semblable, en moyenne⁴⁹.

Il est recommandé d'employer la technique suivante, tirée de USEPA (1994a, 2000), pour tamiser le contenu de chaque récipient d'essai. On peut se servir d'autres techniques ou de tamis d'un maillage différent, à la condition qu'on ait démontré lors d'essais préliminaires qu'ils permettaient la récupération des organismes⁵⁰.

ratio sédiment-eau de 1:4 afin de disposer d'un plus grand volume d'eau sus-jacente pour les analyses chimiques.

⁴⁸ Si on utilise un système automatisé de renouvellement (v. 3.1 et 4.1), on devrait en surveiller le fonctionnement quotidiennement. Si on constate des problèmes d'écoulement ou un débordement dans les récipients d'essai parce que les crépines de vidange sont encrassées, on devrait immédiatement nettoyer le système ou procéder à son entretien.

⁴⁹ L'USEPA (1994a, 2000) recommande d'évaluer la capacité de récupérer les organismes par la méthode de Tomasovic et coll. (1995) : on transfère des organismes dans un sédiment témoin et on détermine le nombre récupéré après 1 h à l'aide de la technique de tamisage du contenu des récipients qui sera utilisée à la fin de l'essai.

⁵⁰ On peut remplacer le tamisage par la méthode suivante : placer le sédiment dans l'angle d'un bac translucide peu profond déposé sur une table lumineuse; incliner le bac et, par lavage au moyen d'un flacon laveur rempli d'eau

- 1) Passer environ la moitié de l'eau surnageante au tamis américain standard n° 50 (mailles de 300 µm);
- 2) faire tourbillonner ce qui reste d'eau pour mettre en suspension ~1 cm de la partie supérieure du sédiment, passer la suspension au tamis n° 50 puis, avec de l'eau d'essai, entraîner le refus du tamis dans un bac ou bassin blanc d'examen;
- 3) à l'aide d'un flacon laveur rempli d'eau d'essai, rincer les grosses particules de sédiment toujours présentes dans le récipient d'essai en leur faisant traverser un tamis n° 40 (mailles de 425 µm) et, avec la même eau, entraîner le refus du tamis dans un deuxième bac ou bassin d'examen.

On compte tous les animaux vivants récupérés de l'eau sus-jacente ou du sédiment de chaque récipient d'essai, puis on les regroupe dans une nacelle de pesée numérotée ou un petit récipient semblable et on les rince à l'eau d'essai afin de déloger tout sédiment adhérent aux carapaces. Le rinçage devrait être bref et avoir lieu ≤ 10 min après l'introduction du premier amphipode. Après le rinçage, on devrait transférer les amphipodes survivants dans une nacelle à pesée propre en aluminium, qui aura été numérotée, tarée et gardée au dessiccateur⁵¹.

Les nacelles sont mises à sécher au four pendant 24 h, à 60 °C, chacune renfermant les amphipodes survivants d'un récipient d'essai (de répétition) (INRE, 1992). Dès leur sortie du four, les nacelles sont transférées dans un dessiccateur. Après refroidissement, elles devraient être retirées une à une, au hasard, et

d'essai, entraîner les particules de sédiment vers le bas afin d'exposer et de dénombrer les amphipodes (U. Borgmann, INRE, comm. pers., 1994).

⁵¹ Il pourrait être indiqué de faire sécher les nacelles au four, pendant ≥ 48 h, jusqu'à poids constant, étant donné que les dépôts cireux associés aux nacelles risquent de provoquer des erreurs de pesée [G. Ankley, USEPA, Duluth (MN), comm. pers., 1994].

pesées immédiatement⁵² sur une balance permettant des mesures fiables jusqu'à 10 µg. On calcule pour chaque groupe la masse sèche moyenne de chaque amphipode survivant⁵³ (v. 4.7).

Au cours de ces mesures, on devrait remettre au dessiccateur la première nacelle pesée et la peser de nouveau à la fin de l'exercice pour déterminer le gain d'eau des autres nacelles qui se trouvaient au dessiccateur. Ce gain ne devrait pas être de >5 %; si cette valeur est dépassée, on pourrait sécher les nacelles pendant encore ≥ 2 h, puis les peser de nouveau. On devrait tarer,

⁵² Comme les amphipodes séchés peuvent absorber facilement la vapeur d'eau, on devrait peser chaque nacelle rapidement en observant le même temps de pesée pour chacune. Il faut néanmoins procéder avec soin du fait que la précipitation des gestes et l'électricité statique peuvent entraîner la perte de spécimens.

⁵³ On a déjà utilisé la longueur du corps de chaque amphipode survivant à la fin de l'essai pour mesurer la croissance des organismes au terme d'essais toxicologiques sur un sédiment avec *H. azteca* (v. tableau E.9 de l'annexe E). L'USEPA (1994a, 2000) autorise les déterminations fondées soit sur le poids sec, soit sur la longueur du corps comme paramètres de croissance. Dans la présente méthode, c'est le poids sec qui est recommandé comme indicateur de croissance. La mesure de la longueur du corps possède un avantage sur la mesure du poids sec : on peut préserver les spécimens pour des analyses ultérieures (USEPA, 1994a, 2000), et les données sur les sujets peuvent servir tant à l'analyse de la variance (ANOVA) à plusieurs critères de classification qu'à l'évaluation de la maturation sexuelle (Kemble et coll., 1994). Dans l'avenir, on pourra utiliser la longueur du corps plutôt que le poids sec, à la condition que des études montrent sans l'ombre d'un doute que c'est un indicateur pour le moins aussi sensible de la croissance. Les résultats que Becker et coll. (1995) ont obtenus apportent une preuve à l'appui de ce qui précède. Dans la méthode d'Environnement Canada décrivant un essai de *survie et de croissance* de têtes-de-boule (EC, 1992c), on calcule la croissance à partir du seul poids sec moyen, sans utiliser la longueur comme critère d'effet, parce que l'augmentation du poids et de l'épaisseur du corps de sujets sains ne se reflète pas adéquatement dans l'accroissement de la longueur du corps pendant l'essai. Un phénomène semblable pourrait toucher *H. azteca* dans l'essai *de survie et de croissance* décrit ici.

sécher et peser quelques nacelles à vide, et les résultats devraient être conformes aux normes de contrôle de la qualité du laboratoire.

4.7 Paramètres et calculs

Les paramètres biologiques de l'essai toxicologique de 14 jours sur un sédiment sont la survie et le poids sec des amphipodes. À la fin de l'essai, on évalue la réduction du taux de survie et/ou du poids par comparaison avec des groupes témoins et/ou de référence (v. 5.6 et 6.5). Le plus sensible de ces deux effets est retenu comme indicateur définitif de la toxicité⁵⁴.

À la fin des 14 jours d'exposition, on consigne le nombre d'amphipodes tant vivants que morts dans chaque récipient de répétition, y compris les groupes témoins. Pour chaque traitement, il faut calculer les deux paramètres suivants :

- le *pourcentage* moyen (\pm ET) d'amphipodes ayant survécu⁵⁵;
- le poids sec moyen (\pm ET) par amphipode survivant, d'après le poids total du groupe de survivants.

On suppose que les amphipodes manquants sont morts et qu'ils se sont décomposés au cours de l'essai. Ils entrent dans le décompte des

⁵⁴ Une solution de rechange, soit l'approche fondée sur la *biomasse*, combine mortalité et poids final (v. 8.2.1 dans EC, 2007). Pour calculer ce paramètre, on divise le poids sec total des amphipodes survivants par le nombre initial d'organismes (normalement 10). À l'heure actuelle, ce paramètre est employé dans les essais sur des larves de têtes-de-boule tant au Canada (EC, 2011) qu'aux États-Unis (USEPA, 2002), mais il n'est pas appliqué couramment dans les essais toxicologiques sur un sédiment.

⁵⁵ Dans le calcul du pourcentage moyen, on suppose que chaque répétition comptait au départ le même nombre d'organismes expérimentaux. Si ce n'est pas le cas (c.-à-d. si le nombre d'organismes variait d'un récipient d'essai à un autre), on devrait calculer la moyenne de la proportion (à savoir une moyenne pondérée).

organismes morts de chaque répétition. On mesure ensuite le poids sec total du groupe de survivants de la répétition.

L'essai est invalide si le pourcentage moyen de survie des amphipodes exposés pendant 14 jours au sédiment témoin est de $<80\%$. Il est également invalide si, à la fin de l'essai, le poids sec moyen des groupes témoins de la répétition est de $<0,1$ mg par amphipode ayant survécu.

Le plus souvent, le plan d'expérience d'un essai type avec *H. azteca* comporte un des deux scénarios suivants :

- 1) Stations d'échantillonnage multiples – dans ce cas, on compare les réponses obtenues pour la ou les stations d'échantillonnage à l'étude avec celles obtenues pour la station d'échantillonnage servant de site de référence⁵⁶, pour d'autres stations d'échantillonnage ou pour le sédiment témoin (c.-à-d. un essai à concentration unique). On a souvent recours à des tests d'hypothèse dans les évaluations statistiques, et le résultat habituel de ces tests est que, d'une station à une autre, la réponse est soit « différente », soit « analogue ».
- 2) Concentrations multiples d'une ou de plus d'une substance ou matière d'intérêt – dans ce cas, on enrichit un sédiment, on mélange un sédiment (ou une matière particulière semblable) d'essai et un sédiment non contaminé ou on soumet des concentrations multiples à un essai toxicologique dans l'eau seulement (v. section 7). Les *paramètres* exigés pour un essai à

⁵⁶ Dans le présent document, un *site de référence* désigne une zone où on trouve un sédiment non contaminé, à l'abri de l'influence du contaminant à l'étude, c'est-à-dire un sédiment de référence. Un tel sédiment doit être prélevé aux fins des comparaisons décrites plus haut dans la présente section. Toutefois, en l'absence d'un sédiment de référence, on peut utiliser un sédiment témoin dans tous les essais décrits ici.

concentrations multiples sont la CL_{50} pour la survie et la CI_p pour le poids sec à la fin de l'essai.

Dans un scénario comportant de multiples stations d'échantillonnage, il est essentiel de bien comprendre les forces de divers plans d'étude pour pouvoir appliquer les tests statistiques d'une manière fructueuse. Il faudrait définir clairement les objectifs de l'étude avant la collecte des données et avoir une idée tant de la puissance (capacité de détecter un effet) du plan d'expérience que de la facilité d'interprétation des résultats. En règle générale, on a intérêt à limiter le nombre de comparaisons à faire. À cette fin, on choisit le plus souvent un plan d'expérience et des tests statistiques comportant des comparaisons entre la station d'échantillonnage à l'étude et une station de référence. La puissance du plan d'expérience se trouvera accrue si on peut supposer l'existence d'un gradient (en d'autres termes, les échantillons sont prélevés dans un ordre séquentiel en aval ou loin de la source ponctuelle de contaminants; v. P.4 dans EC, 2007). Il arrive parfois que les objectifs de l'étude et le plan d'expérience ne reçoivent pas l'attention voulue avant la collecte de données, ce qui amène l'expérimentateur à comparer, en guise de compensation, toutes les stations d'échantillonnage possibles et à maximiser ainsi le nombre de comparaisons. Cette façon de faire est vivement déconseillée, surtout lorsqu'un nombre élevé de stations d'échantillonnage est en cause, car : 1) cela peut avoir des effets indésirables sur les taux d'erreur des types I et II; 2) l'interprétation des résultats devient souvent plus difficile; 3) une attention indue peut être accordée à des comparaisons particulières après la collecte des données⁵⁷.

⁵⁷ Zajdlik (2010) fait observer ce qui suit à la défense de l'application d'un test global d'hypothèse : « Trop souvent, un écart dans les données monopolise l'attention de l'analyste, qui entreprend alors d'appliquer un test statistique afin de "valider" cet écart. C'est ce qu'on appelle une surexploitation des données, et les

On trouvera en 5.6 des indications détaillées sur les tests d'hypothèse applicables au poids sec final (mesure quantitative) et à la mortalité (mesure *quantique*). Les exigences relatives à la CL_{50} et à la CI_p sont décrites en 6.5.

4.8 *Essais avec un ou des toxiques de référence*

Il faut utiliser de façon courante un ou des *toxiques de référence* pour évaluer, dans des conditions d'essai normalisées, la sensibilité relative des élevages de *H. azteca*, de même que la précision et la fiabilité des données recueillies par le laboratoire. Le plus souvent, on effectue, parallèlement aux essais de mesure de la toxicité d'un sédiment en regard de *la survie et de la croissance* de *H. azteca* (v. annexe F), des essais avec un ou des toxiques de référence (ou essais toxicologiques de référence) *dans l'eau seulement*. Il existe, outre les méthodes d'enrichissement des sédiments avec une ou des substances chimiques, des méthodes d'essai toxicologique de référence sur un sédiment enrichi (Burton, 1991; Smith et coll., 1992b; Suedel et coll., 1993a, 1993b; EC, 1995). La mise au point de ces méthodes se poursuit et leur emploi devrait se répandre. Nous recommandons, pour utilisation courante, un essai toxicologique de référence de 96 h, *dans l'eau seulement*, parallèlement aux essais toxicologiques sur un sédiment avec *H. azteca*, une pratique suivie par l'USEPA (1994a, 2000). Un ou plus d'un essai sur un sédiment enrichi avec un ou des toxiques de référence peut compléter ou remplacer cet essai toxicologique de référence, après normalisation des modes opératoires convenables. À cet égard, on devrait consulter le guide d'Environnement Canada sur l'emploi d'un sédiment témoin enrichi (dopé) avec un toxique de référence (EC, 1995).

conclusions fondées sur cette approche analytique sont suspectes. » Ce même problème s'observe dans les plans d'étude mal définis.

Le tableau 3 renferme une liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques de référence de 96 h *dans l'eau seulement*, en conditions statiques, avec *H. azteca*. La procédure prévue, qui présente de nombreux points communs avec la méthode de l'USEPA (1994a, 2000), est assortie des recommandations suivantes : utilisation d'amphipodes âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours au début de l'essai; 10 amphipodes par récipient d'essai; ≥ 5 concentrations plus un témoin (c.-à-d. l'eau témoin/de dilution seulement) et au moins une répétition par traitement; récipients d'essai : béciers ou bocaux en verre de forme haute, d'une capacité de 300 mL et d'un diamètre intérieur de ≥ 7 cm; 200 mL de solution par récipient. Il faut ajouter à chaque récipient d'essai un substrat qui doit être identique pour toutes les solutions d'essai et répétitions d'un essai donné. On peut choisir l'un ou l'autre des substrats suivants : de la gaze

hydrophile de ~ 3 cm², préalablement mise à tremper dans l'eau d'élevage pendant 24 h; un morceau de ~ 3 cm² de tulle de nylon Nitex® ou de mailles en plastique (p. ex., de 500 μ m)⁵⁸; une couche mince (1-2 mm d'épaisseur; ~ 5 mL pour les récipients en verre de forme haute de 300 mL) de sable siliceux non contaminé (v. la note de bas de page n° 27). Au cours de l'essai, on n'aère pas les solutions, et les récipients d'essai sont normalement couverts pour réduire au minimum la contamination et les pertes dues à l'évaporation. Dans les essais toxicologiques de référence, on nourrit les amphipodes avec un mélange aqueux de LCT (v. annexe H) ou avec un mélange à 50/50 de LCT et de flocons finement moulus d'aliments pour poissons (du commerce) (p. ex., Nutrafin®, Tetrafin®, TetraMin® ou Zeigler® Aquatox Feed). Il est recommandé de distribuer une ration équivalant à 0,9 mg (poids sec) d'aliments (c.-à-d. un inoculum de $\sim 0,5$ mL de LCT, ou 0,25 mL de

⁵⁸ Certaines substances chimiques (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques) pouvant facilement être adsorbées sur le tulle de nylon, il faut tenir compte des toxiques suspectés (ou connus) au moment du choix du substrat à utiliser pour les essais dans l'eau seulement.

Tableau 3. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques de référence dans l'eau seulement avec *H. azteca*

Type d'essai	– essai toxicologique de 96 h dans l'eau seulement, en conditions statiques
Toxique de référence	– sulfate de cuivre (CuSO ₄), chlorure de cadmium (CdCl ₂), chlorure de potassium (KCl) ou chlorure de sodium (NaCl)
Fréquence de l'essai	– dans les 14 jours précédant ou suivant la mise en route de l'essai, ou parallèlement à l'essai ou aux essais définitifs sur un sédiment ou dans l'eau seulement; si les amphipodes proviennent d'une source externe, on procède à des essais de tolérance avec des organismes de chaque lot de cette source, en même temps que l'essai définitif
Solutions d'essai	– solution témoin et ≥ 5 concentrations d'essai
Renouvellement des solutions	– aucun
Eau témoin/de dilution	– eau d'élevage ou n'importe quelle eau souterraine ou de surface non contaminée; eau douce reconstituée si on recherche un haut degré de normalisation; eau de mer naturelle ou reconstituée d'une salinité de ≤ 15 ‰ pour les essais sur un sédiment estuarien; teneur en OD de 90-100 % de la valeur de saturation
Amphipodes	– prélevés dans un élevage d'âge connu, âgés de <1-7 jours, gardés et nourris dans un béccher pendant 2 jours avant l'essai; âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours au début de l'essai; 10 amphipodes par récipient d'essai
Substrat	– substrat exigé; doit être identique pour tous les récipients d'essai; choix possibles : gaze hydrophile de ~ 3 cm ² , préalablement mise à tremper dans l'eau d'élevage pendant 24 h; morceau de ~ 3 cm ² de tulle de nylon Nitex® ou de mailles en plastique; couche de 1-2 mm d'épaisseur (ou ~ 5 mL) de sable siliceux non contaminé
Récipient d'essai	– béccher ou bocal en verre; recommandé : capacité de 300 mL, de forme haute et d'un diamètre intérieur de ≥ 7 cm; normalement couvert
Volume de solution d'essai	– 200 mL
Nombre de répétitions	– ≥ 1 répétition par concentration
Température	– moyenne quotidienne : 23 ± 1 °C; instantanée : 23 ± 3 °C
Éclairage	– éclairage vertical, en spectre continu (fluorescent ou l'équivalent); 500-1000 lux; photopériode de 16 h
Aération	– aucune, sauf si la teneur en OD de l'eau sus-jacente chute à <40 % de la valeur de saturation

Alimentation	– suspension aqueuse de LCT ou mélange à 50/50 de LCT et de flocons moulus d'aliments pour poissons (du commerce) (p. ex., Nutrafin®, Tetrafin®, TetraMin® ou Zeigler® Aquatox Feed), équivalant à 0,9 mg (poids sec) distribué dans chaque récipient d'essai les jours 0 et 2 de l'essai
Observations	– chaque jour, dans chaque récipient d'essai, dénombrement des organismes morts et moribonds
Mesures de la qualité de l'eau	– chaque jour, dans chaque traitement, OD et température; au début et à la fin de l'essai, pH, alcalinité, dureté et conductivité dans chaque traitement
Paramètres	– taux moyen de survie, dans chaque traitement; CL ₅₀ 96 h
Validité de l'essai	– résultats de l'essai considérés comme invalides si le taux moyen de survie après 96 h dans l'eau témoin est de <90 %

LCT et 0,45 mg de flocons pour le mélange à 50/50; v. 4.4 et 7.5.3) dans chaque récipient d'essai (y compris les témoins) les jours 0 et 2 de l'essai⁵⁹.

Pour les essais dans l'eau seulement, les exigences en matière de température et d'éclairage sont les mêmes que pour les essais toxicologiques définitifs sur un sédiment (v. 4.2 et tableaux 2 et 3). On observe chaque jour le nombre d'organismes morts ou moribonds dans chaque récipient d'essai. La température et la teneur en OD de chaque récipient d'essai sont mesurées quotidiennement, tandis que le pH, l'alcalinité, la dureté et la conductivité de l'eau le sont au début et à la fin de l'essai (v. 4.5). Les paramètres de l'essai sont le taux moyen de survie dans chaque traitement et la CL₅₀ 96 h. Il faut déclarer invalides les résultats de l'essai

toxicologique de référence si le taux moyen de survie dans l'eau témoin est de <90 % à la fin de l'essai (tableau 3).

Les critères convenant au choix du ou des toxiques de référence pertinents pourraient inclure les suivants (EC, 1990, 1995) :

- facilité d'obtention à l'état pur;
- longue durée de conservation (stabilité);
- possibilité de répartir uniformément la substance dans un substrat non contaminé;
- bonne courbe dose-réponse pour les organismes expérimentaux;
- stabilité de la substance en solution aqueuse;
- dangers minimes pour l'utilisateur;
- facilité de dosage de la substance avec précision;
- influence connue de la qualité de l'eau (p. ex., pH, dureté) sur la toxicité de la substance pour les organismes expérimentaux;

⁵⁹ La première édition de la présente méthode prévoyait une seule ration pour les essais toxicologiques de référence, soit 0,5 mL de LCT. Les nouvelles rations incluses ici risquent d'influer sur la performance globale des organismes expérimentaux. Si tel est le cas, il faut prévoir des cartes de contrôle distinctes pour chaque type d'aliment utilisé dans les essais toxicologiques de référence.

- influence connue des caractéristiques physicochimiques du sédiment (p. ex., granulométrie, teneur en carbone organique) sur la toxicité de la substance pour les organismes expérimentaux.

Il est recommandé d'employer avec *H. azteca* le sulfate de cuivre, le chlorure de cadmium, le chlorure de potassium ou le chlorure de sodium (de qualité réactif dans tous les cas) comme toxiques de référence (USEPA, 1994a, 2000).

Les essais toxicologiques de référence avec l'un et/ou l'autre de ces toxiques doivent être exécutés soit dans les 14 jours précédant ou suivant la mise en route de l'essai toxicologique définitif, soit parallèlement à ce dernier, et on fait appel aux élevages de *H. azteca* du laboratoire. Avant d'utiliser les élevages récemment établis en laboratoire avec de nouveaux géniteurs en vue de produire des organismes expérimentaux, on devrait évaluer leur performance en regard du ou des toxiques de référence (v. 2.3.1 et 2.3.11).

Si le laboratoire utilise des organismes d'une source externe plutôt que ceux issus de ses propres élevages, comme il est recommandé ici (v. 2.2), il doit soumettre une partie des juvéniles de chaque *lot* provenant d'une source externe à des essais de tolérance au toxique de référence (il peut y en avoir plus d'un). Ces essais doivent être exécutés en même temps que l'essai définitif, conformément aux procédures et conditions décrites en 4.8.

Des documents d'Environnement Canada renferment des indications utiles sur le choix, le rendement et l'utilisation d'essais toxicologiques de référence dans l'eau seulement (EC, 1990) ou sur un *sédiment enrichi* (EC, 1995). Il est conseillé au personnel de laboratoire peu au fait de ces essais de consulter ces documents au préalable.

Il incombe au laboratoire de démontrer qu'il peut obtenir des résultats cohérents et précis avec un ou des toxiques de référence, et ce, avant d'exécuter des essais définitifs sur un sédiment avec *H. azteca*. À cette fin, le personnel devrait d'abord déterminer la précision intralaboratoire de ses mesures, exprimée sous forme de CV, en effectuant ≥ 5 essais avec le ou les toxiques de référence et différents groupes de *H. azteca* provenant d'élevages distincts d'âge connu (v. 2.3.10) du laboratoire. Pour ces essais préliminaires, il faudrait utiliser le ou les mêmes toxiques de référence, les mêmes concentrations, la même eau (origine et type) et les mêmes modes opératoires (tableau 3). Les essais courants avec le ou les toxiques de référence devraient être exécutés selon ces mêmes modes opératoires. On devrait choisir une série de concentrations⁶⁰ auxquelles, d'après les essais préliminaires, correspondra une mortalité partielle pour ≥ 2 concentrations et qui permettra de calculer la CL₅₀ 96 h avec un intervalle de confiance dont l'étroitesse est acceptable (v. 6.5).

Dès qu'on dispose de suffisamment de données (EC, 1990 et 1995), on doit porter sur une *carte de contrôle* la CL₅₀ de chaque toxique de référence, dans l'ordre des observations, et déterminer si les résultats se situent à ± 2 ET des résultats d'essais antérieurs avec *H. azteca* et le même toxique et selon des modes opératoires identiques. Il faut préparer et actualiser une carte de contrôle distincte pour chaque toxique de référence utilisé. Sur l'axe vertical, on porte le logarithme de la concentration; sur l'axe horizontal, la date ou le numéro de l'essai correspondant. On doit comparer chaque nouvelle CL₅₀ du toxique de référence aux limites établies sur ce graphique; la CL₅₀ est acceptable si elle est à l'intérieur de la *limite de contrôle de 95 %*.

⁶⁰ V. l'annexe I pour des indications sur la gamme convenable de concentrations à employer. Chaque concentration successive devrait correspondre à ≥ 50 % de la précédente.

Dans tous les calculs de la moyenne et de l'écart type et pour tous les diagrammes, on doit utiliser le logarithme de la concentration (y compris de la CL_{50}). On s'assure ainsi que chaque CL_{50} a été estimée en fonction des logarithmes des concentrations. On peut construire la carte de contrôle en reportant les valeurs logarithmiques de la moyenne ± 2 ET sur du papier graphique à échelle arithmétique, ou en convertissant ces données en valeurs arithmétiques et en portant ces dernières sur l'échelle logarithmique d'un papier semi-logarithmique. Si les CL_{50} n'obéissent pas à une distribution log-normale, il pourrait s'avérer utile d'opter pour une moyenne et un écart type arithmétiques. Pour chaque CL_{50} successive du toxique de référence, on devrait recalculer la *moyenne géométrique* ainsi que les limites de contrôle supérieure et inférieure (± 2 ET) jusqu'à ce que les statistiques se stabilisent (EC, 1990, 1995, 2007). Si une CL_{50} donnée tombe à l'extérieur de ces limites, il convient de mettre en doute la sensibilité des organismes expérimentaux, de même que l'exécution et la précision de l'essai. Étant donné que cette situation peut se produire dans 5 % des cas par le seul jeu du hasard, une

CL_{50} aberrante n'est pas nécessairement un signe de sensibilité anormale d'un élevage ou d'une précision insatisfaisante des données toxicologiques. Ce serait plutôt un avertissement. On devrait vérifier de façon

méthodique l'état de santé de l'élevage (v. 2.3.11), de même que toutes les conditions d'élevage et d'essai. Selon les constatations, on pourrait devoir reprendre l'essai toxicologique de référence, obtenir de nouveaux géniteurs et/ou établir de nouveaux élevages d'*âge connu*, avant d'entreprendre d'autres essais toxicologiques sur un sédiment. Le fait que les résultats obtenus soient tous à l'intérieur des limites de contrôle n'est pas nécessairement un gage de la cohérence des résultats obtenus par le laboratoire. Des données extrêmement variables pour un toxique de référence donné élargiraient les limites de contrôle. Une nouvelle donnée simple pourrait se trouver à l'intérieur des limites, tout en représentant une variation indésirable des résultats de l'essai. Environnement Canada propose comme limite raisonnable un CV de ≤ 30 %, de préférence de ≤ 20 % (EC, 1990).

Section 5

Modes opératoires particuliers applicables aux essais sur un sédiment ou une matière particulaire semblable prélevé sur le terrain

La présente section renferme des instructions particulières relatives au prélèvement sur le terrain d'échantillons de sédiment ou de matière particulaire semblable, à la préparation de ces échantillons et à la mesure de leur toxicité. Ces instructions s'ajoutent aux modes opératoires exposés dans la section 4. Les essais toxicologiques sur ces échantillons doivent être exécutés en conditions statiques ou comporter un renouvellement intermittent (selon la qualité et la stabilité des caractéristiques chimiques de l'eau d'essai recouvrant le sédiment de référence et selon les objectifs de l'essai) (v. section 4). On procédera au renouvellement quotidien de l'eau seulement dans les circonstances particulières décrites dans la section 4, ou encore pour se conformer aux lignes directrices ou exigences réglementaires applicables.

Des indications détaillées sur l'extraction, la manipulation, le transport, l'entreposage et l'analyse des sédiments prélevés sur le terrain sont fournies dans ASTM (1991b, 1995b, 2008), EC (1994) et USEPA (2001). On devrait se conformer aux méthodes décrites dans EC (1994) (en sus de celles que renferme le présent document) pour le prélèvement sur le terrain et la préparation d'échantillons de sédiment destinés à des essais toxicologiques avec *H. azteca*.

5.1 Prélèvement des échantillons

On trouvera dans EC (1994) une synthèse utile du plan d'échantillonnage sur le terrain et des techniques convenant au prélèvement des échantillons. Les études locales sur la toxicité d'un sédiment au moyen d'essais biologiques avec *H. azteca* et/ou d'autres organismes convenables inféodés aux sédiments font souvent partie d'études plus vastes, qui

pourraient englober : une batterie d'essais toxicologiques visant à évaluer la toxicité d'un sédiment entier, d'une eau de porosité ou d'un éluatriat; des mesures de la bioaccumulation des contaminants; des analyses chimiques; des relevés des organismes épifauniques ou endofauniques; la collecte de données géologiques et hydrographiques. On peut améliorer la corrélation statistique et réduire les coûts en prélevant simultanément les échantillons destinés à ces essais, analyses et collectes de données.

On pourrait prélever régulièrement (p. ex., une fois par trimestre, par semestre ou par année), dans un certain nombre de sites et/ou de stations d'échantillonnage, des échantillons de sédiment destinés à l'évaluation d'un effet négatif sur la survie et la croissance de *H. azteca* à des fins de *surveillance* et de vérification de la *conformité*. À l'occasion d'études locales, des échantillons pourraient aussi être prélevés pour établir les limites spatiales (horizontales et verticales) ou temporelles de la qualité des sédiments. On doit échantillonner un ou plusieurs sites pour y prélever un sédiment de référence (présupposé non contaminé) au cours de chaque prélèvement sur le terrain⁶¹.

Le nombre de stations d'échantillonnage du site à l'étude et le nombre de répliqués prélevés par station sont propres à chaque étude. Il faudra, la

⁶¹ Le sédiment de référence est prélevé près du site à l'étude. Idéalement, ses caractéristiques géochimiques sont semblables à celles du sédiment d'essai, mais il est exempt de contaminants d'origine anthropique. Il n'est pas rare que les sites de référence situés à proximité du site à l'étude présentent un certain degré de contamination anthropique. Dans certains cas, un sédiment de référence peut être toxique à cause de ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques naturelles (Burton, 1991).

plupart du temps, faire un compromis entre les contraintes logistiques et pratiques (p. ex., le temps et les coûts) et les considérations statistiques. On devrait consulter EC (1994) au sujet du plan d'échantillonnage.

On doit prélever ≥ 5 répliquats de sédiment sur le terrain (il pourrait aussi s'agir d'échantillons distincts extraits d'un carottier ou d'une benne) par station d'échantillonnage et par station de référence (EC, 1992a, 1994, 1997a; USEPA, 1994a, 2000). Le prélèvement de répliquats⁶² à chaque station d'échantillonnage a pour but de permettre des comparaisons statistiques à l'intérieur d'une station et entre les stations (EC, 2007). En conséquence, on doit mesurer la toxicité, pour *H. azteca*, de chacun des « vrais répliquats » de sédiment en tant que répliquat individuel (en d'autres termes, on utilise un seul récipient d'essai par répliquat)⁶³. Le recours à l'*analyse de puissance* (v. 5.6.4) avec les valeurs des paramètres obtenues dans des essais antérieurs visant le même site ou des sites semblables permettra de déterminer plus facilement s'il est nécessaire de soumettre >5 répliquats à des essais. Dans d'autres

⁶² Un *répliquat* est un échantillon prélevé sur le terrain à une même station d'échantillonnage afin d'obtenir une estimation de l'erreur d'échantillonnage ou pour améliorer la justesse de l'estimation. Lorsqu'un seul échantillon de sédiment est prélevé à une station d'échantillonnage, il est traité comme un répliquat. Les échantillons additionnels provenant de la même station d'échantillonnage sont considérés comme des répliquats supplémentaires – ils sont traités de la même façon, mais entreposés dans des récipients à échantillon distincts (ils ne sont pas regroupés).

⁶³ Les données montrent que les répétitions (répliquats de laboratoire) hiérarchisées des répliquats (échantillons prélevés sur le terrain) ont une incidence minimale sur la puissance d'une analyse (c.-à-d. la capacité de détecter un effet). Cette tendance vaut pour la plupart des ensembles de données (en d'autres termes, plus un plan d'étude est hiérarchisé, plus les répétitions auront d'incidence sur les résultats). Afin d'équilibrer les considérations scientifiques, pratiques et pécuniaires, il n'est plus nécessaire de prévoir des répétitions pour les essais à concentration unique sur un sédiment prélevé sur le terrain.

situations (p. ex., études préliminaires ou études exhaustives sur la répartition spatiale de la toxicité), le plan expérimental pourrait prévoir le prélèvement d'un seul répliquat par station. Cette dernière approche ne permet pas de déterminer la toxicité moyenne à un emplacement donné (une station), mais elle se prête à la comparaison statistique de la toxicité de chaque échantillon avec celle du témoin et, au besoin, entre les échantillons d'essai (stations), au moyen des tests statistiques qui conviennent (v. 5.6.1).

Pour le prélèvement du *sédiment de référence*, il faudrait rechercher des sites où les propriétés géochimiques du sédiment sont semblables à celles du sédiment d'essai. Toutefois, il n'est sans doute pas nécessaire d'apparier étroitement la granulométrie ou la teneur en matière organique du sédiment, puisque *H. azteca* peut tolérer des sédiments non contaminés dont les propriétés diffèrent sur ces points, sans que sa survie ou sa croissance en soient modifiées (v. 1.4). L'appariement de la teneur en carbone organique peut être inutile lorsque la pollution (p. ex., des usines de pâtes à papier ou des eaux usées) est à l'origine de la forte teneur en matière organique du sédiment d'essai. Des études préliminaires visant à évaluer les propriétés géochimiques et la toxicité du sédiment dans la ou les régions préoccupantes et dans des sites voisins sont utiles lorsque vient le moment de choisir des sites convenant au prélèvement du sédiment de référence.

On pourrait prélever des échantillons de boues municipales ou industrielles (p. ex., boues résiduares, résidus miniers essorés, boues de clarificateur ou de bassin de décantation industriel) afin d'évaluer leurs effets nocifs sur la survie et la croissance de *H. azteca* et de procéder à des analyses géochimiques et à des analyses des contaminants. On pourrait aussi prélever d'autres types de résidus particuliers (p. ex., boues de forage) en vue d'une évaluation toxicologique et chimique.

La méthode de prélèvement des échantillons (c.-à-d. à l'aide d'un carottier, d'une benne ou d'une drague) dépend des objectifs de l'étude et de la nature du sédiment ou de la matière particulaire à échantillonner. Les différents échantillonneurs ainsi que leurs avantages et inconvénients respectifs sont résumés dans EC (1994); d'autres détails sont également fournis dans les ouvrages suivants : de Groot et Zschuppe, 1981; Baudo et coll., 1990; Burton, 1992; Sly et Christie, 1992; ASTM, 1995b, 2008.

Pour perturber le moins possible l'échantillon, on devrait utiliser une benne benthique ou un carottier plutôt qu'une drague. On devrait prélever le sédiment dont on veut évaluer la toxicité et les propriétés chimiques à une ou des profondeurs représentatives de la ou des couches préoccupantes (p. ex., couche superficielle de 2 cm ou couche plus profonde si le dépôt historique de contaminants soulève un intérêt).

Il faut également veiller à réduire au minimum les pertes de fines particules au cours du prélèvement. Si on utilise une benne, il faudrait prélever au moyen d'un carottier manuel un échantillon dans les 2 cm superficiels ou dans la couche voulue du sédiment d'essai. À cette fin, on ouvre la benne par le haut pour exposer la surface du sédiment non perturbé. On devrait transférer l'échantillon dans un récipient propre.

Avant d'entreprendre un programme d'échantillonnage, on devrait calculer le volume requis de sédiment par échantillon (EC, 1994), en tenant compte de la quantité exigée pour la préparation de chaque répétition aux fins des essais toxicologiques, de même que pour la caractérisation de la granulométrie, de la teneur en matière organique et en humidité et pour les analyses de substances chimiques données. On a normalement besoin de ≥ 1 L de sédiment par échantillon (EC, 1994), mais cela dépend des objectifs et du plan de l'étude ainsi que de la nature des analyses chimiques à effectuer. Pour disposer du volume nécessaire, il faudra peut-

être grouper des sous-échantillons prélevés à l'aide du dispositif d'échantillonnage. On devrait suivre les conseils donnés dans EC (1994) pour obtenir un échantillon composite à partir des sous-échantillons prélevés sur le terrain.

Il convient d'utiliser la même méthode de prélèvement dans tous les sites et stations d'échantillonnage. On devrait consulter EC (1994) pour obtenir plus de conseils sur les dispositifs et les procédures qui conviennent.

5.2 Étiquetage, transport, entreposage et analyse des échantillons

Les récipients servant au transport et à l'entreposage des échantillons de sédiment ou de matière particulaire semblable prélevés sur le terrain doivent être constitués d'un matériau non toxique. Le choix du récipient dépend à la fois du volume de l'échantillon et de ses éventuelles utilisations finales. On devrait consulter EC (1994) pour obtenir des indications sur le choix de récipients adéquats. Ces derniers doivent être soit neufs, soit avoir été nettoyés à fond puis rincés avec de l'eau d'essai ou une autre eau non contaminée (p. ex., distillée ou désionisée) avant l'emploi.

On devrait remplir complètement le récipient à échantillon pour qu'il n'y subsiste pas d'air. Immédiatement après, il faut le fermer hermétiquement et l'étiqueter ou le coder. L'étiquette et les documents d'accompagnement préparés alors doivent inclure au moins un code ou les précisions suivantes : type d'échantillon (p. ex., prélevé à l'aide d'une benne ou d'un carottier), origine, emplacement précis (c.-à-d. nom de la masse d'eau, coordonnées géographiques, profondeur), numéro de l'échantillon, date du prélèvement et, facultativement, nom et signature de la ou des personnes ayant procédé à l'échantillonnage. Ces personnes devraient par ailleurs consigner les détails suivants :

- nature, aspect et volume de chaque échantillon;
- méthode et dispositif d'échantillonnage;
- méthode de regroupement des échantillons prélevés à l'aide d'un carottier ou d'une benne;
- nombre de répliqués prélevés à chaque station;
- calendrier des prélèvements;
- type et nombre de récipients utilisés pour le transport des échantillons;
- toute mesure effectuée sur le terrain relativement au surnageant ou au sédiment (p. ex., température, salinité, pH, OD);
- procédures et conditions entourant le refroidissement et le transport des échantillons.

Avec de la glace ou des blocs réfrigérants, on devrait refroidir à 1-7 °C les échantillons tièdes (>7 °C), dès leur prélèvement, et les garder au froid (4 ± 3 °C) et dans l'obscurité pendant leur transport. Au besoin, on peut utiliser des blocs réfrigérants, de la glace ou d'autres moyens de réfrigération pour que la température des échantillons se maintienne à 1-7 °C pendant le transport.

Le laboratoire doit consigner la date de réception de chaque échantillon. Il devrait aussi mesurer et consigner sa température à ce moment-là. Les échantillons à entreposer pour usage ultérieur doivent être gardés dans des récipients étanches et dans l'obscurité, à 4 ± 2 °C (EC, 1994, 1997a). On devrait purger à l'azote l'espace libre des récipients, puis fermer hermétiquement ces derniers (EC, 1994). Les échantillons ne doivent pas geler, ni complètement ni partiellement, pendant le transport ou l'entreposage, et on ne doit pas les laisser s'assécher (EC, 1992a, 1994, 1997a). Il

est recommandé de soumettre aux essais, le plus tôt possible après leur prélèvement, les échantillons de sédiment ou de matière particulaire semblable. L'essai toxicologique devrait commencer dans les 2 semaines suivant le prélèvement, de préférence dans la semaine qui suit, mais obligatoirement dans les 6 semaines qui suivent, à moins qu'il soit établi que les contaminants du sédiment sont stables (c.-à-d. que leurs concentrations ne changeront pas d'une manière appréciable)⁶⁴.

Idéalement, afin de faciliter la caractérisation de l'échantillon, on devrait mesurer sur le terrain les caractéristiques chimiques instables du sédiment (p. ex., pH, potentiel d'oxydo-réduction) ou celles sur lesquelles influent les conditions de transport et d'entreposage (comme la température). Au laboratoire, on devrait mélanger l'échantillon à fond (v. 5.3) et en prélever des sous-échantillons représentatifs en vue de la caractérisation physicochimique. Il faut caractériser chaque échantillon (y compris les répliqués prélevés sur le terrain et les échantillons de sédiment témoin et de référence) en analysant au moins la granulométrie [pourcentage de sable (grossier, moyen et fin),

⁶⁴ On a signalé que la toxicité et les caractéristiques géochimiques des sédiments contaminés du port de Hamilton commençaient à s'altérer après plus d'une semaine d'entreposage, mais on n'a pas fourni les données étayant cette affirmation (Brouwer et coll., 1990). Othout et coll. (1991) ont constaté que la toxicité d'échantillons d'un sédiment d'eau douce entreposés entre 7 et 112 jours à 4 °C changeait peu. Burton (1991) et l'USEPA (1994a, 2000) signalent diverses études montrant que, parfois, la toxicité d'un sédiment conservé à 4 °C était inaltérée après plusieurs mois d'entreposage et que, dans d'autres cas, une altération survenait en quelques jours ou quelques semaines. Le délai recommandé de 2 semaines est conforme à celui préconisé dans EC (1992a, 1997a) pour d'autres essais toxicologiques sur un sédiment. Dans EC (1994), le délai maximal admissible est de 6 semaines avant la mise en route des essais toxicologiques en raison des difficultés pratiques qu'entraîne un délai plus court, notamment le temps à consacrer aux analyses chimiques initiales, le cas échéant.

de limon et d'argile] et la teneur en carbone organique total de sous-échantillons du sédiment entier⁶⁵.

Il est aussi recommandé de mesurer le pH et la teneur en ammoniac (concentrations totales et nonionisées; v. 4.5) de l'eau de porosité et/ou du sédiment entier, de même que la teneur en eau de chaque échantillon⁶⁶. On pourrait aussi procéder aux analyses suivantes (USEPA, 1994a, 2000; APHA et coll., 1995, 2005) : carbone inorganique total, matières volatiles totales, demande biochimique en oxygène, demande chimique en oxygène, capacité d'échange cationique, sulfures volatils acides, métaux, composés organiques de synthèse, huiles et graisses, hydrocarbures pétroliers; pourraient être incluses des analyses des caractéristiques physicochimiques de l'eau de porosité. Sauf indication contraire, on devrait effectuer des analyses chimiques, physiques et toxicologiques identiques sur des sous-échantillons représentatifs de chaque réplicat prélevé sur le terrain (y compris du sédiment

⁶⁵ Au début et à la fin de l'essai, il faut aussi mesurer la teneur en ammoniac et le pH de l'eau sus-jacente de chaque traitement (v. 4.5).

⁶⁶ Les exigences quant aux analyses chimiques du sédiment sont axées sur des variables susceptibles d'influer directement sur la santé des organismes. Par exemple, selon des éléments de preuve anecdotiques, un sédiment présentant une forte teneur en nutriments peut occasionner un accroissement de la taille des organismes, en dépit du fait que les conditions de l'essai exigent de nourrir ces derniers. De l'avis de certains spécialistes, le pH et la teneur en ammoniac de l'eau sus-jacente (v. 4.5) conviennent à l'évaluation des effets directs d'une contamination sur *H. azteca*, une espèce épibenthique. C'est pourquoi il est recommandé — et non exigé — de mesurer le pH et la teneur en ammoniac de l'eau de porosité et/ou du sédiment entier. Il faut souligner que ces analyses minimales des caractéristiques chimiques ne tiennent pas compte des interactions des contaminants. C'est à l'expérimentateur que revient la responsabilité de mesurer les variables physicochimiques susceptibles d'agir en tant que facteurs modificateurs de la toxicité (p. ex., EC, 2010). Étant donné que chaque cas de contamination est unique, il n'entre pas dans le cadre de la présente méthode d'exiger la mesure des facteurs modificateurs des contaminants ou de leur toxicité.

de référence) pour une étude donnée de la qualité du sédiment, de même que sur ≥ 1 sous-échantillon du sédiment témoin.

5.3 Préparation des échantillons en vue des essais

Normalement, on ne devrait pas tamiser par voie humide un sédiment ou une matière particulaire semblable prélevé sur le terrain, car on éliminerait les contaminants de l'eau de porosité ou ceux dont la sorption sur les particules est faible (EC, 1994). On enlève généralement les gros débris ou les gros macro-organismes indigènes à l'aide de pincettes ou à la main gantée.

La présence de macro-organismes indigènes dans un échantillon de sédiment d'eau douce peut ralentir la croissance de *H. azteca* au cours des essais et biaiser l'interprétation des résultats (Reynoldson et coll., 1994). Si un échantillon renferme beaucoup de macro-organismes impossibles à extraire avec des pincettes, on peut procéder à son tamisage sous pression (et non par voie humide) en utilisant un ou des tamis au maillage convenable. Dans le cas d'un sédiment renfermant de petits macro-organismes impossibles à éliminer par tamisage sous pression en raison des caractéristiques mêmes du sédiment, on peut rincer l'échantillon dans un tamis fin (p. ex., mailles de 0,25-0,5 mm; Day et coll., 1995b) avec le liquide qui s'est séparé de l'échantillon au cours du transport et/ou de l'entreposage. On doit mélanger de nouveau ce liquide avec l'échantillon tamisé (v. 4.1).

Le tamisage pourrait modifier la concentration ou la biodisponibilité des contaminants présents dans le sédiment ou altérer sa granulométrie ou sa teneur en nutriments (EC, 1994; Day et coll., 1995b). Si on tamise le sédiment, il est recommandé d'en mesurer les propriétés physicochimiques (p. ex., métaux présents dans l'eau de porosité, granulométrie) avant et après. Dans certains cas, on pourrait devoir effectuer

des essais toxicologiques comparatifs sur un sédiment tamisé et un sédiment non tamisé, afin de discerner l'effet du tamisage sur la toxicité de l'échantillon.

À moins d'indication contraire dictée par les objectifs de la recherche ou de l'étude, tous les échantillons d'une matière prélevée sur le terrain devraient être homogénéisés au laboratoire avant de servir aux essais (EC, 1994; USEPA, 1994a, 2000)⁶⁷. Comme l'homogénéisation peut avoir une incidence sur la concentration et la biodisponibilité des contaminants présents dans le sédiment, elle pourrait ne pas être souhaitable dans tous les cas.

Pour obtenir un échantillon homogène, on le mélange dans son récipient de transport/ d'entreposage ou on le transfère au préalable dans un récipient propre. On peut mélanger l'échantillon à l'aide d'un ustensile non toxique (p. ex., cuillère ou spatule en acier inoxydable), jusqu'à ce que sa couleur et sa texture soient homogènes (EC, 1992a). On peut également utiliser une méthode mécanique (EC, 1994; USEPA, 1994a, 2000). Les conditions du mélange, y compris la durée et la température, doivent être le plus semblables possible pour chaque échantillon utilisé dans un essai. Si on doute de l'efficacité du mélange, on devrait en prélever des sous-échantillons et les analyser séparément pour en déterminer l'homogénéité.

Immédiatement après le mélange de l'échantillon, il faut prélever les sous-échantillons requis pour l'essai toxicologique et les analyses physicochimiques et les répartir dans des récipients d'essai étiquetés (v. 4.1) et des récipients de conservation, également étiquetés, en vue d'analyses physicochimiques

⁶⁷ On homogénéise généralement les échantillons afin, notamment, de réincorporer dans le sédiment toute eau de porosité qui remonte à sa surface au cours du transport et de l'entreposage. L'homogénéisation est également nécessaire pour redistribuer les constituants de l'échantillon qui se sont tassés et séparés en couches (d'après la taille des particules) pendant ces deux étapes.

ultérieures. On devrait aussi transférer dans des récipients étiquetés ce qui reste de l'échantillon homogénéisé, car on pourrait en avoir besoin pour des essais toxicologiques supplémentaires avec *H. azteca* ou d'autres organismes. Tous les sous-échantillons à entreposer devraient être conservés dans des récipients fermés hermétiquement, sans espace d'air, obligatoirement dans l'obscurité, à 4 ± 2 °C (v. 5.2), jusqu'à leur utilisation ou analyse. Immédiatement avant cette utilisation ou cette analyse, on devrait encore une fois mélanger à fond chaque sous-échantillon afin de s'assurer de son homogénéité.

5.4 Eau d'essai

Dans les essais sur un sédiment ou une matière particulaire semblable prélevé sur le terrain, l'eau versée dans les récipients d'essai (c.-à-d. l'eau sus-jacente) peut avoir la même origine que l'eau utilisée pour l'élevage de *H. azteca* (v. 2.3.4 et 3.4). Elle peut également provenir d'une source distincte d'alimentation en eau douce ou en eau estuarienne naturelle ou être de l'eau reconstituée. Pour certaines applications, le plan d'expérience pourrait exiger ou autoriser l'emploi d'une eau douce ou estuarienne provenant d'un site de référence à proximité du lieu de prélèvement du sédiment d'essai. L'eau non contaminée du site à l'étude, ou encore une eau non contaminée dont la dureté a été ajustée à celle de l'eau du site, constitue souvent un bon choix du fait de l'influence modificatrice qu'exercent des eaux de différentes duretés sur la toxicité des métaux ou des contaminants organiques présents dans un sédiment. Lorsque l'eau d'essai provient du site à l'étude, il faut préparer un deuxième jeu de témoins avec l'eau du laboratoire qui a permis antérieurement à ce dernier d'obtenir des résultats valides dans des essais de 14 jours sur la survie et la croissance de *H. azteca* (v. 3.4). On trouvera en 2.3.4 des indications pertinentes sur la préparation et l'analyse de l'eau qui servira d'eau sus-jacente dans les essais.

5.5 Observations et mesures

Lors de la mise sur pied de l'essai, on devrait rédiger une description qualitative de chaque matière d'essai prélevée sur le terrain. Cette description pourrait inclure des observations sur la couleur, la texture et l'homogénéité de l'échantillon et sur la présence de végétaux, d'animaux et de traces ou de trous d'animaux (EC, 1992a). Il convient de noter et de consigner tout changement dans l'aspect de la matière d'essai et de l'eau sus-jacente qui surviendrait pendant l'essai ou à la fin.

On devrait mesurer, soit pendant, soit au début et à la fin de l'essai, comme il est indiqué en 4.5, la qualité de l'eau sus-jacente des récipients d'essai (p. ex., pH, température, dureté, alcalinité, teneur en ammoniac, teneur en OD). Selon les objectifs de l'essai et le plan d'expérience (c.-à-d. le ratio sédiment-eau), on pourrait prévoir au début de l'essai des récipients d'essai distincts (v. 4.1) pour surveiller les caractéristiques chimiques du sédiment entier et/ou de l'eau de porosité (USEPA, 1994a, 2000). Les prélèvements qu'on y ferait, pendant l'essai et à la fin, seraient destructifs. Selon les objectifs de l'étude, on pourrait ajouter ou non des organismes expérimentaux dans ces récipients supplémentaires. Pour la mesure des concentrations de contaminants dans le sédiment ou l'eau de porosité de ces récipients, on peut siphonner la plus grande partie de l'eau sus-jacente, sans perturber la surface du sédiment, puis prélever des aliquotes du sédiment en vue des analyses (v. 5.2). Si on souhaite analyser l'eau de porosité, la centrifugation sans filtration serait recommandée (EC, 1994; USEPA, 1994a, 2000). On trouvera dans EC (1994) des conseils sur la marche à suivre pour l'extraction, le traitement et l'entreposage de l'eau de porosité avant analyse.

Selon les objectifs de l'étude et la nature du sédiment d'essai (p. ex., s'il contient beaucoup

de matières organiques), on pourrait mesurer, dans des récipients d'essai réservés à cette fin, le pH et la teneur en ammoniac de l'eau de porosité pendant le déroulement de l'essai (EC, 1994; USEPA, 1994a, 2000). On pourrait surveiller dans ces mêmes récipients d'autres caractéristiques du sédiment (p. ex., métaux, sulfure d'hydrogène, matières volatiles totales, potentiel d'oxydo-réduction). Si on souhaite surveiller ces variables, on devrait prévoir au moins un récipient d'essai par traitement (les prélèvements y seraient destructifs).

5.6 Paramètres et calculs

L'interprétation des essais sur un ou des échantillons de sédiment se résume toujours à une comparaison des effets biologiques observés dans ces derniers et ceux observés dans un sédiment de référence. Si possible, on devrait utiliser un sédiment de référence comme point de comparaison, car on obtient ainsi une évaluation de la toxicité du site à l'étude (USEPA, 1994a, 2000). Parfois, le sédiment de référence ne convient pas aux comparaisons à cause de sa toxicité ou de ses caractéristiques physicochimiques atypiques, et il faut alors comparer le sédiment d'essai à un sédiment témoin. Les résultats obtenus pour le ou les sédiments témoins facilitent la distinction entre les effets attribuables aux contaminants et à d'autres causes, comme la granulométrie ou la teneur en carbone organique. Que ce soit le sédiment de référence ou le sédiment témoin qui serve aux comparaisons statistiques, il faut utiliser les résultats obtenus pour le sédiment témoin pour juger de la validité et de l'acceptabilité de l'essai (v. 4.7).

Les deux paramètres exigés pour les essais avec *H. azteca* (v. 4.7) sont la mortalité (mesure *quantique*) et le poids sec en tant qu'indicateur de croissance (mesure *quantitative*) à la fin de l'essai. Ces deux mesures étant de nature différente, il faut recourir à des approches statistiques différentes également, et celles-ci sont affinées pour refléter les objectifs de

l'essai. La présente sous-section renferme des conseils d'ordre statistique pour les essais à concentration unique (c.-à-d. sur des sédiments provenant de stations d'échantillonnage multiples et mis à l'essai à la concentration maximale seulement) en fonction de trois scénarios courants :

- 1) comparaison entre la station d'échantillonnage à l'étude et une station d'échantillonnage de référence (v. scénario n° 1, figure 2);
- 2) comparaison entre plusieurs stations d'échantillonnage *ordonnées*⁶⁸ et une station d'échantillonnage de référence (v. scénario n° 2, figure 2);
- 3) comparaison entre plusieurs stations d'échantillonnage *non ordonnées* et une station d'échantillonnage de référence (v. scénario n° 3, figure 2).

Des scénarios moins fréquents sont présentés en 5.6.3. La sous-section 5.6.2 ne renferme que des indications générales relatives à l'analyse statistique du paramètre du poids sec, étant donné qu'on peut trouver ailleurs de plus amples détails (EC, 2007). Il est recommandé (mais non exigé) de procéder à l'analyse statistique (test d'hypothèse) comparative des données d'essai propres à chaque station. S'il s'avère que le sédiment de référence ne convient pas (p. ex., à l'issue de l'analyse physicochimique effectuée

⁶⁸ Le terme *ordonnées* indique ici qu'on s'attend à l'existence d'un gradient d'une station à une autre (p. ex., série de stations devenant progressivement plus éloignées d'une source ponctuelle). Aucune mesure n'étant associée aux stations ordonnées (p. ex., aucune distance mesurée depuis la source), la variable indépendante (station d'échantillonnage) est qualifiée d'*ordinale*. *Ordonné* signifie qu'un gradient est prévu (EC, 2007). Lorsque les stations d'échantillonnage sont *non ordonnées*, il y a absence présumée de gradient dans les réponses, et la variable indépendante est plus souvent qualifiée de *nominale*. Ces distinctions (p. ex., variable ordinaire ou nominale) sont établies pendant la mise au point du plan d'expérience (donc, a priori) et non après la collecte des données.

au laboratoire), l'expérimentateur pourrait utiliser un sédiment témoin aux fins des comparaisons avec la station d'échantillonnage à l'étude. Il faut noter que cette façon de procéder donnera un plan d'expérience dans lequel les données sur les répétitions (sédiment témoin) sont mélangées avec celles sur les réplicats (sédiment prélevé à la station d'échantillonnage à l'étude) et que, selon les indications fournies ici, l'expérimentateur devra traiter les répétitions comme des réplicats. Même si cette façon de faire ne convient pas d'un point de vue statistique, on devra considérer qu'elle est acceptable, étant donné l'absence de solution de rechange raisonnable. Si on juge que les inférences tirées des analyses auront une incidence marquée (p. ex., des critères d'assainissement), on devrait consulter un statisticien.

On peut procéder à des essais à concentrations multiples sur des sédiments, des boues ou des matières particulaires semblables. Dans de tels essais, on mélange des quantités mesurées de l'échantillon d'essai et d'un sédiment témoin naturel ou préparé (v. 3.5 et 6.2). Les méthodes de mélange de différents échantillons de sédiment n'étant pas encore normalisées ni éprouvées (v. 6.2), il est conseillé de faire preuve de prudence du fait que les réponses et les changements sur le plan de la biodisponibilité ou des caractéristiques de sorption risquent de ne pas être linéaires (Nelson et coll., 1994). Il est recommandé de prévoir ≥ 5 répétitions afin de disposer de sous-échantillons (c.-à-d. des réplicats de laboratoire) pour chaque concentration, et ce, afin de mesurer l'homogénéité des échantillons et la précision de l'essai. On trouvera en 6.5 une description des analyses statistiques des paramètres des essais à concentrations multiples.

5.6.1 *Analyse des données sur la mortalité*

Jusqu'à maintenant, il existait peu d'indications sur l'analyse des données quantiques associées à un plan d'expérience comportant l'examen de stations d'échantillonnage multiples (EC, 2007). Environnement Canada a récemment amélioré ses lignes directrices concernant ce type

d'analyse (Zajdlik, 2010); elles sont résumées dans les paragraphes qui suivent (v. figure 3). En règle générale, la méthode à privilégier est la *régression logistique*, suivie de l'*analyse de contrastes*. Si on ne dispose pas d'un programme de régression logistique⁶⁹, il convient de recourir à des tests plus courants et faciles à appliquer.

⁶⁹ En date de mai 2012, le progiciel statistique le plus utilisé dans les laboratoires du Canada (le CETIS) ne pouvait pas exécuter une régression logistique ni les analyses de contrastes ultérieures.

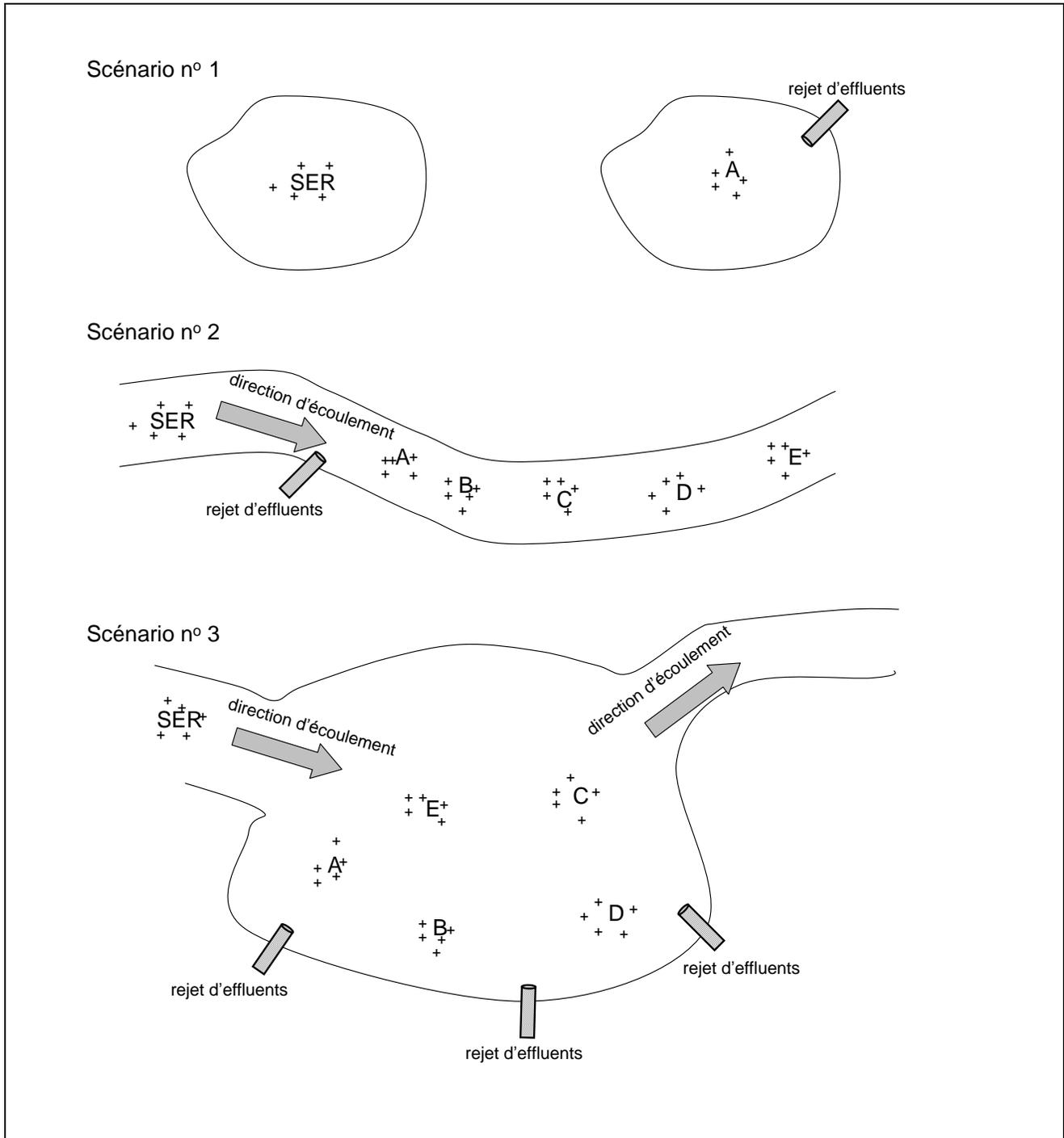


Figure 2. Schémas illustrant des plans d'expérience utilisés couramment pour l'évaluation de sédiments sur le terrain

Scénario n° 1 : plan d'expérience comportant une station d'échantillonnage de référence (SER) et la station d'échantillonnage à l'étude (A). Scénario n° 2 : plan d'expérience comportant une station d'échantillonnage de référence (SER) et 5 stations d'échantillonnage ordonnées (A-E). Scénario n° 3 : plan d'expérience comportant une station d'échantillonnage de référence (SER) et 5 stations d'échantillonnage non ordonnées (A-E). Cinq réplicats (+) sont prélevés à chacune des stations d'échantillonnage des trois scénarios.

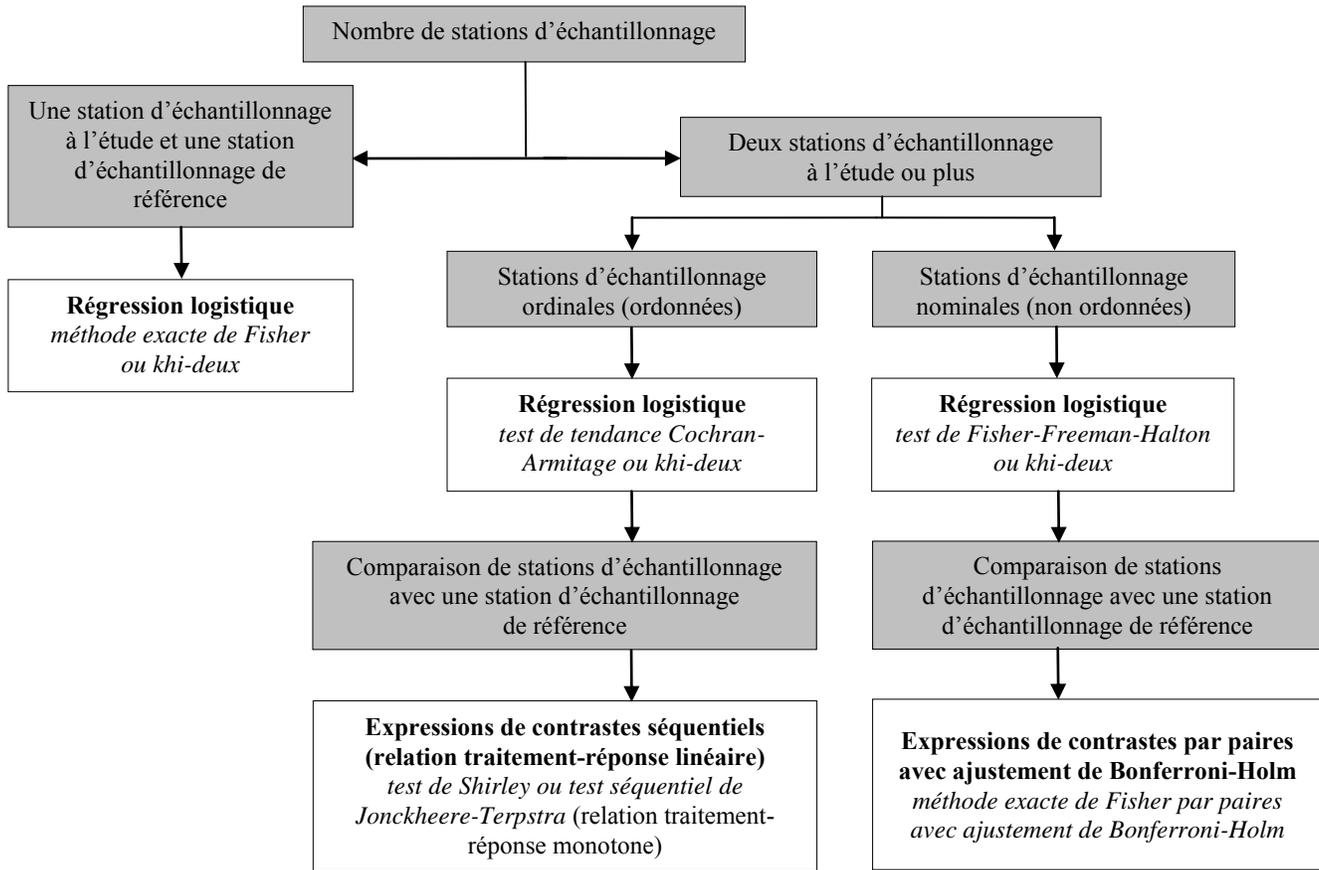


Figure 3. Organigramme de l'analyse statistique connexe à trois plans d'expérience utilisés couramment pour les essais sur un sédiment prélevé sur le terrain

Les caractéristiques du plan d'expérience ou les objectifs de l'essai (cases ombrées) sur lesquels s'appuie le chemin de décision incluent le nombre de stations d'échantillonnage, la nature de ces stations (*ordinales* ou *nominales*) et le type de comparaison souhaité (ici, comparaison avec une station d'échantillonnage de référence seulement). L'essai à privilégier est en caractères gras. Pour les tests de rechange possibles (caractère normal), prière de consulter le corps du texte. Les tests faisant appel à des tableaux de contingence (p. ex., *méthode exacte de Fisher*, *khi-deux*, *Fisher-Freeman-Halton*) exigent normalement le regroupement des données sur les réplicats prélevés sur le terrain. On utilise la correction de continuité de *Yates* (ou une correction semblable) avec le test du *khi-deux*. Tous les scénarios ci-dessus supposent l'utilisation de réplicats (prélevés sur le terrain) et une seule station d'échantillonnage de référence. À défaut d'une station d'échantillonnage de référence, on peut utiliser un sédiment témoin. Si on présume, au moment d'établir le plan d'expérience, que les stations d'échantillonnage sont *ordinales*, mais que les analyses ultérieures des données d'essai révèlent l'absence d'une *relation traitement-réponse monotone*, les contrastes séquentiels, le test de *Shirley* et les tests séquentiels de *Jonckheere-Terpstra* pourraient ne pas convenir. On devrait consulter le corps du texte pour ce qui est des solutions de rechange possibles.

Lorsque le plan d'expérience comporte une station d'échantillonnage à l'étude et une station d'échantillonnage de référence, et en supposant que des répliqués⁷⁰ y sont prélevés, il est préférable d'utiliser la régression logistique. À défaut, les données sur les répliqués peuvent être groupées (c.-à-d. additionnées), et la *méthode exacte de Fisher* (deuxième choix) ou le *test du khi-deux*⁷¹ (dernier choix) est acceptable. Dans le cas d'une application spéciale (p. ex., étude préliminaire) ne prévoyant pas le prélèvement de répliqués (v. 5.1), il faut privilégier la *méthode exacte de Fisher*; le test du *khi-deux* constituerait par ailleurs une méthode de rechange acceptable.

Pour comparer plusieurs stations d'échantillonnage ordonnées et une station de référence, on privilégiera la régression logistique, suivie d'une analyse de contrastes, pour comparer les stations individuelles⁷². Si la relation traitement-réponse est linéaire (« espacement » égal entre les variables), on recommande d'employer un test séquentiel avec analyse de contrastes (Zajdlik, 2010). Lorsque la régression logistique n'est pas utilisée, le test de tendance *Cochran-Armitage* constitue le deuxième choix, et le test du *khi-deux*⁷¹, le troisième. Dans le cas d'une relation traitement-réponse monotone⁷³, les solutions de rechange

⁷⁰ À moins d'indication contraire, tous les répliqués sont considérés comme des *échantillons prélevés sur le terrain*.

⁷¹ Il est recommandé d'appliquer, si possible, une correction de continuité au test du *khi-deux*. S'il y a une seule station d'échantillonnage à l'étude et une seule station d'échantillonnage de référence (c.-à-d. un tableau de contingence de 2×2), la correction de continuité qui convient est celle de *Yates*. Pour les plans d'expérience comportant plus d'une station d'échantillonnage à l'étude, on aura plutôt recours à une correction de continuité plus générale.

⁷² La régression logistique sert ici de test global d'hypothèse, tandis que l'analyse de contrastes constitue le test *post-hoc*.

⁷³ Une *relation traitement-réponse monotone* décrit la relation entre les stations d'échantillonnage ordinales et la réponse biologique, où la « direction » de la réponse ne

post-hoc aux contrastes séquentiels sont le test de *Shirley* (deuxième choix) et le test de *Jonckheere-Terpstra* (dernier choix). Il peut arriver que, même si un gradient est prévu dans la réponse, on n'en observe pas (en d'autres termes, on obtient une relation traitement-réponse non monotone). Cette situation pourrait se produire si, par exemple, en aval d'une source ponctuelle, les nutriments que renferme un sédiment changeaient ou que la biodisponibilité d'un contaminant ne restait pas constante. Dans un tel cas, la *méthode exacte de Fisher* avec ajustement de *Bonferroni-Holm* serait à privilégier, ou encore le test de sommation des rangs de *Wilcoxon*⁷⁴.

Dans le scénario n° 3, les stations d'échantillonnage sont nombreuses, mais elles ne sont pas ordonnées le long du gradient prévu, et les comparaisons se font avec la station d'échantillonnage de référence.

Le test à privilégier est la régression logistique, suivie de l'expression de contrastes par paires avec ajustement de *Bonferroni-Holm*. Si on ne dispose pas d'un logiciel de régression logistique, le test de *Fisher-Freeman-Halton* constituerait le deuxième choix, et le *test du khi-deux*⁷¹, le troisième. La méthode exacte de *Fisher* par paires avec ajustement de *Bonferroni-Holm* constituerait un autre test *post-hoc* possible.

5.6.1.1 Évaluation des modèles utilisés

Lorsqu'on a recours à la régression logistique, l'adéquation du modèle servant à expliquer les données observées est souvent évaluée. Les deux outils d'évaluation sont :

s'inverse pas lorsqu'elle est examinée par rapport à celle des stations d'échantillonnage. Par exemple, si la mortalité diminue graduellement (ou reste la même) aux stations d'échantillonnage successives en aval d'une source ponctuelle, on décrirait cette relation comme étant une réponse monotone.

⁷⁴ Aussi appelé test *U de Mann-Whitney* et test de *Mann-Whitney-Wilcoxon*.

- 1) le test statistique de la variable indépendante;
- 2) le test de l'ajustement du modèle.

Dans les plans d'expérience décrits ici, le test statistique de la variable indépendante permet de déterminer si les écarts entre les stations d'échantillonnage peuvent expliquer adéquatement les écarts dans les taux de mortalité observés. Les tests statistiques qui conviennent sont le test du *rapport des vraisemblances* (premier choix) ou le test de *Wald*. Pour l'examen de l'ajustement du modèle⁷⁵, on évalue visuellement les représentations graphiques des résidus. L'ajustement peut être médiocre lorsque les réponses ne suivent pas une distribution binomiale⁷⁶ ou que des valeurs aberrantes sont présentes.

Les critères de décision et les principes de l'interprétation approfondie du test statistique de la variable indépendante et du test de l'ajustement du modèle n'ont pas encore été établis, et on n'a pas examiné les autres solutions de rechange à l'évaluation de l'adéquation du modèle. C'est pourquoi le recours à ces outils à des fins d'assurance et de contrôle de la qualité est laissé à la discrétion de l'utilisateur averti. On peut aussi consulter un statisticien.

Les tests non paramétriques (comme ceux de *Shirley* ou de *Jonckheere-Terpstra*) ne sont pas soumis au test statistique de la variable indépendante ou au test de l'ajustement du modèle. Toutefois, des hypothèses sous-jacentes

⁷⁵ L'ajustement du modèle décrit la capacité du modèle à prédire avec précision la variable-réponse.

⁷⁶ Même s'il est évident que la réponse de *H. azteca* est binomiale (mort ou survie), il est possible que d'autres facteurs (p. ex., les réplicats d'une station d'échantillonnage) influent sur la variation du modèle. Il existe des tests reconnus utilisant la distribution binomiale (Zajdlik, 2010), mais on considère que leur emploi n'est pas d'une importance critique à cette étape-ci.

sont communes à tous les tests statistiques, comme l'indépendance des réponses. Dans les essais normalisés bien conçus et bien exécutés, ces hypothèses sont peu susceptibles d'être enfreintes (Zajdlik, 2010) et elles ne sont pas abordées plus avant ici.

5.6.2 Analyse des données sur le poids sec

On trouve dans EC (2007)⁷⁷ des conseils détaillés sur l'analyse statistique de mesures quantitatives pouvant être appliquées facilement aux données sur la croissance de *H. azteca* dans un scénario comportant des stations d'échantillonnage multiples. Si on doit comparer le poids sec final obtenu pour la seule station d'échantillonnage à l'étude avec celui obtenu pour une station d'échantillonnage de référence, un *test t*⁷⁸ convient habituellement à l'analyse statistique (v. 3.2 dans EC, 2007). Lorsque plus d'une station d'échantillonnage (traitement) est à l'étude et que l'expérimentateur souhaite comparer de nombreuses stations entre elles ou avec la station d'échantillonnage de référence, il peut avoir recours à une ANOVA et à des tests de comparaisons multiples (et équivalents non paramétriques) (v. 3.3 dans EC, 2007). Le choix du test se fonde sur les éléments suivants :

- 1) le type de comparaison à établir (p. ex., une série complète de comparaisons par paires entre toutes les stations d'échantillonnage ou

⁷⁷ Pour l'analyse des données sur la croissance de *H. azteca*, il est conseillé de consulter les sous-sections 3.2 et 3.3 de EC (2007), qui portent sur l'analyse de mesures quantitatives pour des échantillons provenant d'un seul endroit et de plusieurs endroits, respectivement. On devrait aussi consulter la sous-section 7.5 de EC (2007), qui présente d'autres détails sur les tests de comparaisons multiples aux fins des tests d'hypothèse; toutefois, le calcul de la *concentration sans effet observé* (CSEO) ou de la *concentration minimale avec effet observé* (CMEO) n'est pas recommandé ici.

⁷⁸ Ce test suppose une égalité des variances entre les groupes, mais on peut le modifier pour tenir compte d'une inégalité des variances (EC, 2007).

une comparaison de la réponse obtenue pour chaque station et pour la station de référence seulement);

- 2) l'existence prévue d'un gradient chimique et/ou d'un gradient dans la réponse biologique;
- 3) la satisfaction des hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité*.

5.6.3 Variantes du plan d'étude et des analyses

Certains scénarios d'essais sur un sédiment sont moins courants, notamment :

- 1) la comparaison entre elles de toutes les stations d'échantillonnage (comparaison intégrale par paires)⁷⁹;
- 2) la comparaison de stations d'échantillonnage groupées dans les catégories « zone rapprochée » ou « zone éloignée »⁸⁰;
- 3) la comparaison de réplicats et de répétitions.

Pour une comparaison intégrale par paires (p. ex., comparaison de toutes les stations d'échantillonnage entre elles) des données sur le poids sec final (mesure quantitative), où on suppose que les données satisfont aux

⁷⁹ Une telle comparaison a une plus grande portée que celle entre la station d'échantillonnage à l'étude et la station d'échantillonnage de référence (v. 5.6.1).

⁸⁰ « Zone rapprochée » et « zone éloignée » s'entendent ici dans le contexte des rejets d'effluents (EC, 2010). Les zones d'exposition rapprochées sont à l'extérieur de la zone de rejet direct de l'effluent dans l'environnement – l'exposition à l'effluent y est la plus élevée. Les zones d'exposition éloignées sont situées plus loin le long du gradient de l'effluent; les concentrations de ce dernier y sont moins élevées que dans les zones d'exposition rapprochées. En théorie, les zones d'exposition éloignées s'étendent jusqu'à la zone où apparaissent des conditions de référence. On compare souvent entre elles les zones rapprochées et éloignées, et elles peuvent englober plus d'une station d'échantillonnage. Une zone (ou site) de référence peut également faire l'objet d'une comparaison semblable.

hypothèses de normalité et d'égalité des variances, on procéderait d'abord à une ANOVA pour vérifier les écarts globaux. On pourrait ensuite utiliser des tests *post-hoc*, comme le test de la *plus petite différence significative de Fisher* ou le test de *Tukey*. Il convient de suivre les conseils fournis dans les sous-sections 3.3 et 7.5 de EC (2007), où on trouve par ailleurs d'autres détails, des tests de rechange et des tests non paramétriques.

Pour une comparaison intégrale par paires (p. ex., comparaison de toutes les stations d'échantillonnage entre elles) des données sur la mortalité (mesure quantitative), les tests statistiques globaux à effectuer sont identiques à ceux décrits en 5.6.1 (la régression logistique constituant le premier choix). Lorsque les données sont *ordonnées*, des conflits risquent de surgir dans l'interprétation des comparaisons entre des stations d'échantillonnage multiples, et l'expérimentateur devrait alors réévaluer le test d'hypothèse (Zajdlik, 2010). Si les données sont *non ordonnées*, les comparaisons se font de la même façon qu'avec les témoins (la méthode à privilégier est l'expression de contrastes par paires, ou encore la *méthode exacte de Fisher* par paires avec ajustement de *Bonferroni-Holm*).

Aucune marche à suivre pour comparer les données sur le poids sec final pour les stations d'échantillonnage en « zone rapprochée » et en « zone éloignée » n'a été établie expressément aux fins de la présente méthode. Le lecteur devrait consulter d'autres documents d'orientation d'Environnement Canada fournissant des détails sur d'autres paramètres quantitatifs en regard de différents plans d'étude (sections 4 et 8 dans EC, 2012). Il est à noter que la terminologie utilisée dans ces documents pour décrire des zones d'étude ne correspond pas nécessairement à celle employée ici.

Si le plan d'échantillonnage et les objectifs de l'essai permettent de grouper les données de plusieurs stations d'échantillonnage selon

qu'elles sont situées en zone rapprochée ou éloignée, il est recommandé de segmenter le test du *khi-deux* pour les données sur la mortalité (mesure quantique), étant donné que cela permettra d'accroître la capacité de détecter un écart significatif. On trouvera des détails sur ces calculs dans d'autres documents (Zajdlik, 2010).

Si des *réplicats* (échantillons prélevés sur le terrain) et des *répétitions* (réplicats de laboratoire) ont été mis à l'essai, on devrait consulter un statisticien pour connaître les choix d'analyse.

5.6.4 Analyse de puissance

Un facteur important à considérer quand on analyse les résultats d'essais toxicologiques sur un sédiment est le risque d'obtenir des faux positifs (soit de conclure qu'un site non contaminé est contaminé – erreur de type I) ou des faux négatifs (soit de conclure qu'un site contaminé est non contaminé – erreur de type II). Les chercheurs, habituellement prudents quand ils choisissent le degré de signification statistique (α) pour tolérer les faux positifs (erreurs de type I), le fixent généralement à $p = 0,05$ ou $0,01$. Le plus souvent, lorsqu'ils se conforment à un plan d'expérience précis, ils ne tiennent pas compte du lien entre puissance, variation et amplitude de l'effet et omettent de préciser la valeur de l'erreur de type II. Plusieurs facteurs peuvent avoir une incidence sur la puissance statistique, dont les suivants :

- 1) la variation entre les réplicats représentant le même traitement;
- 2) α (c.-à-d. la probabilité de commettre une erreur de type I);
- 3) l'*amplitude de l'effet* (l'objet même de l'essai);
- 4) le nombre d'échantillons ou de répétitions utilisé dans l'essai et, dans certains cas, leur affectation⁸¹.

Dans les domaines scientifiques fondés sur la recherche, l'analyse de puissance est particulièrement utile au moment de l'établissement du plan d'expérience préliminaire (Hoenig et Heisey, 2001; Lenth, 2007; Newman, 2008). Ainsi, on exécute un essai préliminaire afin de déterminer l'écart type approximatif (variation) et de diagnostiquer les problèmes qui risquent de surgir dans

⁸¹ Si le plan d'expérience exige la comparaison de la station d'échantillonnage à l'étude avec la station d'échantillonnage de référence seulement (p. ex., au moyen du test de *Dunnnett* ou du test de *Williams*), on obtient une puissance optimale pour le paramètre du poids sec final en affectant un nombre plus élevé de réplicats à la station de référence (Dunnnett, 1995; Williams, 1972; OCDE, 2006). En règle générale, le nombre de réplicats prélevés à la station de référence (n_0) peut être corrélé comme suit au nombre de stations d'échantillonnage à l'étude (k) et au nombre de réplicats prélevés à la station d'échantillonnage à l'étude (n) : $n_0 = n\sqrt{k}$ pour le test de *Dunnnett* (OCDE, 2006). On recommande la version modifiée suivante si le test de *Williams* est employé : \sqrt{k} est remplacé par une plage comprise entre $1,1\sqrt{k}$ et $1,4\sqrt{k}$ (Williams, 1972). Dans la présente méthode, il faut prélever ≥ 5 réplicats par station d'échantillonnage. Si l'expérimentateur souhaite utiliser un nombre de réplicats supérieur à ce minimum, il devrait affecter des réplicats supplémentaires à la station d'échantillonnage de référence afin de maximiser la puissance et de réduire au minimum l'erreur de type II. Prenons l'exemple suivant, qui fait appel au test de *Dunnnett* : le plan d'expérience comporte 1 station d'échantillonnage de référence, 4 stations d'échantillonnage à l'étude et 5 réplicats prélevés dans ces dernières stations. Pour maximiser la puissance, le nombre optimal de réplicats à prélever à la station de référence serait de $n_0 = n\sqrt{k} = 5 \times \sqrt{4} = 10$ réplicats.

l'exécution de l'essai en général. D'autres facteurs de l'analyse de puissance, comme l'amplitude de l'effet et le nombre de répétitions, peuvent ensuite être envisagés en regard de l'écart type en vue d'optimiser le plan d'expérience définitif (p. ex., le nombre de répétitions nécessaires pour détecter un effet d'une certaine amplitude).

Dans l'élaboration de méthodes d'essai normalisées, l'analyse de puissance a pour objectif premier l'optimisation du plan d'expérience (ou du moins l'estimation de la puissance du plan en cours)⁸². Toutefois, il faudrait généralement prendre en considération un ensemble de données nettement plus étoffé qu'une seule estimation de la variation et de l'amplitude de l'effet. Par exemple, les spécialistes des méthodes d'essai pourraient recueillir un grand nombre d'estimations de la variation auprès de différents laboratoires et à partir de différents scénarios de contamination (Thursby et coll., 1997; Van der Hoeven, 1998; Denton et coll., 2011). Les essais normalisés sont souvent employés

à des fins de *surveillance* ou d'application de programmes réglementaires, lesquels peuvent préciser l'amplitude de l'effet (p. ex., 25 %) à détecter (Porebski et Osborne, 1998).

L'objectif à long terme d'Environnement Canada est de recueillir de telles données et

de les utiliser pour déterminer si les plans d'expérience actuels peuvent atteindre un taux d'erreur de type II défendable. Toutefois, étant donné que les répliquats prélevés sur le terrain remplacent les répliquats de laboratoire dans la présente édition de la méthode, on ne dispose pas encore d'estimations adéquates de l'écart type⁸³. Par contre, à partir d'une seule évaluation fondée sur le paramètre de croissance et un modèle qui intègre des répliquats prélevés sur le terrain et des répliquats de laboratoire (Zajdlik, 2010), on peut établir une évaluation très préliminaire de la puissance (pour 5 répliquats prélevés sur le terrain). D'après ces données, la puissance de détection d'une inhibition de 30 % de la croissance est de 65-85 %⁸⁴.

⁸² En 2010, l'USEPA a mis au point une approche d'analyse des données appelée *test de toxicité significative* (TTS) (USEPA, 2010). Un TTS permet de tester une hypothèse d'après la bioéquivalence, une notion largement utilisée dans la mise au point et l'évaluation de médicaments. Nous faisons état du TTS ici parce que l'analyse de puissance et le TTS ont certains buts communs (p. ex., expression a priori des erreurs des types I et II) et un contexte semblable (application d'essais normalisés).

⁸³ La variation entre les répliquats prélevés sur le terrain ne peut être évaluée à partir de données historiques d'essais où on faisait appel à des répliquats de laboratoire.

⁸⁴ La plage de puissance reflète la plage des estimations de la variance utilisée. Dans ce cas, les éléments de variance des deux types de répliquats (terrain et laboratoire) ont été combinés pour obtenir un ratio. C'est ce ratio de variance qui a servi à estimer la puissance.

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais sur un sédiment enrichi

La présente section renferme des recommandations et des instructions sur la préparation et l'utilisation, dans les essais, d'un sédiment témoin ou d'un sédiment enrichi avec une ou des substances chimiques, un sédiment contaminé ou des mélanges complexes de déchets. Ces recommandations et instructions s'ajoutent aux procédures décrites dans la section 4. On trouvera dans EC (1995) des conseils plus détaillés pour enrichir un sédiment et réaliser des essais toxicologiques avec des mélanges de substances chimiques et de sédiments. On pourrait devoir évaluer et normaliser davantage les méthodes d'enrichissement des sédiments (v. 6.2) avant d'appliquer les essais toxicologiques avec *H. azteca* ou d'autres organismes convenables pour évaluer des mélanges particuliers de sédiments et de substances chimiques à des fins réglementaires.

On peut examiner expérimentalement la ou les causes de la toxicité d'un sédiment ainsi que les effets toxiques interactifs d'une ou de plusieurs substances chimiques, d'un sédiment contaminé ou de déchets particuliers en association avec un sédiment par ailleurs non contaminé, en enrichissant un sédiment témoin *non contaminé* avec ces substances ou matières. Pour enrichir un sédiment, on peut utiliser une ou plus d'une substance chimique, un autre sédiment (contaminé ou non) ou une matière particulaire semblable (p. ex., boues de dragage mélangées avec un sédiment provenant d'un lieu d'immersion existant ou projeté en eau douce).

L'emploi d'une gamme de concentrations d'enrichissement permet d'estimer les CL_{50} et de déterminer les concentrations provoquant des *effets sublétaux*. Les essais toxicologiques sur un sédiment enrichi permettent aussi de mesurer l'influence des caractéristiques

physicochimiques d'un sédiment naturel ou artificiel sur la toxicité d'une substance chimique. Pour les essais toxicologiques de référence, on peut employer un sédiment témoin enrichi avec une substance chimique convenable (v. 4.8). La présente section renferme des recommandations et des instructions sur l'exécution d'essais avec un sédiment enrichi. On trouvera des conseils supplémentaires dans USEPA (1994a, 2000) et EC (1995).

6.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons

On devrait se renseigner sur les propriétés de la substance chimique, du sédiment contaminé ou du déchet particulaire qui sera dilué avec un sédiment témoin ou autre. Dans le cas d'échantillons de sédiment contaminé ou de matière particulaire semblable, on devrait suivre les instructions données sur leur caractérisation (v. 5.2). Pour ce qui concerne les substances chimiques (dont les produits formulés) ou les mélanges chimiques, on devrait consulter l'information qui existe sur la concentration des principaux ingrédients et des principales impuretés, la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, la stabilité chimique, les constantes de dissociation, la toxicité pour les humains et les organismes aquatiques, la biodégradabilité. Lorsque la solubilité dans l'eau est douteuse ou problématique, on devrait faire des recherches sur les modes opératoires acceptables déjà utilisés pour préparer des solutions aqueuses des substances chimiques visées, consigner ces modes, puis déterminer en laboratoire la solubilité de la substance en question dans l'eau d'essai. On devrait obtenir et consigner d'autres renseignements tels que la formule développée, la nature et le pourcentage des impuretés

notables, la présence d'additifs et leur quantité, le coefficient de partage *n*-octanol-eau⁸⁵.

La substance chimique (il peut y en avoir plus d'une) à soumettre aux essais devrait au moins être de qualité réactif, sauf si un essai sur une préparation commerciale ou une substance chimique de qualité technique est exigé (USEPA, 1994a, 2000). Les récipients contenant la substance doivent être fermés hermétiquement et codés ou étiquetés dès leur arrivée au laboratoire. L'information exigée (nom de la substance, fournisseur, date de réception, personne chargée des essais, etc.) devrait figurer sur l'étiquette et/ou être consignée sur une feuille de données réservée à l'échantillon, selon ce qui convient le mieux. Les conditions d'entreposage (p. ex., température, protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature de la substance chimique. On devrait prélever, étiqueter, transporter et entreposer le ou les échantillons de sédiment contaminé ou de matière particulaire à évaluer après enrichissement, selon les instructions fournies en 5.1 et 5.2.

6.2 Préparation des mélanges destinés aux essais

Les chercheurs ont utilisé différentes méthodes pour enrichir (doper) un sédiment témoin *non contaminé* avec une ou des substances chimiques ou pour diluer un sédiment contaminé ou un autre déchet particulaire avec un sédiment témoin en vue d'essais toxicologiques sur le mélange ainsi obtenu (ASTM, 1991a, 1991b, 1993, 1995a, 1995b, 2008, 2010; Burton, 1991; USEPA, 1994a, 2000, 2001; Hoke et coll., 1995).

⁸⁵ Le fait de connaître les propriétés de la substance chimique facilitera la détermination des précautions à prendre et des exigences concernant la manipulation et la mise à l'essai (p. ex., essai se déroulant dans un local bien aéré, nécessité d'utiliser un solvant). Les renseignements sur la solubilité de la substance chimique et sur sa stabilité dans l'eau seront également utiles au moment de l'interprétation des résultats.

Il existe diverses façons de préparer un sédiment enrichi (notamment en ce qui concerne l'ajout d'une substance ou matière, le mélange lui-même ainsi que le temps et les conditions d'équilibre). La technique et le temps de mélange ainsi que le temps de vieillissement peuvent influencer sur la toxicité du mélange (USEPA, 1994a, 2000). Aucune méthode normalisée de préparation ne peut être recommandée pour le moment, mais des techniques déjà éprouvées ou considérées comme adéquates pour enrichir un sédiment destiné à des essais toxicologiques avec *H. azteca* sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

Divers documents (EC, 1994, 1995; USEPA, 2000, 2001; ASTM, 2008) donnent plus de précisions sur l'enrichissement et l'homogénéisation des sédiments, et il est conseillé de les consulter. Les chercheurs qui se proposent d'utiliser dans des essais toxicologiques un ou des mélanges préparés en laboratoire devraient faire preuve de prudence et être au fait des éventuels problèmes de non-homogénéité de ce ou ces mélanges, des modifications que cela entraîne dans la biodisponibilité ou la sorption et de la non-linéarité possible des réactions toxiques (Nelson et coll., 1994).

La méthode d'enrichissement d'un sédiment dépend des objectifs de l'étude et de la nature de la substance ou matière d'essai à ajouter au sédiment témoin ou autre. Souvent, on prépare une *solution mère* de substance chimique et on en incorpore un ou plusieurs volumes mesurés dans un sédiment témoin (Swartz et coll., 1985b, 1988; ASTM, 1991a, 1993). La plupart du temps, on exprime la concentration dans le sédiment en microgrammes par gramme ($\mu\text{g/g}$) ou en milligrammes par kilogramme (mg/kg) de poids sec (Swartz et coll., 1985b, 1988), mais la concentration mesurée en fonction du poids humide pourrait s'avérer plus utile pour corrélérer les résultats avec la toxicité du sédiment (Burton, 1991). Selon la nature de la substance

ou matière d'essai et les objectifs de l'essai, on pourrait aussi exprimer les concentrations en fonction de la teneur du sédiment en carbone organique (p. ex., pour évaluer la toxicité des composés organiques non polaires) ou en sulfures volatils acides (p. ex., pour évaluer la toxicité des métaux) (Di Toro et coll., 1990, 1991; ASTM, 1991a, 1993; USEPA, 1994a, 2000).

Pour préparer des solutions mères, le solvant de premier choix est l'eau d'essai (v. 2.3.4 et 3.4); on devrait éviter les solvants autres que l'eau, sauf en cas de nécessité absolue. Afin de diluer les composés organiques ou autres peu solubles dans l'eau d'essai, on peut utiliser un solvant organique miscible dans l'eau pour faciliter leur dispersion dans l'eau (Borgmann et coll., 1990; ASTM, 1991a, 1993; USEPA, 1994a, 2000). On a recommandé le triéthylèneglycol en raison de sa faible toxicité pour les organismes aquatiques, sa faible volatilité et sa grande capacité de dissoudre de nombreuses substances chimiques organiques (ASTM, 1991a, 1993). D'autres solvants tels que le diméthylsulfoxyde, le méthanol, l'éthanol ou l'acétone peuvent servir à préparer les solutions mères de substances chimiques organiques, mais ces solvants peuvent contribuer à la toxicité de l'échantillon, modifier les propriétés du sédiment ou s'échapper du milieu d'essai en raison de leur volatilité. On ne devrait pas utiliser de surfactifs (ASTM, 1991a, 1993).

Si on utilise un solvant organique, l'essai doit comporter un sédiment témoin non contaminé (c.-à-d. sans solvant ni substance d'essai) et un sédiment témoin contenant le solvant. Ce *témoin sédiment-solvant* doit renfermer le solubilisant à la concentration maximale qu'il atteint dans le mélange de sédiment et de substance chimique d'essai. Le solvant doit provenir du lot qui a servi à préparer la solution mère (ASTM, 1991a, 1993; USEPA, 1994a, 2000).

On devrait utiliser les solvants avec parcimonie, car ils pourraient contribuer à la toxicité du

sédiment d'essai préparé. La concentration maximale du solvant dans le sédiment ne devrait pas influencer sur la survie ou la croissance de *H. azteca* pendant l'essai. Si on ne connaît pas cette concentration, on devrait effectuer un essai préliminaire, *avec solvant seulement*, à diverses concentrations dans un sédiment témoin, afin de déterminer la concentration avec effet de seuil du solvant qu'on prévoit utiliser dans l'essai définitif. Afin de réduire la possibilité d'introduire des artefacts liés au solvant, la procédure d'enrichissement devrait inclure une étape permettant au solvant de s'évaporer avant l'ajout de sédiment et d'eau (USEPA, 2001; ISO, 2011). Ainsi, on peut utiliser une technique d'enduction de la substance chimique (dissoute dans un solvant) sur du sable siliceux ou sur les parois d'un récipient, puis on laisse le solvant s'évaporer lentement avant l'ajout du sédiment humide. La substance chimique de la surface sèche sera ensuite sorbée sur ce dernier (USEPA, 2001).

Le mélange des volumes mesurés de solution mère de la ou des substances chimiques d'essai avec un sédiment témoin ou un autre sédiment devrait être homogène. L'enrichissement d'un sédiment sec ou humide est de pratique courante, mais il est recommandé d'utiliser un sédiment humide pour éviter les pertes de substance chimique d'essai et/ou l'altération des caractéristiques physicochimiques tant de la substance que du sédiment. Diverses méthodes d'enrichissement sont présentées dans USEPA (2001). Le mélange peut se faire à la main (p. ex., à l'aide d'une spatule ou d'une tige de verre propre) ou par roulage (p. ex., avec un dispositif mélangeur; Ditsworth et coll., 1990). Parmi les autres techniques recommandées (USEPA, 2001; ISO, 2011), on compte l'enrichissement d'une suspension de sédiment (Cairns et coll., 1984; Stemmer et coll., 1990; Landrum et Faust, 1991) ou d'une boue de sédiment (Birge et coll., 1987). D'autres méthodes pourraient se révéler acceptables, à la condition que la substance chimique soit uniformément répartie dans le sédiment. Pour

chaque traitement inclus dans l'essai, il faut uniformiser les conditions du mélange, y compris le ratio solution-sédiment ainsi que la durée et la température du mélange et de l'imprégnation. C'est le degré d'homogénéité atteint qui dicte la durée du mélange du sédiment enrichi. Cela peut prendre de quelques minutes à 24 h. L'opération devrait se faire à basse température afin de réduire au minimum l'altération physicochimique du mélange et l'activité microbienne. Il est conseillé d'analyser des sous-échantillons du sédiment enrichi afin de déterminer le degré de mélange et d'homogénéité (Ditsworth et coll., 1990; USEPA, 1994a, 2000).

Certaines études pourraient n'exiger qu'une concentration d'un mélange de sédiment témoin (ou autre) et de substance chimique, ou encore une seule concentration de sédiment contaminé ou de déchet particulaire dans un sédiment témoin ou autre. Par exemple, on pourrait effectuer un essai à concentration unique afin de déterminer si une concentration donnée de substance chimique ou de déchet particulaire dans un sédiment non contaminé est toxique pour *H. azteca*. Un tel essai pourrait servir à des fins réglementaires ou à la recherche (on trouvera en 5.6 des indications sur les approches statistiques connexes aux essais à concentration unique).

On devrait exécuter, dans des conditions normalisées, un essai à concentrations multiples sur un sédiment témoin ou autre afin de déterminer les paramètres (p. ex., CL_{50} , CI_p ; v. 6.5) de chaque mélange de substance chimique et de sédiment. Un essai à concentrations multiples sur un sédiment témoin enrichi avec un déchet particulaire donné pourrait aussi convenir. Il faut alors prévoir ≥ 7 concentrations, plus un témoin; il est recommandé d'utiliser un plus grand nombre de concentrations (soit ≥ 10 , plus des sédiments témoins) pour améliorer la probabilité d'atteindre les valeurs établies en regard de chaque paramètre. On peut se servir d'une série

de dilutions géométriques, où chaque concentration de substance chimique ou de déchet particulaire dans le sédiment correspond à au moins la moitié de la précédente dans la série (p. ex., 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63 mg/kg)⁸⁶. Les dilutions peuvent aussi

être logarithmiques (v. annexe I). Pour déterminer la plage de concentrations qui convient, on peut effectuer un essai préliminaire englobant une plage plus étendue.

Les essais destinés à évaluer la toxicité de mélanges d'une ou de plusieurs substances ou matières d'essai dans un sédiment témoin aux fins d'une homologation fédérale ou de l'application d'un règlement doivent comprendre ≥ 5 répétitions de chaque concentration à analyser et de chaque sédiment témoin à inclure dans l'essai. Comme l'objet d'un essai à concentrations multiples est de déterminer à la fois la CL_{50} (données sur la mortalité) et la CI_p (données sur le poids sec), il est recommandé d'utiliser 10 concentrations plus un ou des témoins. On pourrait réduire le nombre de répétitions par traitement ou n'utiliser aucune répétition dans le cas d'essais préliminaires. On pourrait faire de même, selon les écarts prévus entre les récipients d'essai d'un traitement, s'il s'agit d'essais préalables exécutés à des fins non réglementaires ou de recherche.

Il faut prévoir un temps d'équilibre afin que la concentration de la ou des substances chimiques d'essai puisse se stabiliser dans les espaces interstitiels du sédiment. Ce temps dépend avant tout de la nature de la ou des substances d'essai ainsi que du type de sédiment (p. ex., un sédiment sableux ou un sel inorganique exige un temps d'équilibre moins long qu'un sédiment ayant une teneur élevée en argile ou qu'un composé organique) (USEPA, 2001; ISO,

⁸⁶ Dans un sédiment, la concentration s'exprime normalement en $\mu\text{g/g}$ ou en mg/kg de poids sec ou humide. Dans l'eau de porosité, elle peut parfois s'exprimer en $\mu\text{g/L}$ ou en mg/L .

2011). Il est recommandé, conformément à un usage répandu (USEPA, 1994a, 2000), de laisser vieillir les mélanges de sédiment enrichi pendant 4 semaines avant la mise en route d'un essai. Même si de nombreuses études ont débuté dans les heures ou les jours qui ont suivi la préparation des mélanges enrichis, il est possible que ces délais courts et variables ne permettent pas aux substances chimiques mélangées avec le sédiment témoin de s'équilibrer. En prévoyant un vieillissement systématique de 4 semaines avant l'essai toxicologique, on assurerait une certaine normalisation des comparaisons intralaboratoires et interlaboratoires des résultats des essais sur un sédiment enrichi.

Immédiatement après sa préparation, chaque mélange devrait être transféré dans un récipient convenable, qu'on fermera hermétiquement (sans espace d'air) et qu'on entreposera dans l'obscurité à 4 ± 2 °C (v. 5.2) pendant 4 semaines avant son emploi.

Selon les objectifs de l'essai, il pourrait être souhaitable de déterminer l'effet des caractéristiques du sédiment (p. ex., granulométrie ou teneur en matière organique) sur la toxicité des mélanges de substance chimie et de sédiment. Par exemple, on pourrait mesurer l'influence de la granulométrie du sédiment sur la toxicité de la substance par des essais parallèles à concentrations multiples sur une série de mélanges de la substance chimie dans différentes fractions (c.-à-d. des grains de diverses tailles) ou dans différents types de sédiment témoin naturel ou artificiel (v. 3.5). De même, on pourrait déterminer dans quelle mesure la teneur en matière organique du sédiment peut modifier la toxicité de la substance chimie en exécutant des essais parallèles à concentrations multiples sur différents mélanges de substance chimie et de sédiment préparés avec une série de sédiments témoins enrichis avec une matière organique. On devrait intégrer dans l'essai, en tant que témoin, chaque fraction ou préparation de sédiment témoin naturel ou artificiel utilisée pour préparer ces mélanges.

Certains essais pourraient exiger la mesure de l'effet sur la survie et la croissance de *H. azteca*, à la fin de l'essai, d'une ou de plusieurs concentrations de substances chimiques données introduites dans les récipients d'essai sous forme de solutions recouvrant le sédiment. La procédure de préparation de ces concentrations pourrait varier selon les objectifs de l'étude. Par exemple, après avoir ajouté avec soin la ou les solutions d'essai dans des récipients d'essai de répétition renfermant une couche de sédiment témoin ou autre (p. ex., prélevé sur le terrain), on pourrait soit ne pas mélanger ni perturber le sédiment et la ou les solutions d'essai, soit agiter pendant une période déterminée la ou les solutions d'essai, en présence du sédiment, avant d'y transférer les organismes expérimentaux. Les interactions entre la ou les substances chimiques et le sédiment pourraient différer considérablement selon l'approche retenue et aboutir à des résultats notablement différents. Pour préparer chaque solution d'essai, on devrait utiliser, sauf indication contraire, de l'eau d'essai dont la température a été ajustée à 23 ± 1 °C (v. 6.3). Il faut préparer et traiter de la même façon tous les témoins, y compris, le cas échéant, les témoins du solvant. On devrait se conformer aux indications fournies plus haut sur l'emploi de solvants autres que l'eau pour préparer des témoins du solvant.

6.3 Eau d'essai et eau témoin/ de dilution

Normalement, on devrait utiliser de l'eau d'essai non contaminée pour préparer les solutions mères ou les solutions d'essai et pour les essais de 14 jours sur un sédiment enrichi (v. 3.4). Cette eau peut être reconstituée ou naturelle. Il n'est pas obligatoire qu'elle soit identique à l'eau d'élevage des organismes expérimentaux (v. 2.3.4). Si on vise un haut degré de normalisation, une eau reconstituée d'une dureté de 120-140 mg de CaCO₃ par litre est recommandée (v. 2.3.4; Borgmann, 1996). Par exemple, il est recommandé d'utiliser

une eau reconstituée standard lorsqu'il faut évaluer la toxicité mesurée du mélange de substance chimique et de sédiment et comparer les données toxicologiques à celles que des laboratoires d'essais ont recueillies sur la toxicité de la même substance ou d'autres substances.

6.4 Observations et mesures

Lors de la mise sur pied de l'essai, on devrait rédiger une description qualitative de chaque mélange de sédiment enrichi et de l'eau sus-jacente. Cette description pourrait inclure des observations sur la couleur, la texture et l'homogénéité apparente du sédiment, de même que sur la couleur et l'opacité de l'eau sus-jacente. Toute modification de l'aspect du mélange ou de l'eau sus-jacente observée au cours de l'essai ou à la fin devrait être consignée. On devrait procéder à des mesures de la qualité de chaque mélange de sédiment enrichi (y compris le sédiment témoin) et de l'eau sus-jacente et consigner ces mesures selon les modalités décrites en 4.5, 5.2 et 5.5.

Si on dispose de la capacité d'analyse voulue, il est recommandé d'analyser les solutions mères, l'eau sus-jacente, le sédiment, l'eau de porosité et les solutions d'essai (le cas échéant) afin de mesurer les concentrations des substances chimiques et de déterminer si le sédiment a été enrichi de façon satisfaisante. Pour ce faire, on devrait en prélever des aliquotes au moins aux concentrations élevée, moyenne et faible, au début et à la fin de l'essai. On devrait préserver, entreposer et analyser ces aliquotes selon des méthodes adéquates et éprouvées.

À moins d'avoir de bonnes raisons de croire que les mesures ne sont pas exactes, on devrait calculer et exprimer les résultats des essais toxicologiques en fonction des concentrations moyennes mesurées pour le sédiment entier ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ou mg/kg de poids sec) et pour l'eau de porosité ($\mu\text{g}/\text{L}$ ou mg/L). Les résultats devraient être calculés et exprimés de la même façon dans

le cas des concentrations de substances chimiques ajoutées à l'eau sus-jacente; de plus, il faudrait calculer et consigner les concentrations moyennes mesurées dans les solutions d'essai recouvrant le sédiment (EC, 1992a).

6.5 Paramètres et calculs

Les paramètres des essais à concentrations multiples sur des mélanges de sédiment enrichi sont la CL_{50} 14 jours pour ce qui concerne la mortalité et la CI_p 14 jours basée sur le poids sec. Les paragraphes qui suivent présentent un survol des statistiques et des programmes convenant au calcul de ces paramètres. La sous-section 5.6 renferme des indications sur le calcul et la comparaison des paramètres des essais à concentration unique sur des mélanges de sédiment enrichi. On trouvera dans EC (2007) de plus amples informations sur les statistiques paramétriques ou non paramétriques applicables aux données sur les paramètres.

Dans un essai à concentrations multiples (p. ex., sur un sédiment enrichi), les paramètres statistiques exigés sont : 1) la CL_{50} (et ses limites de confiance à 95 %) pour ce qui concerne la mortalité de *H. azteca*; 2) la CI_p (et ses limites de confiance à 95 %) fondée sur la croissance (c.-à-d. le poids sec des amphipodes survivants à la fin de l'essai). On trouvera dans EC (2007) des conseils pour le calcul de la CL_{50} et de la CI_p , accompagnés d'organigrammes facilitant le choix des tests statistiques appropriés. Tous les tests statistiques utilisés pour estimer les paramètres exigent la saisie des concentrations sous forme de logarithme.

Il est vivement recommandé, pour avoir une représentation visuelle des données et vérifier si les résultats obtenus sont raisonnables par comparaison avec des calculs statistiques ultérieurs, de commencer par porter sur un graphique les données brutes (pourcentage de mortalité et poids sec) en fonction du logarithme

des concentrations⁸⁷. Il faut résoudre tout écart important entre la CI_p déterminée de façon approximative par la méthode graphique et celle calculée ultérieurement à l'aide d'un programme informatique. Le diagramme permettrait également de déterminer si on a obtenu une relation logique entre la concentration logarithmique (ou, dans certains cas, la concentration) et l'effet, une caractéristique souhaitable d'un essai valide (EC, 2007).

L'optimisation du calcul de la CL_{50} (et ses limites de confiance à 95 %) se fonde sur le nombre d'effets partiels observés (EC, 2007). En résumé, on privilégiera la méthode de la régression probit et/ou logit si on observe deux effets partiels, le test de *Spearman-Kärber* si un seul effet partiel est observé et la méthode binomiale si aucun effet partiel n'est observé (méthode générale « par défaut »).

L'analyse de régression constitue la principale technique statistique à utiliser pour calculer la CI_p ^{88, 89}, à la condition de satisfaire aux

hypothèses exposées ci-dessous. Un certain nombre de modèles permettent d'évaluer par régression les données sur le poids sec (au moyen d'un test statistique *quantitatif*). Pour que la régression puisse être utilisée, les données doivent satisfaire aux hypothèses de normalité et d'homoscédasticité.

On peut appliquer des techniques de pondération pour satisfaire à l'hypothèse d'homoscédasticité. Il convient aussi d'examiner les données afin de détecter les valeurs aberrantes, à l'aide d'une des techniques recommandées (v. 10.2 dans EC, 2007). Il faut tenter d'ajuster plus d'un modèle aux données. Enfin, on doit retenir le modèle présentant le meilleur ajustement⁹⁰ comme étant celui qui convient le mieux à l'estimation de la CI_p et ses limites de confiance à 95 %. Le critère d'information d'Akaike (ou l'équivalent, comme le critère bayésien d'information) constitue le premier choix pour déterminer le meilleur ajustement du modèle⁹¹. Les paramètres estimés par régression doivent être

⁸⁷ Au lieu de représenter graphiquement les données brutes, l'expérimentateur pourrait choisir de calculer et de porter sur un diagramme le pourcentage d'inhibition à chaque concentration d'essai; la valeur obtenue correspond à l'écart entre la réponse moyenne des témoins et la réponse au traitement (réponse moyenne des témoins, moins réponse moyenne au traitement, au numérateur), divisé par la réponse moyenne des témoins (au dénominateur) et exprimé en pourcentage (multiplié par 100 %). On porte la valeur correspondant à chaque traitement sur un diagramme, en fonction de la concentration (v. ASTM, 1991a, pour de plus amples détails). L'axe des x représente la concentration logarithmique ou, dans certains cas, la concentration, selon les préférences et les objectifs de l'expérimentateur. Par exemple, en employant une échelle logarithmique, on s'adaptera aux échelles des données de régression, mais on pourrait, pour plus de clarté, employer la concentration dans le rapport final. Pour améliorer l'utilité du diagramme comme moyen de visualiser les données, l'expérimentateur pourrait choisir de représenter aussi la courbe de régression ainsi que les données brutes.

⁸⁸ La CI_p est la *concentration inhibitrice* correspondant à un *pourcentage* d'effet précisé. Le « p » représente un pourcentage fixe d'inhibition choisi par l'expérimentateur. En règle générale, sa valeur est établie à 25 % ou à 20 %.

⁸⁹ Par le passé, les expérimentateurs ont souvent analysé des paramètres sublétaux *quantitatifs*, obtenus d'essais à concentrations multiples, en calculant la *CSEO* et la *CMEO*. Ces paramètres statistiques présentent notamment l'inconvénient de dépendre des concentrations d'essai choisies et de ne pas donner une idée de la *précision* (en d'autres termes, on ne peut en tirer aucune limite de confiance à 95 % ou à un autre seuil) (v. 7.1 dans EC, 2007). C'est à cause de ces inconvénients que la CI_p constitue le paramètre statistique exigé pour les données sur le poids sec tirées d'un essai à concentrations multiples avec *H. azteca*.

⁹⁰ Comme il est indiqué à la sous-section 6.5.8 de EC (2007), il faut utiliser les cinq modèles suivants d'analyse de régression pour estimer la CI_p : les modèles linéaire, logistique, gompertzien, exponentiel et hormétique (ce dernier étant un modèle logistique adapté au phénomène d'*hormèse* se manifestant à de faibles concentrations). EC (2007) fournit également (en 6.5.8 et à l'annexe O) le formalisme mathématique précis de chaque modèle, y compris des exemples pratiques pour un progiciel de statistiques commun.

⁹¹ L'erreur quadratique moyenne résiduelle, qui était auparavant recommandée à cette fin, peut être utilisée comme deuxième choix.

encadrés par les concentrations utilisées dans l'essai; l'extrapolation des paramètres au-delà de la concentration d'essai maximale ne constitue pas une pratique acceptable.

Si tous les *H. azteca* mouraient dans une répétition donnée pendant l'essai, il n'y aurait aucune mesure du poids ni aucune saisie de données (en d'autres termes, ce serait une répétition « manquante », conformément à la première option décrite en 8.2 dans EC, 2007). Selon cette option, la mortalité serait analysée séparément. Par contre, les objectifs de l'étude pourraient inciter l'expérimentateur à combiner les paramètres du poids et de la mortalité [c.-à-d. la *biomasse* ou le poids total de tous les amphipodes survivants, divisé par le nombre de juvéniles au début de l'essai dans la répétition (v. la note de bas de page n° 54), conformément à l'option 3 décrite en 8.3 dans EC, 2007].

La capacité de décrire mathématiquement l'*hormèse* (c.-à-d. la stimulation des organismes ou une réponse de ces derniers meilleure que celle du témoin et qui ne se produit qu'à de faibles concentrations) dans la courbe dose-réponse a été intégrée dans les modèles récents de régression pour les données

quantitatives (v. 10.3 dans EC, 2007). Les données hormétiques peuvent être saisies directement puisque le modèle peut s'adapter à tous les points de données et les intégrer; il n'y a pas d'échantillonnage des points de données révélant une réponse hormétique.

Si les données ne se prêtent pas à la régression (parce que les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité ne peuvent être satisfaites), on peut se servir de l'interpolation linéaire (p. ex., le programme ICPIN; v. 6.4.3 dans EC, 2007) pour estimer une CI_p . Si les données sont hormétiques et que le programme ICPIN est utilisé, les réponses des organismes témoins doivent être prises en compte pour les concentrations donnant lieu à une hormèse (option 4, sous-section 10.3.3, EC, 2007).

Dans tout essai incluant un *témoin sédiment-solvant* (v. 6.2), il faut examiner les résultats (survie et poids sec final) obtenus pour ce témoin et pour le *sédiment témoin non contaminé* afin de déterminer s'ils sont indépendamment conformes aux critères de validité de l'essai (v. 4.7). Si ces critères ne sont pas satisfaits pour l'un ou l'autre témoin, on doit considérer que les résultats de l'essai sont

invalides. S'ils sont satisfaits dans les deux cas, il faut comparer les résultats obtenus à l'aide du *test t*. Si les résultats pour les deux témoins ne sont pas statistiquement différents, on devrait utiliser seulement les données relatives au *sédiment témoin non contaminé* pour le calcul des résultats de l'essai⁹². Toutefois, si le taux de survie ou le poids sec final diffère grandement entre les deux témoins, cela pourrait indiquer l'existence d'une interférence possible du solvant, et on devrait alors procéder à une évaluation supplémentaire pour en mesurer l'incidence sur la validité de l'essai. On trouve dans USEPA (2008) des indications sur ce que pourrait inclure une telle évaluation : 1) degré de pertinence de la réponse dans le témoin sédiment-solvant (à savoir le pourcentage de changement par rapport à la réponse dans le sédiment témoin); 2) degré de signification

statistique connexe à la différence entre les deux témoins (c.-à-d. écart hautement ou très peu significatif); 3) ampleur de l'interférence (réponses différentes pour les deux paramètres ou pour un seul); 4) examen de toute autre cause potentielle de l'interférence observée dans le témoin sédiment-solvant; 5) incidence de cette interférence possible sur l'incertitude de l'estimation du risque. Si on détecte une interférence attribuable au solvant, le témoin sédiment-solvant devrait servir de base au calcul des résultats.

Les calculs suivants doivent être effectués et consignés pour chaque concentration d'essai, y compris le ou les traitements témoins : 1) taux de survie moyen (\pm ET) de *H. azteca*, à la fin de l'essai; 2) poids sec moyen (\pm ET) des *H. azteca* survivants, à la fin de l'essai.

⁹² L'USEPA recommande de ne pas utiliser les données relatives au témoin sédiment-solvant pour le calcul des résultats parce qu'il faut alors partir de l'hypothèse selon laquelle les effets du solvant et du toxique sont indépendants les uns des autres et que les plans d'expérience actuels ne permettent pas de vérifier cette hypothèse (K. Sappington, Office of Pesticide Programs, USEPA, Washington, DC, comm. écrite, 2012).

Section 7

Modes opératoires pour les essais de 14 jours dans l'eau seulement

La présente section renferme des instructions générales pour les essais de 14 jours sur des échantillons d'effluent, de lixiviat, d'élutriat, d'eau réceptrice et de substance chimique, appelés *essais dans l'eau seulement*, en vue de mesurer la survie et la croissance de *H. azteca*. Ces instructions s'ajoutent à celles fournies dans la section 4 pour les essais sur un sédiment. Pour des raisons pratiques, le terme « eau » dans la désignation de ce type d'essai englobe toute matière aqueuse semblable à l'eau, notamment un effluent, un lixiviat, un élutriat ou une eau réceptrice.

7.1 Aspects généraux des modes opératoires

L'essai décrit dans la présente section porte sur la survie et la croissance de *H. azteca* dans l'eau seulement. Il se fonde sur deux méthodes : 1) un essai de 10 jours dans l'eau seulement, mis au point par Borgmann et coll. (2005b) pour la mesure de la survie uniquement; 2) un essai de 14 jours sur un sédiment (y compris un essai toxicologique de référence de 4 jours dans l'eau seulement; v. 4.8). Les modes opératoires ont été conçus et perfectionnés (Aquatox Testing and Consulting Inc., 2010; P. Jackman, LEEA, comm. pers., 2012) afin qu'on puisse disposer d'un outil utilisable seul ou parallèlement à un essai de 14 jours sur un sédiment avec *H. azteca*, dans le but de faciliter la distinction entre les effets attribuables au sédiment (p. ex., dépôt historique) et ceux causés par les contaminants dans la colonne d'eau (p. ex., eau réceptrice en aval d'un point de rejet d'eaux usées). Cet outil peut être appliqué utilement dans la recherche des causes, notamment aux termes du programme d'Étude de suivi des effets environnementaux, où la source d'impact est connue. Des indications générales sont fournies quant à l'application de l'essai de

survie et de croissance d'amphipodes exposés pendant 14 jours à des échantillons liquides, essai qui prévoit un renouvellement intermittent (soit 3 fois par semaine en des journées non consécutives). Il convient à des échantillons d'effluent industriel ou d'eaux usées, d'eau douce (p. ex., une eau réceptrice) ou d'extraits aqueux, ou encore de substances chimiques solubles ou pouvant être maintenues sous forme de suspension (dispersion) stable dans les conditions de l'essai.

Les échantillons devraient être mis à l'essai selon les modes opératoires universels décrits dans la section 4. On devrait se conformer aux autres indications fournies dans la section 6 en ce qui concerne les essais dans l'eau seulement sur des substances chimiques.

7.2 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons

Les procédures générales d'étiquetage, de transport et d'entreposage des échantillons d'eau (p. ex., effluent, élutriat, lixiviat ou eau réceptrice) et de substances chimiques sont décrites en 5.2 et 6.1, respectivement. Pour les échantillons d'eau, on recommande d'utiliser des contenants souples en polyéthylène ou en polypropylène servant au transport d'eau potable (p. ex., récipients en plastique Reliance^{MC}). Leur volume peut se contracter pour s'adapter aux glacières servant au transport, et le volume d'air intérieur peut être maintenu au minimum lorsqu'on y prélève des fractions de l'échantillon au laboratoire en vue d'essais toxicologiques ou d'analyses chimiques. Les plages de température pour les échantillons d'eau sont indiquées en 5.2; les échantillons ne doivent pas geler, même partiellement, pendant

le transport ou l'entreposage. On doit mesurer et consigner la température des échantillons à leur arrivée au laboratoire.

La plupart des essais sur un effluent, un lixiviat ou un éluatriat seront exécutés « hors site », dans des conditions de laboratoire contrôlées, selon l'une ou l'autre des procédures suivantes :

- 1) Un seul échantillon peut être utilisé pendant tout l'essai. Toutefois, il doit être réparti dans ≥ 3 récipients distincts (ce qui donne ≥ 3 sous-échantillons) dès son prélèvement ou pendant sa préparation dans le cas d'un éluatriat. Le premier sous-échantillon doit servir à la mise en route de l'essai (jour 0) et aux deux premiers renouvellements; le deuxième sert aux troisième et quatrième renouvellements, et le troisième, aux cinquième et sixième renouvellements.
- 2) Lorsqu'on sait ou prévoit que la toxicité des échantillons d'eaux usées s'altérera grandement pendant un entreposage de $\leq 10-14$ jours, il faut prélever des échantillons frais (ou en préparer dans le cas d'un éluatriat) à ≥ 3 occasions distinctes, à des intervalles de $\leq 4-6$ jours. Si 3 échantillons sont prélevés à ces intervalles (p. ex., le lundi et le vendredi de la première semaine de l'essai et le mardi ou le mercredi de la deuxième semaine), le premier doit servir à la mise en route de l'essai (jour 0) et aux deux premiers renouvellements, le deuxième, aux troisième et quatrième renouvellements, et le troisième, aux cinquième et sixième renouvellements. Lorsqu'on sait ou prévoit que les caractéristiques chimiques des eaux usées seront particulièrement instables lors de l'essai hors site, on pourrait prélever des échantillons pendant 14 journées consécutives et utiliser chacun une seule fois, dans l'ordre des prélèvements.

Si l'essai est exécuté sur le site dans des installations contrôlées (p. ex., un laboratoire portable ou industriel), on devrait prélever des échantillons frais et les utiliser dans les 24 h pour chaque renouvellement de la solution d'essai (EC, 2011).

Lorsqu'on opte pour la première procédure, un échantillon de 60-80 L convient habituellement à un essai à concentrations multiples exécuté hors site et aux analyses habituelles connexes. Si la deuxième procédure est retenue, un volume de 10-15 L par échantillon (soit pour chacun des 3 échantillons exigés pour l'essai) devrait suffire dans la plupart des cas. On pourrait avoir besoin de volumes plus élevés d'effluent si les renouvellements sont plus fréquents (c.-à-d. >3 fois par semaine) et de volumes moins élevés pour les essais à concentration unique (v. section 5).

Dans la mesure du possible, l'essai sur un effluent, un lixiviat ou une eau réceptrice devrait commencer dans les 24 h suivant le prélèvement, et obligatoirement dans les 3 jours qui suivent. Les échantillons de sédiment ou d'une autre matière solide dont on extrait un éluatriat aux fins d'un essai devraient aussi être soumis à un essai le plus tôt possible (préférentiellement dans la semaine suivant le prélèvement, mais au plus tard dans les 10 jours qui suivent). On devrait se conformer aux méthodes décrites dans EC (1994) pour la préparation d'un éluatriat. L'essai sur un éluatriat doit commencer dans les 3 jours suivant la préparation de celui-ci ou dans les délais fixés dans un règlement ou un *protocole*.

7.3 Préparation des solutions d'essai

Juste avant le transvasement, chaque contenant renfermant un échantillon ou sous-échantillon d'eau doit être agité vigoureusement à des fins d'homogénéisation et de remise en suspension des matières décantables. Selon la nature de l'échantillon et les objectifs de l'essai, l'homogénéisation pourrait ne pas être requise.

Tout mélange doit être exécuté à fond. Les sous-échantillons (c.-à-d. l'échantillon réparti dans ≥ 2 contenants) doivent être mélangés ensemble et bien homogénéisés. Si la période d'entreposage doit être prolongée, on devrait auparavant transférer de nouveau l'échantillon composite (ou une partie de celui-ci) dans les récipients dans lesquels il était réparti. Juste avant l'emploi, il faut mesurer la teneur en OD et le pH de chaque échantillon. Au besoin, chaque solution d'essai devrait être aérée (v. 7.5.1) avant d'être répartie dans les récipients d'essai de répétition.

Il n'est habituellement pas nécessaire (ni recommandé) de filtrer les échantillons ou sous-échantillons d'eau. Toutefois, s'ils renferment des organismes susceptibles d'être confondus avec les amphipodes, de les attaquer ou de leur livrer une compétition trophique, ils doivent être passés à travers un tamis à mailles de 60 μm avant l'emploi (USEPA, 2002). Cette filtration pourrait avoir pour effet de supprimer des solides en suspension qui sont caractéristiques de l'échantillon ou du sous-échantillon et qui pourraient en accroître ou en altérer la toxicité. Si on se préoccupe des effets de la filtration sur la toxicité, un deuxième essai devrait être exécuté en parallèle sur une portion non filtrée de l'échantillon ou du sous-échantillon.

On prépare habituellement les solutions d'essai de la ou des substances chimiques en ajoutant des aliquotes d'une solution mère constituée d'eau témoin/de dilution. Aussi, pour les solutions concentrées ou les échantillons volumineux, on peut ajouter des quantités mesurées (à l'aide d'une balance de précision) de la ou des substances à l'eau témoin/de dilution afin d'obtenir des valeurs nominales pour les essais. Si on utilise des solutions mères, on devrait déterminer avant l'essai la concentration et la stabilité de la ou des substances chimiques d'essai dans la solution. Les solutions mères sensibles à la photolyse devraient être protégées contre la lumière.

Celles dont les caractéristiques chimiques sont instables doivent être préparées 3 fois par semaine ou aussi souvent que nécessaire afin que leur concentration reste uniforme d'un renouvellement à un autre. On devrait préparer les solutions mères selon les indications fournies en 6.2. On ne devrait pas employer de solvants organiques, d'*émulsifiants* ou de *dispersants* pour accroître la solubilité des substances chimiques, sauf en cas de nécessité absolue ou s'ils entrent dans la préparation commerciale habituelle de la substance chimique d'essai. Si une solution témoin supplémentaire est utilisée, elle doit avoir la même teneur en agent solubilisant que la solution la plus concentrée de la substance chimique d'essai. De tels agents devraient être employés avec parcimonie, leur concentration ne dépassant pas 0,1 mL/L de toute solution d'essai. Si des solvants sont utilisés, on privilégiera ceux décrits en 6.2.

Pour tout essai destiné à estimer la CL_{50} (mortalité) et la CI_p (poids sec; v. 6.5), il faut préparer ≥ 7 concentrations d'essai plus une solution témoin (constituée exclusivement d'*eau de dilution*) – on conseille d'en préparer un plus grand nombre (≥ 8 , plus un témoin), comme pour les essais sur un sédiment (v. 6.2). Il faut prévoir pour chaque *traitement*, y compris pour le ou les témoins, ≥ 5 répétitions si des estimations ponctuelles doivent être faites (c.-à-d. la CL_{50} et la CI_p ; v. 6.2 et 6.5).

Pour chaque essai définitif, on doit préparer une ou des solutions témoins en même temps que les traitements expérimentaux, et le nombre de répétitions doit correspondre au nombre de solutions (v. 7.4). Si on a utilisé une eau de dilution pour préparer les concentrations d'essai, on doit aussi s'en servir pour préparer un jeu de témoins. On doit mélanger soigneusement chaque solution d'essai à l'aide d'une tige de verre, d'une barre d'agitation en Téflon^{MC} ou d'un autre dispositif fait d'un matériau non toxique. La température doit être ajustée au besoin à 23 ± 2 °C.

7.4 Eau témoin/de dilution

Pour les essais sur des échantillons d'effluent, de lixiviat ou de substances chimiques, l'eau témoin/de dilution devrait soit avoir la même origine que l'eau ayant permis antérieurement au laboratoire d'obtenir des résultats valides dans un essai de 14 jours sur la survie et la croissance de *H. azteca* dans l'eau seulement (p. ex., eau souterraine naturelle, eau de surface, eau reconstituée), soit avoir été prélevée dans l'eau réceptrice à laquelle on s'intéresse particulièrement (v. 2.3.4 et 3.4). Dans le cas d'essais sur des échantillons d'eau réceptrice prélevés dans les environs d'un rejet d'eaux usées, d'un déversement de produits chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination possible, plutôt que d'employer l'eau témoin du laboratoire, on peut échantillonner en parallèle l'eau d'amont et s'en servir comme eau témoin/de dilution des échantillons d'eau d'aval (v. 3.4 et la note de bas de page n° 24). Le choix de l'eau témoin/de dilution est fonction de l'objet de l'essai. Étant donné que les résultats d'un essai peuvent différer selon l'origine de l'eau utilisée, ce choix doit être effectué une fois les objectifs de l'essai arrêtés (v. 5.4 et 6.3). Les difficultés et les coûts associés au prélèvement et à l'expédition des échantillons d'eau réceptrice qui serviront d'eau témoin/de dilution devraient également être pris en considération.

Il pourrait être souhaitable d'employer une eau réceptrice non contaminée ou une eau d'amont comme eau témoin/de dilution si on veut recueillir des informations propres au site quant à l'impact toxique possible d'un effluent, d'un lixiviat, d'un éluat ou d'une substance chimique⁹³ sur une eau réceptrice en particulier

⁹³ Les contaminants déjà présents dans cette eau réceptrice peuvent contribuer à la toxicité de la substance chimique ou des eaux usées sur laquelle porte l'essai. Lorsque c'est le cas, une eau de dilution [reconstituée, naturelle ou déchlorée (du robinet)] non contaminée donnerait une estimation plus précise de la toxicité propre à la substance

(v. 3.4, 5.4 et 6.3). Un essai visant à mesurer un effet subléthal à partir d'un échantillon prélevé à la limite d'une zone de mélange, aux termes d'exigences réglementaires visant un site précis, constituerait un exemple notable d'une telle situation. Il faudrait se conformer aux conditions précisées en 7.2 quant au prélèvement, au transport et à l'entreposage des échantillons de cette eau réceptrice. Tout échantillon d'eau réceptrice ou d'eau d'amont utilisée comme eau témoin/de dilution dans un essai sur un effluent, un lixiviat ou une eau réceptrice devrait être filtré avec un tamis à mailles fines (soit $\leq 60 \mu\text{m}$; EC, 2011), conformément aux recommandations normalisées visant l'eau témoin/de dilution naturelle. Si on utilise un tel échantillon, il faut aussi préparer une solution témoin distincte avec l'eau témoin du laboratoire (p. ex., *eau d'essai* ou eau d'élevage; v. 3.4). Le taux de survie et le poids sec final des *H. azteca* (v. 4.7) dans l'eau témoin du laboratoire doivent être comparés à ceux obtenus pour l'échantillon d'eau réceptrice.

chimique ou à la matière d'essai, mais pas nécessairement de l'effet global sur le site d'intérêt. Lorsque l'essai vise à déterminer l'effet d'une substance chimique ou d'eaux usées en particulier sur une eau réceptrice donnée, il importe peu que ce milieu modifie la toxicité de l'échantillon à cause de la présence d'autres contaminants ou, à l'inverse, de la présence de substances qui réduisent les effets toxiques, comme les acides humiques. Toutefois, étant donné la possibilité d'effets toxiques attribuables à l'eau réceptrice d'amont, l'essai doit inclure, à tout le moins, un deuxième témoin constitué d'eau non contaminée du laboratoire (v. 3.4). On pourrait préparer une deuxième série de concentrations avec l'eau de cette même source utilisée comme diluant.

Une solution de rechange (ou compromis) à l'utilisation d'une eau réceptrice comme eau témoin/de dilution consiste à ajuster le pH et la dureté de l'eau du laboratoire (ou d'une eau reconstituée) pour que leurs valeurs correspondent à celles de l'eau réceptrice. Selon le cas, l'ajustement peut se faire en fonction de moyennes saisonnières ou de valeurs mesurées dans l'eau réceptrice à un moment particulier. Pour ajuster le pH et la dureté de l'eau, on peut ajouter des sels de qualité réactif ou en modifier la quantité et la proportion (v. 2.3.4).

Peu importe le type d'échantillon (p. ex., eau ou substance chimique), de l'eau reconstituée devrait servir d'eau témoin/de dilution pour les essais exigeant un degré élevé de normalisation (v. 3.4). Les cas où une telle utilisation convient incluent les études visant à corrélérer des données toxicologiques sur divers types et sources d'eau

obtenues par un certain nombre de laboratoires d'essais ou un seul laboratoire où la qualité de l'eau est variable. Il est alors souhaitable de réduire au minimum toute influence modificatrice attribuable aux caractéristiques chimiques (variables) de l'eau de dilution.

Tableau 4. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques de 14 jours dans l'eau seulement, avec *H. azteca*

Type d'essai	– essai toxicologique de 14 jours <i>dans l'eau seulement</i> , à renouvellement intermittent
Renouvellement des solutions	– 3 fois par semaine en des journées non consécutives (p. ex., le lundi, le mercredi et le vendredi)
Eau témoin/de dilution	– eau d'élevage ou eau de surface/souterraine non contaminée; <i>eau d'amont</i> pour évaluer un impact toxique à un endroit précis*; eau douce reconstituée si un degré élevé de normalisation est exigé; eau de mer naturelle ou reconstituée d'une salinité de ≤ 15 ‰ pour les essais sur un sédiment estuarien; teneur en OD de 90-100 % de la valeur de saturation
Amphipodes	– issus d'élevages d'âge connu, âgés de <1-7 jours; conservés dans des béciers pendant les 2 jours précédant la mise en route de l'essai et nourris quotidiennement; âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours (écart recommandé : ≤ 2 jours) au début de l'essai; 10 amphipodes par récipient d'essai
Substrat	– substrat obligatoire, identique pour tous les récipients d'essai; au choix : bande de gaze de 3 cm ² , préalablement mise à tremper dans l'eau d'élevage pendant 24 h; morceau de 3 cm ² de tulle de nylon Nitex® ou de mailles en plastique; couche mince de 1-2 mm d'épaisseur (~5 mL) de sable siliceux non contaminé
Récipient d'essai	– bécier ou bocal en verre d'une capacité de 300 mL (recommandé), de forme haute et d'un diamètre intérieur de ≥ 7 cm (recommandé), normalement couvert
Volume de solution d'essai	– 275 mL
Nombre de répétitions	– ≥ 5 par concentration
Nombre de concentrations	– ≥ 7 concentrations, plus un ou des témoins; il est recommandé d'en prévoir davantage (soit >8), plus un ou des témoins
Température	– moyenne quotidienne : 23 ± 1 °C; instantanée : 23 ± 3 °C

- Éclairage – en spectre continu (fluorescent ou l'équivalent), par le haut; 500-1000 lux; photopériode de 16 h
- Oxygénation/aération – normalement aucune; aucune préaération, sauf si la teneur en OD d'une solution d'essai fraîchement préparée est de <40 % ou de >100 % de la valeur de saturation, auquel cas il faut aérer toutes les solutions d'essai pendant ≤ 20 min au taux minimal avant de mettre l'essai en route ou de renouveler les solutions; teneur en OD de 40-100 % de la valeur de saturation pendant tout l'essai, avec renouvellements plus fréquents au besoin pour assurer le maintien de la teneur en OD; aération modérée de tous les récipients seulement si cela permet d'atteindre les objectifs de l'essai
- pH – aucun ajustement si le pH des solutions d'essai est de 6,0-8,0^{**}; un deuxième essai (à pH ajusté) pourrait être indiqué ou requis si le pH se situe en dehors de cette plage
- Alimentation – suspension aqueuse de LCT ou mélange à 50/50 de LCT et de flocons moulus d'aliments pour poissons (du commerce) (p. ex., Nutrafin®, Tetrafin®, TetraMin® ou Zeigler® Aquatox Feed), quotidiennement ou 3 fois par semaine (en des journées non consécutives); 2,7 mg de solides (poids sec) par jour ou 6,3 mg de solides (poids sec) 3 fois par semaine, dans chaque récipient d'essai
- Observations – quotidiennes : nombre d'amphipodes morts ou moribonds dans chaque récipient d'essai; mortalité et poids sec moyen le jour 14
- Mesures de la qualité de l'eau – température quotidienne dans des concentrations représentatives; pH, teneur en OD, conductivité et teneur en ammoniac au début et à la fin de l'essai et après chaque renouvellement de la solution d'essai (c.-à-d. ≥ 3 fois par semaine) dans des concentrations représentatives; recommandé : dureté et/ou alcalinité au début et à la fin de l'essai
- Paramètres – pourcentage moyen de survie et poids sec moyen dans chaque traitement; CL_{50} 14 jours pour les essais à concentrations multiples, le cas échéant; CI_p du gain de poids, le cas échéant
- Toxique de référence – sulfate de cuivre ($CuSO_4$), chlorure de cadmium ($CdCl_2$), chlorure de potassium (KCl) ou chlorure de sodium (NaCl); essai de 96 h dans l'eau seulement pour la CL_{50} , à exécuter dans les 14 jours précédant ou suivant le début de l'essai définitif; organismes expérimentaux provenant d'une source externe : exécuter parallèlement à l'essai définitif un essai de tolérance au toxique de référence avec des amphipodes de ce lot
- Validité de l'essai – essai invalide si la survie moyenne après 14 jours est de <80 % dans l'eau témoin; essai invalide si le poids sec moyen est de <0,1 mg par amphipode dans les groupes témoins des répétitions

Effluents, lixiviats et éluutriats

- Échantillons – soit 3 sous-échantillons d'un seul échantillon, soit 3 échantillons distincts prélevés (ou préparés dans le cas d'un éluutriat) et manipulés conformément aux indications fournies en 7.2; un volume de 60-80 L devrait suffire pour l'essai et

les analyses habituelles; pour les essais exécutés sur le site, échantillons frais prélevés pour chaque renouvellement et utilisés dans les 24 h

- Transport et entreposage – si l'échantillon est tiède ($>7\text{ }^{\circ}\text{C}$), il doit être refroidi dès son prélèvement à une température de $1-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ avec de la glace ordinaire (et non de la glace sèche) ou des blocs réfrigérants; transport dans l'obscurité à $1-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (de préférence $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) – utiliser de la glace ordinaire ou des blocs réfrigérants au besoin; l'échantillon ne doit pas geler pendant le transport ou l'entreposage; entreposage dans l'obscurité à $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$; l'essai devrait débuter dans les 24 h, obligatoirement dans les 3 jours suivant le prélèvement de l'échantillon ou l'extraction de l'élutriat
- Eau témoin/de dilution – conformément aux indications fournies et/ou selon l'objet de l'essai; eau du laboratoire ou eau réceptrice d'amont à des fins de surveillance et/ou de vérification de la conformité
- Solides en suspension – normalement, on ne filtre pas l'échantillon; on peut procéder à un essai parallèle sur un échantillon filtré afin d'évaluer l'incidence de l'enlèvement des solides

Substances chimiques

- Solvant – à utiliser seulement dans des situations particulières; concentration maximale : $0,1\text{ mL/L}$
- Concentration – mesure recommandée au début et à la fin de chaque période de renouvellement, dans des aliquotes des concentrations élevée, moyenne et faible et dans le ou les témoins; si la valeur des concentrations diminue de 20 %, accroître la fréquence des mesures (quotidiennement)
- Eau témoin/de dilution – conformément aux indications fournies et/ou selon l'objectif poursuivi; eau reconstituée si un degré élevé de normalisation est exigé; eau réceptrice si l'impact toxique est préoccupant à l'échelle du site; sinon, eau non contaminée du laboratoire ayant déjà permis de satisfaire aux critères de validité de l'essai

Eau réceptrice

- Échantillons – comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats
- Transport et entreposage – comme pour les effluents, les lixiviats et les élutriats
- Eau témoin/de dilution – conformément aux indications fournies et/ou selon l'objectif poursuivi; eau du laboratoire ou eau réceptrice d'amont pour l'étude de l'impact toxique à l'échelle du site

* Si on utilise de l'eau d'amont, il faut prévoir un témoin supplémentaire provenant d'une source distincte d'eau (naturelle ou reconstituée) ayant permis au laboratoire d'essais d'obtenir régulièrement des résultats valides lors d'essais antérieurs de 14 jours sur la survie et la croissance de *H. azteca* dans l'eau seulement.

** Si le pH se situe à l'extérieur de cette plage, les résultats pourraient refléter une toxicité attribuable à un pH ayant un effet biologique indésirable (v. 1.4 et 3.1).

7.5 Conditions d'essai

Le tableau 4 renferme une liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés et exigés pour les essais toxicologiques de 14 jours dans l'eau seulement, avec *H. azteca*.

La procédure, qui présente de nombreux points communs avec l'essai toxicologique de référence de 96 h dans l'eau seulement (v. 4.8), fait appel à des amphipodes âgés de 2-9 jours et présentant un écart d'âge de ≤ 3 jours (écart recommandé : ≤ 2 jours) au début de l'essai. Il faut prévoir 10 organismes par récipient d'essai et ≥ 5 répétitions par traitement. Les récipients d'essai recommandés sont décrits en 3.3; chacun contient 275 mL de solution. Il faut ajouter dans chacun un substrat qui doit être identique pour toutes les solutions d'essai et répétitions d'un essai donné. On peut choisir l'un ou l'autre des substrats suivants : une bande de gaze de ~ 3 cm², préalablement mise à tremper dans l'eau d'élevage pendant 24 h; un morceau de ~ 3 cm² de tulle de nylon Nitex® ou de mailles en plastique (p. ex., de 500 μ m)⁹⁴; une couche mince (1-2 mm d'épaisseur; ~ 5 mL pour les récipients en verre de forme haute de 300 mL) de sable siliceux non contaminé (v. la note de bas de page n° 27). Le mode de transfert des amphipodes dans les récipients d'essai est décrit en 4.1. La température et l'éclairage sont les mêmes que pour les essais toxicologiques sur un sédiment et les essais avec un toxique de référence dans l'eau seulement (v. 4.2 et 4.8, et tableaux 2 et 3).

⁹⁴ Certaines substances chimiques (comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques) pouvant facilement être adsorbées sur le tulle de nylon, il faut tenir compte des toxiques suspectés (ou connus) au moment du choix du substrat à utiliser pour les essais dans l'eau seulement.

7.5.1 Oxygène dissous et aération

Avant l'essai, on devrait préaérer les solutions d'essai seulement si la teneur en OD mesurée dans une ou des solutions fraîchement préparées est de < 40 % ou de > 100 % de la valeur de saturation. Cette préaération, qui doit avoir lieu avant l'exposition des amphipodes, devrait se faire par l'introduction d'air comprimé exempt d'huile au moyen d'une conduite d'air et d'un tube en plastique ou en verre jetable (p. ex., tube capillaire ou pipette à pointe Eppendorf, avec ouverture de $\sim 0,5$ mm de diamètre). L'aération ne devrait pas excéder 100 bulles/min; la préaération doit être limitée à 20 min et atteindre 40 % de la valeur de saturation dans la concentration d'essai la plus élevée (ou 100 % en cas de sursaturation évidente)⁹⁵. Il faut cesser toute préaération au bout de 20 min. Les solutions d'essai sont alors réparties entre les récipients d'essai de répétition et on met l'essai en route, ou on utilise les solutions pour les renouvellements, que la teneur en OD ait atteint ou non 40-100 % de la valeur de saturation dans toutes les solutions d'essai.

Normalement, on n'aère pas les solutions pendant l'essai, et les récipients d'essai sont couverts pour réduire au minimum l'évaporation. L'utilisation obligatoire d'une eau témoin/de dilution saturée en oxygène et le renouvellement des solutions d'essai 3 fois par semaine conviennent habituellement au maintien d'une teneur en OD supérieure à la

⁹⁵ L'aération peut éliminer les substances chimiques volatiles de la solution ou accroître leur taux d'oxydation et de décomposition en d'autres substances. Cependant, l'aération des solutions d'essai avant l'exposition des amphipodes pourrait s'avérer nécessaire en raison de la demande en oxygène de la matière d'essai (p. ex., diminution de la teneur en oxygène pendant l'entreposage des échantillons). L'aération facilitera également le mélange de la solution d'essai. S'il faut aérer une solution d'essai, toutes les solutions devront être aérées selon la méthode décrite en 7.5.1.

valeur recommandée (soit 40 % de la valeur de saturation). Si la substance ou matière d'essai exerce une forte demande en oxygène, il faudra peut-être prévoir des renouvellements plus fréquents des solutions d'essai afin de maintenir la teneur en OD à ≥ 40 % de la valeur de saturation. Si un renouvellement fréquent ne donne pas les résultats attendus et que les objectifs de l'essai exigent une teneur en OD de ≥ 40 % de la valeur de saturation pour que la toxicité puisse être mesurée, on devrait aérer modérément (v. 4.3) la solution de tous les récipients d'essai, y compris les témoins, afin que la teneur en OD se maintienne à 40-100 % de la valeur de saturation.

Il faut consigner dans le rapport d'essai toute préaération et/ou aération pendant l'essai, y compris sa durée et son taux (v. section 8).

7.5.2 pH

Normalement, on ne procède à aucun ajustement du pH pendant l'essai. Toutefois, si l'échantillon de la substance ou matière d'essai fait passer le pH de l'une ou l'autre des solutions d'essai à l'extérieur de la plage de 6,0-8,0, les résultats obtenus pourraient correspondre aux seuls effets imputables au pH (v. 1.4 et 3.1). Si on souhaite évaluer un ou des toxiques comme tels plutôt que les effets nocifs ou modificateurs du pH, on devrait ajuster le pH des solutions ou de l'échantillon ou effectuer en parallèle un deuxième essai à pH ajusté sur une portion de l'échantillon⁹⁶. Pour ce deuxième essai —

⁹⁶ Le fait de ne pas ajuster le pH de l'échantillon ou des solutions s'explique habituellement par la forte influence que peut avoir le pH sur la toxicité d'une substance ou matière d'essai. Par conséquent, dans le cas des concentrations (généralement) faibles des déchets qu'on trouve dans une eau réceptrice après dilution, toute modification du pH naturel de l'eau réceptrice et toute modification concomitante de la toxicité devraient être acceptées comme faisant partie intégrante de la pollution, d'où la recommandation de ne pas ajuster le pH au cours des essais, et c'est ce qui est exigé dans la plupart des cas si le pH des solutions est de 6,0-8,0.

et selon les objectifs de l'étude —, on pourrait ajuster le pH initial de l'échantillon ou de chaque solution d'essai⁹⁷ jusqu'à l'obtention d'une valeur équivalant à celle du pH de l'eau témoin/de dilution ($\pm 0,5$), avant l'exposition des amphipodes. Une autre méthode acceptable consiste à ajuster à la hausse le pH de chaque solution d'essai, y compris le témoin, jusqu'à ce qu'il atteigne 6,0-6,5 (pour une solution à pH $< 6,0$) ou à la baisse jusqu'à ce qu'il atteigne 7,5-8,0 (pour une solution à pH $> 8,0$). On devrait normalement utiliser pour ces ajustements des solutions d'acide chlorhydrique (HCl) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH) titrant $\leq 1 N$. Dans certains cas (p. ex., des échantillons d'effluent dont le pH est fortement tamponné), on devra peut-être recourir à des titres supérieurs d'acide ou de base⁹⁸.

⁹⁷ Pour les essais sur une substance chimique, un effluent, un lixiviat, un éluviat ou un extrait aqueux de sédiment comportant un ajustement du pH, il faudra peut-être ajuster séparément chaque solution d'essai, y compris le témoin. Pour les essais sur une eau réceptrice, on ajusterait normalement le pH d'une aliquote de l'échantillon non dilué avant de préparer les concentrations d'essai.

⁹⁸ La justification de ces ajustements du pH n'est pas vraiment à l'opposé des raisons précédemment mentionnées pour ne pas ajuster le pH des eaux usées. C'est l'objet de l'essai qui est le facteur déterminant. Certaines substances chimiques et certaines eaux usées entraînent des niveaux de pH ayant des effets *létaux* ou *sublétaux* directs, surtout dans les essais de surveillance ou de vérification de la *conformité* portant sur un effluent non dilué. Il est peu fréquent qu'un chercheur veuille essentiellement déterminer si un pH extrême est toxique, étant donné que ce pH serait improbable, même après dilution modérée dans l'eau réceptrice, qui est naturellement bien tamponnée. Si le pH lui-même présentait un intérêt prépondérant, on pourrait procéder à des analyses physicochimiques à peu de frais. Dans bien des cas, un chercheur souhaitera déterminer si des substances toxiques étaient présentes dans des eaux usées et leur détection exigera l'élimination de tout masquage dû à une action toxique du pH. Ce principe conduit à l'utilisation d'échantillons ou de solutions d'essai dont le pH aura été ajusté, tout comme on ajuste à des valeurs propices la température, la salinité et la

Abernethy et Westlake (1989) fournissent des indications utiles pour l'ajustement du pH. On devrait laisser s'équilibrer, après chaque addition d'acide ou de base, les aliquotes d'échantillons ou les solutions d'essai faisant l'objet d'un ajustement du pH. Le temps requis à cette fin dépendra du pouvoir tampon des solutions ou des échantillons. Pour les échantillons d'effluent, un délai de 30-60 min est recommandé entre chaque ajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Dans un essai avec des amphipodes, on ajusterait le pH des aliquotes utilisées pour préparer les concentrations d'essai au début de l'essai et avant chaque renouvellement, on consignerait le pH de chaque aliquote (v. 7.6) et on effectuerait l'essai sans procéder à d'autres ajustements.

Lorsque l'essai toxicologique vise à mieux comprendre les caractéristiques des toxiques présents dans la substance ou matière d'essai, l'ajustement du pH est souvent employé parmi d'autres techniques (p. ex., oxydation, filtration, extraction à l'air, ajout d'un chélatant) pour caractériser et cerner la toxicité de l'échantillon. Ces techniques d'évaluation qualitative de la toxicité sont utiles pour déterminer les caractéristiques physicochimiques du ou des toxiques ainsi que la mesure dans laquelle ils peuvent être détoxiqués (USEPA, 1991d, 1992).

7.5.3 Alimentation

Les organismes doivent être nourris soit quotidiennement, soit 3 fois par semaine en des journées non consécutives, pendant tout l'essai. Une ration identique doit être ajoutée à chaque récipient d'essai, et cette ration doit permettre des taux de survie et de croissance acceptables de *H. azteca* pendant l'essai (v. 7.7), sans être trop généreuse⁹⁹.

teneur en OD lorsqu'on procède à des essais sur des substances toxiques.

⁹⁹ Une quantité excessive d'aliments (c.-à-d. les aliments non consommés) peuvent faire chuter la teneur en OD. Si

Pendant tout l'essai, on nourrit les amphipodes avec un mélange aqueux de LCT (v. annexe H) ou avec un mélange à 50/50 de LCT et de flocons finement moulus d'aliments pour poissons (du commerce) (p. ex., Nutrafin®, Tetrafin®, TetraMin® or Zeigler® Aquatox Feed; v. 4.4). Si on choisit de nourrir les amphipodes quotidiennement, il faut, du jour 0 jusqu'à la fin de l'essai, distribuer dans chaque récipient d'essai une ration équivalant à 2,7 mg (poids sec) d'aliments (c.-à-d. un inoculum de ~1,5 mL de LCT, ou 0,75 mL de LCT et 1,35 mg de flocons pour le mélange à 50/50). Si on choisit 3 repas par semaine, il faut ajouter dans chaque récipient d'essai, à compter du jour 0 jusqu'à la fin de l'essai, en des journées non consécutives (p. ex., le lundi, le mercredi et le vendredi), une ration équivalant à 6,3 mg (poids sec) d'aliments (c.-à-d. un inoculum de ~3,5 mL de LCT, ou 1,75 mL de LCT et 3,15 mg de flocons pour le mélange à 50/50). Les amphipodes ne sont pas nourris le jour 14. Les deux rations représentent la même quantité globale de nourriture, soit l'équivalent de 18,9 mg d'aliments secs par semaine et par récipient d'essai. Comme pour l'essai sur un sédiment (v. 4.4), la ration quotidienne pourrait être préférable en ce qu'elle assure un apport de nourriture toujours fraîche, mais une surabondance d'aliments pourrait avoir un effet indésirable (v. la note de bas de page n° 99).

7.5.4 Renouvellement des solutions d'essai

Dans cet essai à renouvellement intermittent, les solutions d'essai doivent être renouvelées presque entièrement (c.-à-d. à $\geq 80\%$) ≥ 3 fois par semaine, en des journées non consécutives et pendant tout l'essai (≥ 6 fois en 14 jours). Le renouvellement se fait habituellement par siphonnage ou à l'aide d'une pipette, mais on peut aussi procéder comme suit : un volume

c'est le cas avec les rations quotidiennes, le laboratoire devrait envisager d'espacer la distribution de nourriture (c.-à-d. 3 fois par semaine) ou de renouveler les solutions d'essai plus fréquemment (à savoir chaque jour).

équivalent d'eau est ajouté à hauteur de 1-2 cm de la base du récipient, et l'eau en excès sort par un tamis Nitex® placé sur le dessus du récipient. Si on a recours au siphonnage, ≤ 90 % de l'eau est renouvelée à chaque occasion. Il convient de renouveler selon un ordre aléatoire les solutions des répétitions de chaque concentration, en particulier s'il est difficile de maintenir l'homogénéité de la substance ou matière d'essai du fait qu'il y a décantation. Pendant le renouvellement, on devrait enlever les aliments non consommés et les déchets qui se sont déposés sur le fond de chaque récipient. On ajoute lentement la nouvelle solution d'essai jusqu'à ce que soit atteint le volume initial total de la solution d'essai dans chaque récipient. Il faut procéder avec beaucoup de soin afin d'éviter de blesser les amphipodes ou d'en perdre accidentellement. On devrait conserver l'eau siphonnée ou retirée afin de pouvoir déterminer par examen si des amphipodes ont été prélevés accidentellement pendant l'opération. Si tel est le cas, ils seront sans doute blessés et il faudrait les éliminer; on devrait analyser les résultats de l'essai comme si les amphipodes éliminés n'avaient jamais été présents.

7.6 Observations et mesures

On observe chaque jour le nombre d'organismes morts ou moribonds dans chaque récipient d'essai. La température doit être mesurée quotidiennement dans des récipients d'essai représentatifs. On peut aussi préparer des récipients d'essai supplémentaires pour la mesure de la température de l'eau pendant l'essai. La teneur en OD, le pH, la *conductivité* et la teneur en ammoniac doivent être mesurés au début et à la fin de l'essai et à chaque renouvellement des solutions (c.-à-d. ≥ 3 fois par semaine). Les mesures doivent être effectuées dans la solution d'essai fraîche et dans la solution usée, juste avant ou juste après le renouvellement, au moins dans les concentrations élevée, moyenne et faible et dans

le ou les témoins (v. 4.5). Il est recommandé de mesurer la dureté et/ou l'alcalinité de l'eau au début et à la fin de l'essai, comme dans le cas des essais sur un sédiment (v. 4.5).

En ce qui a trait aux échantillons d'effluent ayant une teneur appréciable en solides, il est souhaitable de mesurer, dès leur réception au laboratoire, les solides totaux en suspension et décantables (APHA et coll., 2005); ces renseignements sont consignés dans la description générale de l'effluent, parmi les caractéristiques des échantillons susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai toxicologique.

La couleur, la *turbidité*, l'odeur et l'homogénéité (c.-à-d. la présence de matières flottantes ou de solides décantables) de l'échantillon devraient être observées au moment de la préparation des solutions d'essai. La *précipitation*, la *floculation*, le changement de couleur et d'odeur ou d'autres réactions devraient être consignés par la même occasion; on notera aussi les changements d'aspect des solutions pendant l'essai (p. ex., formation de mousse, décantation, floculation, augmentation ou diminution de la turbidité, changement de couleur).

Outre ce qui précède, d'autres observations et mesures s'imposent pendant les essais sur une substance chimique (v. 6.4). Si les concentrations doivent être mesurées, on devrait au moins en prélever des aliquotes aux concentrations élevée, moyenne et faible et faire de même avec le ou les témoins. Il faudrait à tout le moins procéder à des analyses distinctes sur des échantillons prélevés au début et à la fin des renouvellements effectués les jours 1 et 14 de l'essai. On devrait préserver et entreposer ces aliquotes et les analyser selon des méthodes éprouvées convenant le mieux au dosage de la substance chimique en solution aqueuse.

Si les dosages révèlent une diminution de >20 % des concentrations pendant l'essai, on devrait réévaluer la toxicité de la substance chimique au moyen d'un essai comportant un renouvellement plus fréquent des solutions (p. ex., quotidiennement plutôt que 3 fois par semaine). Au besoin, on pourrait envisager un essai à *renouvellement continu*.

On devrait préserver et entreposer tous ces échantillons et les analyser, selon des méthodes éprouvées assorties de limites de détection acceptables, afin de doser la substance chimique en solution aqueuse. Pour tout essai toxicologique dans lequel on a dosé les substances chimiques, on devrait calculer et exprimer les résultats en fonction de ces dosages, à moins d'avoir de bonnes raisons de croire qu'ils ne sont pas précis. Pendant ces calculs, chaque solution d'essai devrait être caractérisée d'après la moyenne géométrique mesurée de la concentration à laquelle les amphipodes ont été exposés.

Les paramètres de l'essai de 14 jours dans l'eau seulement sont le taux moyen de survie et le poids sec moyen par amphipode survivant, dans chaque traitement, à la fin de l'essai. Ces deux paramètres devraient être évalués à la fin de l'essai, comme il est indiqué en 4.7 et 6.5.

7.7 Paramètres et calculs

L'essai prend fin au bout de 14 jours (v. 4.6). On devrait récupérer tous les amphipodes des récipients d'essai à l'aide d'une pipette plutôt que par tamisage. Les paramètres biologiques de l'essai de 14 jours dans l'eau seulement sont le taux de survie et le poids sec, comme pour l'essai sur un sédiment (v. 4.7). À la fin des 14 jours d'exposition, on doit calculer les deux paramètres suivants en regard de chaque traitement :

- le *pourcentage* moyen (\pm ET) d'amphipodes ayant survécu;

- le poids sec moyen (\pm ET) par amphipode survivant, d'après le poids total du groupe de survivants¹⁰⁰.

On suppose que les amphipodes manquants sont morts et qu'ils se sont décomposés pendant l'essai. Ils entrent dans le décompte des organismes morts de chaque répétition. On mesure ensuite le poids sec total du groupe de survivants de la répétition.

Les essais toxicologiques peuvent porter sur une seule concentration (p. ex., échantillon non dilué) ou sur des concentrations multiples. Les analyses statistiques et les paramètres connexes aux essais de 14 jours dans l'eau seulement, qui sont fonction des objectifs de l'étude et du nombre de concentrations mises à l'essai, devraient être conformes aux options et approches décrites en 4.7, 5.6 et 6.5.

Les essais à concentration unique sont souvent d'un bon rapport coût-efficacité lorsqu'il s'agit de déterminer si on est en présence ou non d'une toxicité mesurable ou d'évaluer préalablement la toxicité relative d'un nombre élevé d'échantillons. Les paramètres à mesurer dépendraient eux aussi des objectifs de l'étude, mais ils pourraient englober les cotes arbitraires « satisfaisant » ou « non satisfaisant » ou le pourcentage de mortalité à la fin de l'essai. On trouvera en 5.6 des indications pertinentes sur

l'analyse statistique et sur la consignation des résultats des séries d'essais sur différents échantillons évalués chacun à une concentration seulement.

On procède à des essais à concentrations multiples si on prévoit être en présence d'une toxicité mesurable et que l'étude a pour objet d'utiliser, dans des conditions normalisées, une gamme de concentrations qui serviront au calcul d'une estimation ponctuelle. Dans un tel cas,

¹⁰⁰ V. la note de bas de page n° 54 au sujet de l'utilisation de la biomasse comme paramètre.

il faut déterminer la CL_{50} (mortalité) et la CI_p (poids sec) à la fin de l'essai, selon les indications fournies en 6.5 concernant les calculs statistiques de ces paramètres. Si l'étude inclut un témoin du solvant, on doit se conformer à la marche à suivre décrite en 6.5 quant à l'utilisation des données sur ce témoin.

Les critères de validité de l'essai sont les mêmes que pour un essai de 14 jours sur un sédiment (v. 4.7). Ainsi, l'essai est invalide si le taux

moyen de survie des amphipodes exposés à l'eau témoin pendant 14 jours est de $<80\%$ à la fin de l'essai. L'essai est invalide également si le poids sec moyen des amphipodes des groupes témoins des répétitions est de $<0,1$ mg par amphipode toujours en vie à la fin de l'essai.

Des essais toxicologiques de référence doivent être exécutés parallèlement aux essais de 14 jours dans l'eau seulement (v. 4.8).

Section 8

Rapports à produire

Le rapport relatif à chaque essai doit mentionner tout écart quant aux *exigences* exposées dans les sections 2 à 7 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. Le lecteur doit pouvoir déterminer, à partir de ce rapport, si les conditions et les modes opératoires préalables et expérimentaux ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage qu'on entend en faire.

La sous-section 8.1 ci-après énumère les renseignements à inclure dans le rapport relatif à chaque essai. Les renseignements devant être intégrés dans le rapport d'essai, fournis séparément dans un rapport général ou conservés pendant ≥ 5 ans sont précisés en 8.2. Des programmes particuliers de *surveillance*, des *protocoles* expérimentaux connexes ou des règlements pourraient exiger de faire figurer dans le rapport d'essai ou de *conserver dans les dossiers* les renseignements énumérés en 8.2 (p. ex., précisions sur la substance ou matière d'essai et/ou sur les conditions et modes opératoires relatifs au prélèvement, à la manipulation, au transport et à l'entreposage des échantillons).

On peut citer les conditions et modes opératoires communs à une série d'essais courants (p. ex., les essais de toxicité exécutés régulièrement à des fins de surveillance ou de *conformité* aux règlements) et conformes aux exigences de la présente méthode; on peut aussi joindre un rapport général exposant dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie en laboratoire.

Les précisions concernant la conduite et les résultats de l'essai qui ne sont pas incluses dans le rapport d'essai ni dans un rapport général doivent être consignées et conservées par le laboratoire pendant ≥ 5 ans, de sorte qu'on puisse fournir l'information pertinente si l'essai doit faire l'objet d'une vérification. Cette

information peut comprendre les éléments suivants :

- le formulaire de la chaîne de possession des échantillons prélevés sur le terrain ou autres, mis à l'essai à des fins de surveillance ou d'application d'un règlement;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons;
- les résultats des analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons ne figurant pas dans le rapport de l'essai;
- les notes de laboratoire sur les observations et les mesures effectuées au cours de l'essai;
- les notes de laboratoire et la ou les cartes de contrôle des essais toxicologiques de référence;
- les dossiers détaillés concernant l'origine des organismes expérimentaux, leur confirmation taxinomique et toute information utile sur leur élevage et leur état de santé;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

Le personnel de laboratoire effectuant les essais doit signer ou parapher les feuilles de données originelles et les dater.

8.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

Voici la liste des renseignements à inclure dans le rapport relatif à chaque essai.

8.1.1 *Substance ou matière d'essai*

- Courte description du type d'échantillon (p. ex., déblai de dragage, sédiment de référence ou sédiment contaminé prélevé sur le terrain, sédiment témoin, substance chimique, effluent, éluviat, lixiviat, eau réceptrice ou liquide extrait d'un sédiment ou d'une matière solide semblable) s'il a été soumis au personnel du laboratoire et dans l'état où il lui a été soumis;
- renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon;
- date du prélèvement de chaque échantillon; date et heure de réception de chaque échantillon au laboratoire;
- échantillons d'eaux usées ou d'eau réceptrice destinés aux essais dans l'eau seulement : renseignements sur chaque sous-échantillon (date du prélèvement, date et heure de la réception au laboratoire, dates ou journées où chaque sous-échantillon a été utilisé dans les essais);
- échantillons d'effluent ou de lixiviat destinés aux essais dans l'eau seulement : mesure de leur température à leur arrivée au laboratoire;
- échantillons ou sous-échantillons d'eaux usées ou d'eau réceptrice destinés aux essais dans l'eau seulement : mesure du pH et de la teneur en OD, juste avant leur préparation et leur utilisation dans les essais;
- échantillons d'éluviat ou de tout liquide extrait d'un sédiment ou d'une matière solide semblable : date de la préparation et de l'utilisation des échantillons, description du mode de préparation.

8.1.2 *Organismes expérimentaux*

- Espèce et origine des géniteurs et des organismes expérimentaux;

- plage d'âge au début de l'essai;
- pourcentage de jeunes amphipodes dans les élevages d'*âge connu* qui sont morts ou qui semblaient morts ou inactifs au cours des 48 h précédant immédiatement l'essai;
- pourcentage de jeunes amphipodes provenant d'une source externe qui sont morts ou qui semblaient morts ou inactifs au cours des 24 h précédant immédiatement l'essai;
- tout aspect ou traitement inhabituel des organismes avant leur utilisation dans l'essai.

8.1.3 *Installations*

- Nom et adresse du laboratoire;
- nom de la ou des personnes chargées de l'essai;
- courte description des récipients d'essai (taille et forme).

8.1.4 *Eau d'essai et eau témoin/de dilution*

- Type et origine de l'eau d'essai et/ou de l'eau témoin/de dilution (il peut y avoir plus d'un type et plus d'une origine ou source);
- caractéristiques mesurées de l'eau d'essai, avant le début de l'essai toxicologique et/ou au début de l'essai;
- essais dans l'eau seulement : type et quantité de toute substance chimique ajoutée à l'eau témoin/de dilution.

8.1.5 *Méthode d'essai*

- Nom de la méthode d'essai biologique employée (c.-à-d. celle décrite dans le présent document);

- essais dans l'eau seulement : courte description de la ou des procédures d'ajustement du pH ou de filtration d'un échantillon, d'un sous-échantillon ou d'une solution d'essai;
- plan d'étude et description de toute procédure spéciale (p. ex., tamisage du sédiment prélevé sur le terrain; préparation du mélange de sédiment enrichi; préparation et emploi d'un solvant et, dans ce cas, du témoin sédiment-solvant; renouvellement des solutions d'essai s'il a lieu >3 fois par semaine; préparation et utilisation d'un éluat pour les essais dans l'eau seulement) ou de toute modification apportée à la méthode normalisée;
- indication de la fréquence et de la nature des observations et de toutes les mesures effectuées au cours de l'essai;
- nom du ou des programmes et des méthodes employés pour calculer les paramètres statistiques et renvois à ces programmes et méthodes.
- essais dans l'eau seulement : type de substrat;
- nombre d'organismes par récipient d'essai et par traitement;
- essais dans l'eau seulement : s'il y a eu préaération des solutions d'essai, courte description de la méthode, du taux et de la durée d'aération;
- essais sur un sédiment : temps écoulé entre la préparation du sédiment et la mise en route de l'essai (c.-à-d. mise en équilibre du sédiment d'essai enrichi avec une substance chimique et mise en équilibre du sédiment d'essai et de l'eau sus-jacente);
- essais sur un sédiment : fréquence et taux de renouvellement de l'eau sus-jacente ou indication selon laquelle l'essai s'est déroulé en conditions statiques; essais dans l'eau seulement : fréquence et taux de renouvellement des solutions;
- type d'aliments, régime alimentaire et rations;

8.1.6 Conditions et modes opératoires

- Raison et description de tout écart ou de toute omission en regard des conditions et modes opératoires exposés dans le présent document;
- nombre d'échantillons distincts par traitement; nombre de répétitions par traitement, le cas échéant; nombre et description des traitements de chaque essai, y compris le ou les témoins; concentrations d'essai (s'il y a lieu);
- essais sur un sédiment : hauteur et volume du sédiment et de l'eau sus-jacente dans chaque récipient d'essai; essais dans l'eau seulement : hauteur et volume des solutions d'essai, y compris les témoins;
- indication de toute aération de l'eau sus-jacente (essais sur un sédiment) ou des solutions d'essai (essais dans l'eau seulement), y compris le taux d'aération, pendant l'exposition des organismes expérimentaux;
- dates du début et de la fin de l'essai;
- pour chaque échantillon de sédiment (prélevé sur le terrain, témoin, de référence) : composition granulométrique [pourcentage de sable (grossier, moyen et fin), de limon et d'argile], teneur totale en carbone organique, pH et teneur en ammoniac (total et non ionisé) de l'eau de porosité et/ou du sédiment entier;

- essais sur un sédiment : toutes les mesures de la température et de l'OD de l'eau sus-jacente de chaque traitement, effectuées au début de l'essai et ≥ 3 fois par semaine par la suite, y compris à la fin de l'essai; toutes les mesures de la teneur en ammoniac et du pH de chaque sédiment de référence, effectuées au début de l'essai et ≥ 3 fois par semaine par la suite, y compris à la fin de l'essai; toutes les mesures de la conductivité, du pH et de la teneur en ammoniac de l'eau sus-jacente, effectuées au début et à la fin de l'essai dans chaque traitement;
- essais dans l'eau seulement : toutes les mesures de la température (quotidiennement), du pH, de l'OD, de la conductivité et de la teneur en ammoniac (au début de l'essai, de même qu'avant et après chaque renouvellement) des solutions d'essai (y compris les témoins), effectuées pendant l'essai;
- date de l'exécution de l'essai toxicologique de référence; description de tout écart ou de toute omission en regard des conditions et modes opératoires exposés dans le présent document pour ce type d'essais.
- toute CI_p (et ses limites de confiance à 95 %) établie pour les données sur le poids sec à la fin de l'essai; précisions concernant la transformation exigée des données et indication de la statistique quantitative utilisée;
- type et résultats de toute analyse statistique effectuée afin de déterminer les écarts significatifs entre les stations d'échantillonnage sur le terrain (p. ex., régression logistique, analyse de contrastes, tableaux de contingence);
- type et résultats de tout ajustement du modèle ou signification des tests paramétriques du modèle d'après la régression logistique (le cas échéant);
- toute valeur aberrante et motif de sa suppression ou de son inclusion dans les ensembles de données;
- essais à concentrations multiples sur un sédiment enrichi : indication selon laquelle les résultats se fondent sur des concentrations nominales ou mesurées d'une substance ou matière donnée;

8.1.7 Résultats

- Pour chaque répétition (ou réplicat), y compris les témoins : nombre et pourcentage d'organismes morts et poids sec des amphipodes survivants à la fin de l'essai;
- pour chaque traitement, y compris les témoins : pourcentage moyen de survie (\pm ET) des amphipodes après 14 jours; poids sec moyen (\pm ET) des amphipodes survivants à la fin de l'essai; résultats de toute comparaison statistique;
- toute CL_{50} (et ses limites de confiance à 95 %) mesurée et indication de la méthode quantique utilisée;
- résultats pour toute CL_{50} 96 h (et ses limites de confiance à 95 %) associée au toxique de référence (il peut y en avoir plus d'un), avec des organismes provenant du même lot, et valeur de la moyenne géométrique (\pm 2 ET) pour le ou les mêmes toxiques de référence, obtenue par le laboratoire dans des essais antérieurs exécutés selon les conditions et modes opératoires décrits dans le présent document;
- toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

8.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des renseignements qu'il faut soit inclure dans le rapport d'essai ou le rapport général, soit conserver dans les dossiers pendant ≥ 5 ans.

8.2.1 Substance ou matière d'essai

- Nom de la ou des personnes qui ont prélevé et/ou fourni l'échantillon (ou les sous-échantillons);
- chaîne de possession et fiches d'inscription de l'échantillon;
- état (p. ex., température, conservation dans l'obscurité, dans un récipient fermé hermétiquement) de l'échantillon (ou du sous-échantillon) à sa réception au laboratoire et pendant son entreposage.

8.2.2 Organismes expérimentaux

- Documents sur la confirmation taxinomique de l'espèce, y compris le nom de la ou des personnes ou de l'établissement ayant identifié les organismes; lignes directrices ou méthodes taxinomiques utilisées pour confirmer l'identité de l'espèce;
- antécédents et âge des géniteurs;
- description des conditions et modes opératoires d'élevage de groupes d'âges mélangés et d'âge connu, y compris les éléments suivants : installations et appareillage; éclairage; origine, qualité et prétraitement de l'eau; fréquence et mode de renouvellement de l'eau; température de l'eau; âge et densité des organismes dans l'élevage; type et quantité de substrat;
- méthodes utilisées pour dénombrer, manipuler, trier, transférer et tamiser les amphipodes; méthodes utilisées pour déterminer le taux de mortalité, l'état, l'aspect et le comportement des amphipodes;

- type, origine et composition de la nourriture utilisée pour l'élevage et l'essai; valeur nutritive des aliments et présence de contaminants connus dans les aliments; méthodes utilisées pour préparer et conserver la nourriture, méthodes d'alimentation, fréquence des repas et rations;
- organismes provenant d'une source externe (v. 2.2) : déclaration quant à la confirmation de l'espèce, par un taxinomiste qualifié; toute documentation établie par le fournisseur et accompagnant chaque envoi, y compris l'âge et le nombre d'organismes par envoi, date et heure de l'envoi, température et teneur en OD de l'eau du ou des récipients d'expédition, au moment de l'envoi et à l'arrivée au laboratoire.

8.2.3 Installations d'essai et appareillage

- Description des systèmes de régulation de l'éclairage et de la température dans l'installation d'essai et de tout système fournissant de l'air comprimé et régulant le débit d'air dans les récipients d'essai;
- description des récipients d'essai et des couvercles, le cas échéant;
- description de la méthode et/ou de l'appareillage utilisés pour distribuer et renouveler l'eau sus-jacente dans les récipients d'essai;
- description des méthodes utilisées pour nettoyer ou rincer l'appareillage.

8.2.4 Sédiment témoin, eau d'essai et eau témoin/de dilution

- Essais sur un sédiment : méthodes de prétraitement du sédiment témoin (p. ex., tamisage, décantation des fines tamisées, préparation et vieillissement du sédiment s'il est artificiel) et de l'eau d'essai (p. ex., filtration, stérilisation, reconstitution et,

si elle est reconstituée, vieillissement de l'eau, ajustement de la température, débit et durée d'aération);

- essais dans l'eau seulement : précisions concernant tout prétraitement de l'eau témoin/de dilution (p. ex., filtration, stérilisation, déchloration; ajustement du pH, de la température et/ou de la dureté; dégazage, débit et durée d'aération);
- mesure de toute variable accessoire de la qualité de l'eau (v. 2.3.4) avant et/ou pendant l'essai;
- type et quantité de toute substance chimique ajoutée à l'eau d'essai ou à l'eau témoin/de dilution;
- conditions et durée d'entreposage des échantillons avant l'emploi, y compris des renseignements sur l'échantillonnage si l'eau d'essai ou l'eau témoin/de dilution provient d'une eau réceptrice d'amont.

8.2.5 *Méthode d'essai*

- Description de l'expérience du laboratoire dans l'application de la présente méthode d'essai biologique pour mesurer la toxicité d'un sédiment pour *H. azteca*;
- modes opératoires de mélange, d'enrichissement et/ou de manipulation du sédiment d'essai avant l'emploi;
- procédure de préparation des solutions mères et/ou des solutions d'essai constituées de substances chimiques; description et concentration de tout solvant utilisé;
- méthodes utilisées (et leur nom) pour les analyses chimiques de la substance ou matière d'essai (sédiment et eau de porosité), des échantillons ou des solutions d'essai, y compris des précisions

concernant le prélèvement, la préparation et l'entreposage des aliquotes avant les analyses;

- description des essais préliminaires.

8.2.6 *Conditions et modes opératoires*

- Mesures de la photopériode, de la source d'éclairage et de l'intensité lumineuse au-dessus de la surface de l'eau sus-jacente ou des solutions d'essai des récipients d'essai;
- description de la méthode d'aération et compte rendu de toute interruption de l'aération des récipients pendant l'essai et des mesures connexes de l'OD;
- description des modes opératoires et du taux de renouvellement de l'eau sus-jacente (essais sur un sédiment) ou des solutions d'essai (essais dans l'eau seulement);
- aspect de chaque échantillon (ou mélange d'échantillons), solution d'essai ou eau sus-jacente (essais sur un sédiment) dans les récipients d'essai; changement d'aspect observé pendant l'essai;
- essais sur un sédiment : toute autre analyse chimique (p. ex., concentration des contaminants, sulfures volatils acides, demande biochimique en oxygène, demande chimique en oxygène, carbone inorganique total, capacité d'échange cationique, potentiel d'oxydo-réduction, sulfure d'hydrogène de l'eau de porosité, ammoniac de l'eau de porosité) effectuée avant et pendant l'essai sur la matière d'essai (y compris le sédiment témoin et le sédiment de référence) et le contenu des récipients d'essai; analyses du sédiment entier, de l'eau de porosité et de l'eau sus-jacente;
- essais sur un sédiment : toute autre observation ou analyse faite sur la matière d'essai (y compris les échantillons du

sédiment témoin ou de référence), par exemple : traces d'animaux, données qualitatives et/ou quantitatives sur la macrofaune indigène ou les détritiques, analyses géochimiques;

- essais dans l'eau seulement : toute analyse chimique relative aux échantillons, aux solutions mères ou aux solutions d'essai (p. ex., concentrations d'une ou de plus d'une substance chimique donnée; teneur en solides en suspension) avant l'essai et/ou au moment de celui-ci;
- essais toxicologiques de référence : conditions, modes opératoires et fréquence;
- dosages des substances chimiques présentes dans les solutions mères du toxique de référence.

8.2.7 Résultats de l'essai

- Résultats de tout essai préliminaire;
- résultats de toute analyse statistique avec et sans les valeurs aberrantes; analyses de régression : données relatives à la taille

de l'échantillon (p. ex., nombre de répétitions par traitement), valeurs estimatives des paramètres avec la variance ou l'erreur type, tout tableau ANOVA produit, diagrammes des valeurs ajustées et observées de tout modèle utilisé, résultats des tests sur les valeurs aberrantes, résultats des tests de normalité et d'homoscédasticité;

- carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les résultats antérieurs des essais toxicologiques avec le ou les mêmes toxiques de référence;
- représentation graphique des données sur la relation dose-réponse;
- originaux des notes de laboratoire et d'autres feuilles de données, signés et datés par les membres du personnel de laboratoire qui ont effectué les essais et les analyses connexes.

Références

- Abernethy, S.G., et G.F. Westlake, *Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing*, Ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale (ON) (ISBN 0-7729-5974-1) (1989).
- AFNOR (Association française de normalisation), *Détermination de la toxicité des sédiments d'eaux douces vis-à-vis de Hyalella azteca. Partie 1 : Sédiments naturels*, Rapport XP T 90-338-1, France (2003).
- Ankley, G.T., M.K. Schubauer-Berigan et J.R. Dierkes, « Predicting the Toxicity of Bulk Sediments to Aquatic Organisms with Aqueous Test Fractions: Pore Water vs. Elutriate », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1359-1366 (1991).
- Ankley, G.T., D.A. Benoit, R.A. Hoke, E.N. Leonard, C.W. West, G.L. Phipps, V.R. Mattson et L.A. Anderson, « Development and Evaluation of Test Methods for Benthic Invertebrates and Sediments: Effects of Flow Rate and Feeding on Water Quality and Exposure Conditions », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25:12-19 (1993a).
- Ankley, G.T., V.R. Mattson, E.N. Leonard, C.W. West et J.L. Bennett, « Predicting the Acute Toxicity of Copper in Freshwater Sediments: Evaluation of the Role of Acid-Volatile Sulfide », *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:315-320 (1993b).
- Ankley, G.T., D.A. Benoit, J.C. Balogh, T.B. Reynoldson, K.E. Day et R.A. Hoke, « Evaluation of Potential Confounding Factors in Sediment Toxicity Tests with Three Freshwater Benthic Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1791-1796 (1994).
- Ankley, G.T., M.K. Schubauer-Berigan et P.D. Monson, « Influence of pH and hardness on the toxicity of ammonia to the amphipod *Hyalella azteca* », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 52:2078-2083 (1995).
- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation), « Toxicity », partie 8000 dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19^e éd., Washington, DC (1995).
- _____, « Toxicity », partie 8000, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21^e éd., Washington, DC (2005).
- AquaTox Testing and Consulting Inc, *Use of a Laboratory-Based Monitoring Tool for Investigation of Cause*, préparé par AquaTox Testing and Consulting Inc., Guelph (ON), pour la Section des méthodes biologiques, Environnement Canada (2010).
- Armstrong, F.A.J., et D.P. Scott, « Photochemical Dechlorination of Water Supply for Fish Tanks with Commercial Water Sterilizers », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 31:1881-1885 (1974).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates », E1383-90, dans : *1991 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects*, vol. 11.04, Philadelphie (PA) (1991a).
- _____, « Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing », E1391-90, dans : *1991 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects*, vol. 11.04, Philadelphie (PA) (1991b).
- _____, « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates », E1383-93, dans : *1993 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects*, vol. 11.04, Philadelphie (PA) (1993).
- _____, « Standard Test Methods for Measuring the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates », E1706-95, dans : *1995 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects*, vol. 11.05, Philadelphie (PA) (1995a).

- _____, « Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing », E1706-95, dans : *1995 Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects*, vol. 11.05, Philadelphie (PA) (1995b).
- _____, « Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory Testing », dans : *1999 Annual Book of ASTM Standards*, vol. 11.05, E-1733-95, Philadelphia (PA) (1999).
- _____, « Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for the Collection of Samplers Used to Collect Benthic Invertebrates », E1391-03, dans : *2008 Annual Book of ASTM Standards – Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology*, vol. 11.06, Philadelphia (PA) (2008).
- _____, « Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates », E1706-05 dans : *2010 Annual Book of ASTM Standards – Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology*, vol. 11.06, Philadelphia (PA) (2010).
- Barnard, J.L. « Marine Fauna of New Zealand: Algal-living Littoral *Gammaridea* (Crustacea *Amphipoda*) », *Mem. New Zealand Oceanogr. Inst.*, 62:7-216 (1972).
- Barnard, J.L., et C.M. Barnard, *Freshwater Amphipoda of the World. Vols. I & II*, Hayfield Associates, Mt. Vernon (VA) (1983).
- Bartlett, A.J., U. Borgmann, D.G. Dixon, S.P. Batchelor et R.J. Maguire, « Accumulation of Tributyltin in *Hyaella azteca* as an Indicator of Chronic Toxicity: Survival, Growth, and Reproduction », *Environ. Toxicol. Chem.*, 23:2878-2888 (2004).
- _____, « Toxicity and Bioaccumulation of Tributyltin in *Hyaella azteca* from Freshwater Harbour Sediments in the Great Lakes Basin, Canada », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 62(6):1243-1253 (2005).
- _____, « Comparison of Toxicity and Bioaccumulation of Tributyltin in *Hyaella azteca* and Five Other Freshwater Invertebrates », *Water Qual. Res. J. Can.*, 42(1):1-10 (2007).
- Bartlett, A.J., et L. Brown, *Is Hyalella Reproduction a Practical Endpoint to Use in Toxicity Testing?* communication présentée au 38^e Atelier annuel sur la toxicité aquatique, Winnipeg (MB) (2011).
- Baudo, R., J.P. Giesy et H. Muntau, *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-place Pollutants*, Lewis Publishers, Inc., Chelsea (MI) (1990).
- Becker, D.S., et G.N. Bigham, « Field Validation of the Amphipod and Chironomid Freshwater Toxicity Tests », rapport inédit, SETAC Platform Session #416, 14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem., 14-18 nov., Houston (TX) (1993).
- Becker, D.S., G.R. Bilyard et T.C. Ginn, « Comparisons Between Sediment Bioassays and Alterations of Benthic Macroinvertebrate Assemblages at a Marine Superfund Site: Commencement Bay, Washington », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:669-685 (1990).
- Becker, D.S., C.D. Rose et G.N. Bigham, « Comparison of the 10-day Freshwater Sediment Toxicity Tests Using *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 14:2089-2094 (1995).
- Benoit, D.A., G.L. Phipps et G.T. Ankley, « A Sediment Testing Intermittent Renewal System for the Automated Renewal of Overlying Water in Toxicity Tests with Contaminated Sediments », *Water Res.*, 27(9):1403-1412 (1993).
- Besser, J.M., C.G. Ingersoll, E. Leonard et D.R. Mount, « Effect of Zeolite on Toxicity of Ammonia in Freshwater Sediments. Implications for Sediment Toxicity Identification Evaluation Procedures », *Environ. Toxicol. Chem.*, 17:2310-2317 (1998).
- Birge, W.J., J. Black, S. Westerman et P. Francis, « Toxicity of Sediment-Associated Metals to Freshwater Organisms: Biomonitoring Procedures », dans : *Fate and Effects of Sediment-Bound Chemicals, Aquatic Systems*, Pergamon Press (NY) (1987).
- Borgmann, U., « Chronic Toxicity of Ammonia to the Amphipod *Hyaella azteca*; Importance of Ammonium Ion and Water Hardness », *Environ. Pollut.*, 86:329-335 (1994).

- _____, « Systematic Analysis of Aqueous Ion Requirements of *Hyaella azteca*: A Standard Artificial Medium Including the Essential Bromide Ion », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 30:356-363 (1996).
- _____, *Toxicity Test Methods and Observations using the Freshwater Amphipod, Hyalella*, contribution n° 02-332, Institut national de recherche sur les eaux, Environnement Canada, Burlington (ON) (2002).
- Borgmann, U., et A.I. Borgmann, « Control of Ammonia Toxicity to *Hyaella azteca* by Sodium, Potassium and pH », *Environ. Pollut.*, 95:325-331 (1997).
- Borgmann, U., et M. Munawar, « A New Standardized Sediment Bioassay Protocol Using the Amphipod *Hyaella azteca* (Saussure) », *Hydrobiologia*, 188/189:425-531 (1989).
- Borgmann, U., et W.P. Norwood, « Spatial and Temporal Variability in Toxicity of Hamilton Harbour Sediments: Evaluation of the *Hyaella azteca* 4-week Chronic Toxicity Test », *J. Great Lakes Res.*, 19(1):72-82 (1993).
- _____, « Sediment Toxicity Testing Using Large Water-Sediment Ratios: An Alternative to Water Renewal », *Environ. Pollut.*, 106:333-339 (1999).
- _____, « Metal Bioavailability and Toxicity Through a Sediment Core », *Environ. Pollut.*, 116:159-168 (2002).
- Borgmann, U., K.M. Ralph et W.P. Norwood, « Toxicity Test Procedures for *Hyaella azteca*, and Chronic Toxicity of Cadmium and Pentachlorophenol to *H. azteca*, *Gammarus fasciatus*, and *Daphnia magna* », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18:756-764 (1989).
- Borgmann, U., W.P. Norwood et K.M. Ralph, « Chronic Toxicity and Bioaccumulation of 2,5,2',5'- and 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl and Aroclor 1242 in the Amphipod *Hyaella azteca* », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19:558-564 (1990).
- Borgmann, U., W.P. Norwood et I.M. Babirad, « Relationship Between Chronic Toxicity and Bioaccumulation of Cadmium in *Hyaella azteca* », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 48:1055-1060 (1991).
- Borgmann, U., W.P. Norwood et C. Clarke, « Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyaella azteca* », *Hydrobiologia*, 259:79-89 (1993).
- Borgmann, U., R. Neron et W.P. Norwood, « Quantification of Bioavailable Nickel in Sediments and Toxic Thresholds to *Hyaella azteca* », *Environ. Pollut.*, 111:189-198 (2001a).
- Borgmann, U., W. Norwood, T.B. Reynoldson et F. Rosa, « Identifying Cause in Sediment Assessments: Bioavailability and the Sediment Quality Triad », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 58:950-960 (2001b).
- Borgmann, U., M. Nowierski, L.C. Grapentine et D.G. Dixon, « Assessing the Cause of Impacts on Benthic Organisms Near Rouyn-Noranda, Quebec », *Environ. Pollut.*, 129:39-48 (2004).
- Borgmann, U., W.P. Norwood et M. Nowierski, « Amphipod (*Hyaella azteca*) solid-phase toxicity test using high water-sediment ratios », dans : *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, C. Blaise et J.-F. Féraud (dir.), vol 1, 413-436 (2005a).
- Borgmann, U., C.G. Ingersoll, S. Mathyk et P. Lennie-Misgeld, *Biological Test Method: Test for Survival in 10-Day Water-Only Exposures using the Freshwater Amphipod Hyalella azteca, with emphasis on detection of toxicity due to ammonia*, rapport préparé pour le Mackenzie Valley Land and Water Board, Yellowknife (NT) (2005b).
- Borgmann, U., Y. Couillard, P. Doyle et D.G. Dixon, « Toxicity of Sixty-Three Metals and Metalloids to *Hyaella azteca* at Two Levels of Water Hardness », *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(3):641-652 (2005c).
- Borgmann, U., D.T. Bennie, A.L. Ball et V. Palabrica, « Effect of a Mixture of Seven Pharmaceuticals on *Hyaella azteca* over Multiple Generations », *Chemosphere*, 66:1278-1283 (2007).
- Borgmann, U., J.E. Schroeder, L.A. Golding et D.G. Dixon, « Models of Cadmium Accumulation and Toxicity to *Hyaella azteca* During 7- and 28-day Exposures », *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 16(3):560-587 (2010).
- Borowsky, B., « The Use of the Males' Gnathopods During Precopulation in Some Gammaridean Amphipoda », *Crustaceana*, 47(3):245-250 (1984).

- Bousfield, E.L., « Fresh-water Amphipod Crustaceans of Glaciated North America », *Can. Field-Nat.*, 72(2):55-113 (1958).
- _____, *Shallow-water Gammaridean Amphipoda of New England*, Cornell Univ. Press, Ithaca (NY) (1973).
- _____, « A Revised Classification and Phylogeny of the Amphipod Crustacea », *Trans. Roy. Soc. Can.*, 4(14):343-390 (1979).
- _____, « Amphipoda - Gammaridea », dans : *Synopsis and Classification of Living Organisms*, vol. 2, S.P. Parker (dir.), McGraw-Hill, New York (NY) (1982).
- _____, « Recent Advances in the Systematics and Biogeography of Landhoppers (*Amphipoda: Talitridae*) of the Indo-Pacific Region », Proc. Symp. Assoc. Syst. Coll., Honolulu, mai 1982, *Bernice P. Bishop Spec. Publ. No. 72*, 171-210 (1984).
- _____, « The Phyletic Classification of Amphipod Crustaceans - Problems in Resolution », dans : *Actes de la première conférence européenne sur les crustacés*, communication orale et résumé, Paris France (1992).
- _____, « A Contribution to the Reclassification of Neotropical Freshwater Hyalellid Amphipods (Crustacea: Gammaridea, Talitroidea) », *Boll. Mus. Civ. St. Nat. Verona*, 20:175-224 (1996).
- Bousfield, E.L., et C.P. Staude, « The Impact of J.L. Barnard on North American Pacific Amphipod Research: a Tribute », *Amphipacifica*, 1(1):3-17 (1994).
- Brooke, L.T., D.J. Call, G.T. Ankley, D.A. Benoit, C.W. West et R.A. Hoke, « A Short-Term Method for Estimating the Toxicity of Solid Phase Sediment to the Amphipod *Hyalella azteca* », rapport préparé pour l'USEPA, Region 5, Chicago (IL) (1993).
- Brouwer, H., T. Murphy et L. McArdle, « A Sediment-contact Bioassay with *Photobacterium phosphoreum* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1353-1358 (1990).
- Bulycheva, A.I., « Morskije Blocki Morei SSSR I Sopredel'nych Vod (*Amphipoda-Talitroidea*) », *Akad. Nauk SSSR, Opred. po Faune SSSR* 65 (1957).
- Burton, G.A., Jr., « Assessing the Toxicity of Freshwater Sediments », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1585-1627 (1991).
- _____, (dir.), *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis Publishers, Inc., Chelsea (MI) (1992).
- Burton, G.A., Jr., et C.G. Ingersoll, « Evaluating the Toxicity of Sediments », dans : *The ARCS Assessment Guidance Document*, EPA-905-B94/002, USEPA, Chicago (IL) (1994).
- Burton, G.A., Jr., B.L. Stemmer, K.L. Winks, P.E. Ross et L.A.C. Burnett, « A Multitrophic Level Evaluation of Sediment Toxicity in Waukegan and Indiana Harbors », *Environ. Toxicol. Chem.*, 8:1057-1066 (1989).
- Burton, G.A., Jr., T.J. Norberg-King, C.G. Ingersoll, D.A. Benoit, G.T. Ankley, P.V. Winger, J. Kubitz, J.M. Lazorchak, M.E. Smith, E. Greer, F.J. Dwyer, D.J. Call, K.E. Day, P. Kennedy et M. Stinson, « Interlaboratory Study of Precision: *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* Freshwater Sediment Toxicity Assays », *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:1335-1343 (1996).
- Cairns, M.A., A.V. Nebeker, J.H. Gakstatter et W.L. Griffis, « Toxicity of Copper-spiked Sediments to Freshwater Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem.*, 3:435-445 (1984).
- Canfield, T.J., N.E. Kemble, W.G. Brumbaugh, F.J. Dwyer, C.G. Ingersoll et J.F. Fairchild, « Use of Benthic Invertebrate Community Structure and the Sediment Quality Triad to Evaluate Metal-contaminated Sediment in the Upper Clark Fork River (MT) », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1999-2012 (1994).
- Cano, M.L., S.D. Dyer et A.J. DeCarvalho, « Effect of Sediment Organic Carbon on the Toxicity of a Surfactant to *Hyalella azteca* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:1411-1417 (1996).
- CCMRE (Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement), *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*, Groupe de travail sur les lignes directrices relatives à la qualité de l'eau, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1987).

- Chapman, P.M., R.N. Dexter, S.F. Cross et D.G. Mitchell, « A Field Trial of the Sediment Quality Triad in San Francisco Bay », NOAA Tech. Mem. NOS OMA 25, National Oceanic and Atmospheric Administration, Rockville (MD) (1986).
- Chapman, P.M., R.N. Dexter et E.R. Long, « Synoptic Measures of Sediment Contamination, Toxicity and Infaunal Community Composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay », *Marine Ecol.*, 37:75-96 (1987).
- Chapman, P.M., E.A. Power, R.N. Dexter et H.B. Andersen, « Evaluation of Effects Associated with an Oil Platform, Using the Sediment Quality Triad », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:407-424 (1991).
- Conlan, K.E., « Revision of the Crustacean Amphipod Genus *Jassa* Leach (*Corophioidea: Ischyroceridae*) », *Can. J. Zool.*, 86:2031-2075 (1990).
- _____, « Precopulatory Mating Behaviour and Sexual Dimorphism in the Amphipod Crustacea », *Hydrobiologica*, 223:255-282 (1991).
- Cooper, W.E., « Dynamics and Productivity of a Natural Population of a Freshwater Amphipod », *Hyalella azteca*, *Ecol. Monogr.*, 35:377-394 (1965).
- Day, K.E., B.J. Dutka, K.K. Kwan, N. Batista, T.B. Reynoldson et J.L. Metcalfe-Smith, « Correlations Between Solid-phase Microbial Screening Assays, Whole-sediment Toxicity Tests with Macroinvertebrates and *In-situ* Benthic Community Structure », *J. Great Lakes Res.*, 21:192-206 (1995a).
- Day, K.E., S. Kirby et T.B. Reynoldson, « The Effect of Manipulations of Freshwater Sediments on Responses of Benthic Invertebrates in Whole-sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem.*, 14:1333-1343 (1995b).
- de Groot, A.J., et K.H. Zschuppe, « Contribution to the Standardization of the Methods of Analysis for Heavy Metals in Sediments », *Rapports et procès-verbaux des réunions du Conseil international pour l'exploration de la mer*, 181:111-122 (1981).
- Deitzer G., « Spectral Comparisons of Sunlight and Different Lamps », dans : *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop*, T.W. Tibbits (dir.), 1^{er} mars 1994, Madison (WI) (1994).
- de March, B.G.E., « The Effects of Photoperiod and Temperature on the Induction and Termination of Reproductive Resting Stage in the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca* (Saussure) », *Canad. J. Zool.*, 55:1595-1600 (1977).
- _____, « The Effects of Constant and Variable Temperatures on the Size, Growth and Reproduction of the Freshwater Amphipod *Hyalella azteca* (Saussure) », *Can. J. Zool.*, 56(8):1801-1806 (1978).
- _____, « Survival of *Hyalella azteca* (Saussure) Raised Under Different Laboratory Conditions in a pH Bioassay, with References to Copper Toxicity », *Rapport technique du Services des pêches et de la mer n° 892* (1979).
- _____, « *Hyalella azteca* (Saussure) », dans : *Manual for the Culture of Selected Freshwater Invertebrates*, Publication spéciale canadienne des sciences halieutiques et aquatiques n° 54, ministère des Pêches et des Océans, Ottawa (ON) (1981).
- Denton, D., J. Diamond et L. Zheng, « Test of Significant Toxicity: A Statistical Application for Assessing Whether an Effluent or Site Water is Truly Toxic », *Environ. Toxicol. Chem.*, 30:1117-1126 (2011).
- Di Toro, D.M., J.H. Mahony, D.J. Hansen, K.J. Scott, M.B. Hicks, S.M. Mayr et M. Redmond, « Toxicity of Cadmium in Sediments: the Role of Acid Volatile Sulfides », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1487-1502 (1990).
- Di Toro, D.M., C.S. Zarba, D.J. Hansen, W.J. Berry, R.C. Swartz, C.E. Cowan, S.P. Pavlou, H.E. Allen, N.A. Thomas et P.R. Paquin, « Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic Chemicals Using Equilibrium Partitioning », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1541-1583 (1991).
- Ditsworth, G.R., D.W. Schults et J.K.P. Jones, « Preparation of Benthic Substrates for Sediment Toxicity Testing », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1523-1529 (1990).
- Doe, K.G., et S. Wade, « Effects of Temperature and Salinity on *Amphiporeia virginiana* During Ten-day Sediment Bioassays », rapport inédit préparé par la Division des laboratoires de la Région de l'Atlantique, Environnement Canada, Dartmouth (NS) (1992).

- Dunnett, C.W., « A Multiple Comparison Procedure for Comparing Several Treatments with a Control », *J. Amer. Stat. Assoc.*, 50:1096-1121 (1955).
- Dwyer, F.J., C.J. Ingersoll et N.E. Kemble, « Use of Standardized Formulated Sediment in Toxicity Tests », rapport inédit, SETAC Platform Session #275, 14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem., 14-18 nov. 1993, Houston (TX) (1993).
- EC (Environnement Canada), *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*, Rapport SPE 1/RM/12, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1990).
- _____, *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens*, Rapport SPE 1/RM/26, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1992a).
- _____, *Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère Ceriodaphnia dubia*, Rapport SPE 1/RM/21, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1992b).
- _____, *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule*, Rapport SPE 1/RM/22, Conservation et Protection, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1992c).
- _____, *Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques*, Rapport SPE 1/RM/29, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1994).
- _____, *Document d'orientation : sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence*, Rapport SPE 1/RM/30, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1995).
- _____, *Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (Chironomus tentans ou Chironomus riparius)*, Rapport SPE 1/RM/32, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1997a).
- _____, *Méthode d'essai biologique: essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole Hyalella azteca*, Rapport SPE 1/RM/33, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1997b).
- _____, *Recommended Procedure for Adjusting Salinity of Effluent Samples for Marine Sublethal Toxicity Testing Conducted Under Environmental Effects Monitoring (EEM Programs)*, rapport inédit, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1997c).
- _____, *Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats*, Rapport SPE 1/RM/34, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1999a).
- _____, *Procédure recommandée pour l'importation d'organismes destinés à des essais de toxicité sublétales*, rapport inédit, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1999b).
- _____, *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité*, Rapport SPE 1/RM/46, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (2007).
- _____, *Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel*, Rapport SPE 1/RM/50, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (2008).
- _____, *Guide technique pour l'Étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) des pâtes et papiers (2010)*, Bureau national des études de suivi des effets sur l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (2010).
- _____, *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule* », Rapport SPE 1/RM/22 (2^e éd.), Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (ON) (2011).

- _____, *Guide technique pour l'Étude de suivi des effets sur l'environnement (ESEE) des mines de métaux (2012)*, en ligne : <http://www.ec.gc.ca/Publications/default.asp?lang=Fr&xml=D175537B-24E3-46E8-9BB4-C3B0D0DA806D> (2012).
- FDA (Food and Drug Administration), « *Hyaella azteca* Acute Toxicity », *Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.10*, préparé par C. Eirkson, M.C. Harrass, C.M. Osborne, P.G. Sayre et M. Zeeman, pour le Center for Food Safety and Applied Nutrition et le Center for Veterinary Medicine, Washington, DC (1987).
- Hamr, P., R.S. Kirby, P. Gillis et K.E. Day, *Development of Methodologies for Whole-sediment Toxicity Tests with Benthic Invertebrates*, rapport inédit TS-27 préparé par l'Institut national de recherche sur les eaux, Burlington (ON), pour Environnement Canada (1994).
- Hargrave, B.T., « The Utilization of Benthic Microflora by *Hyaella azteca* », *J. Animal Ecology*, 39:427-437 (1970).
- Hockett, J.R., T.L. Highland, D.J. Hoff, D.R. Mount, T.J. Norberg-King et T. Valenti, « Modifying Foods and Feeding Regimes to Optimize the Performance of *Hyaella azteca* During Chronic Toxicity Tests », SETAC – 32nd North American Annual Meeting, November 2011, Boston (MA) (2011).
- Hoenig, J.M., et D.M. Heisey, « The Abuse of Power: The Pervasive Fallacy of Power Calculations for Data Analysis », *Amer. Statistician*, 55:19-24 (2001).
- Hoke, R.A., P.A. Kosian, G.T. Ankley, A.M. Cotter, F.M. Vandermeiden, G.L. Phipps et E.J. Durhan, « Check Studies with *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans* in Support of the Development of a Sediment Quality Criterion for Dieldrin », *Environ. Toxicol. Chem.*, 14:435-443 (1995).
- Ingersoll, C., « Desirable and Necessary Attributes for Freshwater Sediment Toxicity Tests: *Hyaella azteca* », dans : *Proceedings, Tiered Testing Issues for Freshwater and Marine Sediments*, 16-18 sept. 1992, USEPA, Washington, DC (1992).
- Ingersoll, C.G., et M.K. Nelson, « Testing Sediment Toxicity with *Hyaella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera) », dans : *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, W.G. Landis et W.H. van der Schalle (dir.), vol. 13, ASTM STP 1096, ASTM, Philadelphie (PA) (1990).
- Ingersoll, C.G., F.J. Dwyer, S.A. Burch, M.K. Nelson, D.R. Buckler et J.B. Hunn, « The Use of Freshwater and Saltwater Animals to Distinguish Between the Toxic Effects of Salinity and Contaminants in Irrigation Drain Water », *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:503-511 (1992).
- Ingersoll, C.G., G.T. Ankley, D.A. Benoit, E.L. Brunson, G.A. Burton, F.J. Dwyer, R.A. Hoke, P.F. Landrum, T.J. Norberg-King et P.V. Winger, « Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants Using Freshwater Invertebrates: A Review of Methods and Applications », *Environ. Toxicol. Chem.*, 14:1885-1894 (1995).
- INRE (Institut national de recherche sur les eaux), *Standard Operating Procedures: Culture and Sediment Bioassay Methods for Chironomus riparius, Hexagenia spp., Hyaella azteca, and Tubifex tubifex*, (version provisoire inédite), K. Day, Direction de la recherche sur les cours d'eau, Centre canadien des eaux intérieures, Environnement Canada, Burlington (ON) (1992).
- ISO (Organisation internationale de normalisation), « *Qualité de l'eau -- Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de Caenorhabditis elegans (nématodes)* », ISO 10872:2010, Genève, Suisse (2010).
- _____, *Qualité de l'eau -- Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de Hyaella azteca*, ISO/DIS 16303 (projet), Genève, Suisse (2011).
- Ivey, C., C. Ingersoll et E. Brunson, *An Evaluation of Reconstituted Water for Use in Chronic Water-Only and Sediment Toxicity Tests with Hyaella azteca*, SETAC – 25th North American Annual Meeting, November 2004, Portland (OR) (2004).

- Ivey, C., C. Ingersoll, N. Kemble, J. Kunz, D.R. Mount et J.R. Hockett, *Evaluation of the Influence of Bromide or Iodide on the Performance of the Amphipod *Hyaella azteca* in Reconstituted Waters*, SETAC – 32nd North American Annual Meeting, November 2011, Boston (MA) (2011).
- Jackman, P.M., et K.G. Doe, *Laboratory Studies of Confounding Factors Affecting Sediment Toxicity Tests and Integration of These Results in Interpretation of Field Studies*, communication présentée au 27^e Atelier annuel sur la toxicité aquatique, St. John's (NL) (2000).
- Kemble, N.E., W.G. Brumbaugh, E.L. Brunson, F.J. Dwyer, C.G. Ingersoll, D.P. Monda et D.F. Woodward, « Toxicity of Metal-contaminated Sediments from the Upper Clark Fork River, MT to Aquatic Invertebrates in Laboratory Exposures », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1985-1997 (1994).
- Kubitz, J.A., *Protocol for Small Volume Bioassay for *Hyaella azteca* - Survival Endpoint. Method Standard Operating Procedure Check List* », ébauche 1.0, rapport inédit, Institute for Environmental Toxicology, Université d'État du Michigan, East Lansing (MI) (1993a).
- _____, *Culture of the Amphipod *Hyaella azteca* (Saussure). Method Standard Operating Procedure Check List*, ébauche 1.1, rapport inédit, Institute for Environmental Toxicology, Université d'État du Michigan, East Lansing (MI) (1993b).
- Kubitz, J.A., J.M. Besser et J.P. Giesy, *Optimizing the Experimental Design of a Sediment Toxicity Test using the Amphipod *Hyaella azteca**, SETAC Platform Session #417, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston (TX) (1993).
- Kubitz, J.A., E.C. Leweke, J.M. Besser, J.B. Drake III et J.P. Giesy, « Effects of Copper-contaminated Sediments on *Hyaella azteca*, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*: Survival, Growth and Enzyme Inhibition », *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 29:97-103 (1995).
- Kubitz, J.A., J.M. Besser et J.P. Giesy, « A Two-step Experimental Design for a Sediment Bioassay Using Growth of the Amphipod *Hyaella azteca* for the Test End Point », *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:1783-1792 (1996).
- Landrum, P.F., et D. Scavia, « Influence of Sediment on Anthracene Uptake, Depuration, and Biotransformation by the Amphipod *Hyaella azteca* », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 40:298-305 (1983).
- Landrum, P.F., et W.R. Faust. 1991. « Effect of Variation in Sediment Composition on the Uptake Rate Coefficient for Selected PCB and PAH Congeners by the Amphipod, *Diporeia* sp. », dans : *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, vol. 14, M.A. Mayes et M.G. Barron (dir.), ASTM STP 1124, ASTM, Philadelphia (PA) (1991).
- Lenth, R.V., « Statistical Power Calculations », *J. Anim. Sci.* 85 (E. Suppl.):E24-E29 (2007).
- McGee, B.L., C.E. Schlekot et E. Reinharz, « Assessing Sublethal Levels of Sediment Contamination Using the Estuarine Amphipod *Leptocheirus plumulosus* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:577-587 (1993).
- McLeay, D.J., S. Yee, K. Doe et S. Wade, *Initial Evaluation by EP Laboratories of a 10-day Test for Sediment Toxicity Using the Marine Infaunal Amphipod, *Rhepoxynius abronius**, rapport inédit préparé par McLeay Associates Ltd., West Vancouver (BC), pour Environnement Canada (Protection de l'environnement, Conservation et protection) et le Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (1989).
- _____, *Phase-II and Phase-III Studies by Environment Canada Laboratories of 10-day Tests for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods*, rapport inédit préparé par McLeay Associates Ltd., West Vancouver (BC), pour Environnement Canada (Protection de l'environnement, Conservation et protection) et le Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (1991).
- McLeay, D.J., S.G. Yee, K.G. Doe et L.M. Porebski, « Development of 10-day Marine/Estuarine Amphipod Assay for Sediment Toxicity in Support of the Canadian Ocean Dumping Program (CEPA, Part VI) », dans : *Proceedings 18th Annual Aquatic Toxicity Workshop*, 30 sept.-3 oct. 1991, Ottawa (ON), Rapport technique du Services des pêches et de la mer n° 1863 (1992).

- McLeay, D.J., S. Yee, K. Doe, S. Wade, A. Huybers et M. Fennell, *Validation of Environment Canada's Ten-day Test for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Amphipods - Phase VI Study*, rapport inédit préparé par McLeay Associates Ltd., West Vancouver (BC), pour Environnement Canada (Protection de l'environnement, Conservation et protection) et le Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (1993).
- Maciorowski, H.D., *Comparison of Lethality of Selected Industrial Effluents Using Various Aquatic Invertebrates Under Laboratory Conditions*, Rapport technique n° CEN/T-75-2, Direction des opérations, Service des pêches et de la mer (1975).
- Maki, A.W., « Modifications of Continuous Flow Test Methods for Small Aquatic Organisms », *Prog. Fish. Cult.*, 39:172-174 (1977).
- MESI (Miller Environmental Sciences Inc.), *Method Development Research for the Improvement of Environment Canada's Hyalella azteca Test for Survival and Growth in Sediment*, rapport inédit préparé par Miller Environmental Sciences Inc., King City (ON), pour la Section des méthodes biologiques, Environnement Canada, Ottawa (ON) (2010).
- Milani, D., K.E. Day, D.J. McLeay et R.S. Kirby, *Recent Intra- and Interlaboratory Studies Related to the Development and Standardization of Environment Canada's Biological Test Methods for Measuring Sediment Toxicity Using Freshwater Amphipods (Hyalella azteca) or Midge Larvae (Chironomus riparius)*, rapport technique préparé par l'Institut national de recherche sur les eaux, Burlington (ON), pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa (ON) (1996).
- MPO (Ministère des Pêches et des Océans), *Bioassay Procedures for Hyalella azteca, Standard Operating Procedure*, rapport inédit, U. Borgmann et W.P. Norwood (dir.), Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences halieutiques, Burlington (ON) (1992)¹⁰¹.
- Nebeker, A.V., et C.E. Miller, « Use of the Amphipod Crustacean *Hyalella azteca* in Freshwater and Estuarine Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:1027-1033 (1988).
- Nebeker, A.V., M.A. Cairns, J.H. Gakstatter, K.W. Malueg, G.S. Schuytema et D.F. Krawczyk, « Biological Methods for Determining Toxicity of Contaminated Freshwater Sediments to Invertebrates », *Environ. Toxicol. Chem.*, 3:617-630 (1984).
- Nebeker, A.V., S.T. Onjukka, M.A. Cairns et D.F. Krawczyk, « Survival of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* in Cadmium-Spiked Water and Sediment », *Environ. Toxicol. Chem.*, 5:933-938 (1986).
- Nebeker, A.V., G.S. Schuytema, W.L. Griffis, J.A. Barbitta et L.A. Carey, « Effect of Sediment Organic Carbon on Survival of *Hyalella azteca* Exposed to DDT and Endrin », *Environ. Toxicol. Chem.*, 8:705-718 (1989).
- Nebeker, A.V., S.T. Onjukka, D.G. Stevens, G.A. Chapman et S.E. Dominguez, « Effects of Low Dissolved Oxygen on Survival, Growth and Reproduction of *Daphnia*, *Hyalella* and *Gammarus* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:373-379 (1992).
- Nelson, M.K., P.F. Landrum, G.A. Burton, S.J. Klaine, E.A. Crecelius, T.D. Byl, D.C. Gossiaux, V.N. Tsymbal, L. Cleveland, C.G. Ingersoll et G. Sasson-Brickson, « Toxicity of Contaminated Sediments in Dilution Series with Control Sediments », *Chemosphere*, 27:1789-1812 (1994).
- Newman, M.C., « What Exactly are you Inferring? A Closer Look at Hypothesis Testing », *Environ. Toxicol. Chem.*, 27:1013-1126 (2008).
- Norberg-King, T.J., « Development of a Standard Protocol for Testing *Hyalella azteca* », dans : *Proceedings, Tiered Testing Issues for Freshwater and Marine Sediments*, 16-18 sept. 1992, USEPA, Washington, DC (1992).
- Nowierski, M., D.G. Dixon et U. Borgmann, « Effects of Water Chemistry on the Bioavailability of Metals in Sediment on *Hyalella azteca*: Implications for Sediment Quality Guidelines », *Arch. Environ. Con. Tox.*, 49:322-332 (2005).

¹⁰¹ Mêmes modes opératoires que ceux de Borgmann et coll. (1989) pour ce qui concerne l'élevage, que ceux de Borgmann et coll. (1991) pour ce qui concerne les essais dans l'eau seulement, et que ceux de Borgmann et Norwood (1993) pour ce qui concerne les essais sur un sédiment.

- Norwood, W.P., U. Borgmann et D.G. Dixon, « Interactive Effects of Metal Mixtures on Bioaccumulation in the Amphipod *Hyaella azteca* », *Aquat. Toxicol.*, 84:255-267 (2007a).
- _____, « Chronic Toxicity of Arsenic, Cobalt, Chromium and Manganese to *Hyaella azteca* in Relation to Exposure and Bioaccumulation », *Environ. Pollut.*, 147:262-272 (2007b).
- Norwood, W.P., T. Watson-Leung et D. Milani, « Impacts of Zn-Spiked Sediments on Four Benthic Invertebrates: Implications for Canadian Sediment Quality Guidelines », Contribution n° 09-048 de la Direction des sciences et de la technologie de l'eau, INRE, Burlington (ON) (2009).
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application*, Paris (2006).
- Othoutd, R.A., J.P. Giesy, K.R. Grzyb, D.A. Verbrugge, R.A. Hoke, J.B. Drake et D. Anderson, « Evaluation of the Effects of Storage Time on the Toxicity of Sediments », *Chemosphere*, 22:801-807 (1991).
- Paine, M.D., et C.A. McPherson, *Phase IV Studies of 10-day Tests for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods*, rapport inédit préparé par EVS Consultants Ltd., North Vancouver (BC), pour Environnement Canada (Division du milieu marin, Protection de l'environnement, Conservation et protection) et le Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (1991a).
- _____, *Validation of a Ten-day Test for Sediment Toxicity Using Marine or Estuarine Infaunal Amphipods - Phase V Study*, rapport inédit préparé par EVS Consultants Ltd., North Vancouver (BC), pour Environnement Canada (Division du milieu marin, Protection de l'environnement, Conservation et protection) et le Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (1991b).
- Pastorok, R.A., D.C. Peek, J.R. Sampson et M.A. Jacobson, « Ecological Risk Assessment for River Sediments Contaminated by Creosote », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1929-1941 (1994).
- Phipps, G.L., V.R. Mattson et G.T. Ankley, « The Relative Sensitivity of Three Freshwater Benthic Macroinvertebrates to Ten Contaminants », *Arch. Environ. Toxicol. Chem.*, 28:281-286 (1995).
- Porebski, L.M., et J.M. Osborne, « The Application of a Tiered Testing Approach to the Management of Dredged Sediments for Disposal at Sea in Canada », *Chem. Ecol.*, 14:197-214 (1998).
- Reynoldson, T.B., K.E. Day, C. Clarke et D. Milani, « Effect of Indigenous Animals on Chronic End Points in Freshwater Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:973-977 (1994).
- Reynoldson, T.B., R.C. Bailey, K.E. Day et R.H. Norris, « Biological Guidelines for Freshwater Sediment Based on Benthic Assessment of Sediment (the BEAST) Using a Multivariate Approach for Predicting Biological State », *Aust. J. Ecol.*, 20:198-219 (1995).
- Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young, « Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish », ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria (BC) (1982).
- Sager J.C., et C. McFarlane, « Radiation », dans : *Plant Growth Chamber Handbook*, R.W. Langhans et T.W. Tibbits (dir.), North Central Regional Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report No. 99, Iowa State University of Science and Technology, Ames (IA) (1997).
- Saussure, H., « Mémoire sur divers crustacés nouveaux des Antilles et du Mexique », *Mém. Soc. Phys. Hist. Nat.*, 14(2):417-496 (1858).
- Schlekat, C.E., B.L. McGee, D.M. Boward, E. Reinharz, D.J. Velinsky et T.L. Wade, « Tidal River Sediments in the Washington, D.C. Area. III. Biological Effects Associated with Sediment Contamination », *Estuaries*, 17:334-344 (1994).
- Schubauer-Berigan, M.K., et G.T. Ankley, « The Contribution of Ammonia, Metals and Nonpolar Organic Compounds to the Toxicity of Sediment Interstitial Water from an Illinois River Tributary », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:925-939 (1991).
- Schubauer-Berigan, M.K., J.R. Dierkes, P.D. Monson et G.T. Ankley, « pH-Dependent Toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyaella azteca* and *Lumbriculus variegatus* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:1261-1266 (1993).

- Sergy, G., *Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection, C & P, DOE* », rapport inédit, Conservation et Protection, Protection de l'environnement, Environnement Canada, Edmonton (AB) (1987).
- Sibley, P.K., D.G. Dixon et D.R. Barton, « Comparison of Pore Water, Bulk Sediment, and Elutriate Toxicity Tests for Determining the Toxicity of Sediments Exposed to BKME to Benthic Macroinvertebrates », SETAC Platform Session #414, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston (TX) (1993).
- Sly, P.G., et W.J. Christie, « Factors Influencing Densities and Distributions of *Pontoporeia hoyi* in Lake Ontario », *Hydrobiologia*, 235/236:321-352 (1992).
- Smith, M.E., L.E. Herrin et J.M. Lazorchak, « Methods for the Laboratory Culture of the Freshwater Amphipod, *Hyalella azteca* », rapport inédit, *12th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, Seattle (WA) (1991a).
- Smith, M.E., L.E. Herrin, D.M. McMullen et J.M. Lazorchak, « Test Procedures for the Freshwater Amphipod, *Hyalella azteca* », rapport inédit, *12th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, Seattle (WA) (1991b).
- Smith, M.E., L.E. Herrin, S.L. Brewer et J.M. Lazorchak, « A Standardized Whole Sediment Exposure for *Hyalella azteca* Testing », rapport inédit, SETAC Poster Presentation #TP6B13, *13th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 8-12 nov. 1992, Cincinnati (OH) (1992a).
- _____, « A Standard Water and Control Sediment for Toxicity Testing with *Hyalella azteca* », rapport inédit, SETAC Poster Presentation #TP6B12, *13th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 8-12 nov. 1992, Cincinnati (OH) (1992b).
- Smith, M.E., L. Vigano, J.M. Lazorchak et A.M. Kneipp, « Sediment Test Methods for a 7-day Fathead Minnow and 7-15-day Rainbow Trout Fish Embryo/Larval », rapport inédit, SETAC Platform Session #421, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston (TX) (1993).
- Stemmer, B.L., G.A. Burton, Jr., et S. Leibfritz-Frederick, « Effect of sediment spatial variance and collection method on Cladoceran toxicity and indigenous microbial activity determinations », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1035-1044 (1990).
- Strong, D.R., Jr., « Life History Variation Among Populations of an Amphipod (*Hyalella azteca*) », *Ecology*, 53(6):1103-1111 (1972).
- Suedel, B.C., et J.H. Rodgers, Jr., « Responses of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* to Particle-size Distribution and Organic Matter Content of Formulated and Natural Freshwater Sediments », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1639-1648 (1994a).
- _____, « Development of Formulated Reference Sediments for Freshwater and Estuarine Sediment Testing », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1163-1175 (1994b).
- Suedel, B.C., J.H. Rodgers, Jr., et P.A. Clifford, « Bioavailability of Fluoranthene in Freshwater Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:155-165 (1993a).
- Suedel, B.C., E. Deaver et J.H. Rodgers, Jr., « Reducing Uncertainty in Laboratory Sediment Toxicity Tests », rapport inédit, SETAC Platform Session #508, *14th Annual Meeting, Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, 14-18 nov. 1993, Houston (TX) (1993b).
- _____, « Formulated Sediment as a Reference and Dilution Sediment in Definitive Toxicity Tests », *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 30:47-52 (1996).
- Swartz, R.C., W.A. DeBen, K.A. Sercu et J.O. Lamberson, « Sediment Toxicity and the Distribution of Amphipods in Commencement Bay, Washington, USA », *Mar. Poll. Bull.*, 13:359-364 (1982).
- Swartz, R.C., D.W. Schults, G.R. Ditsworth, W.A. DeBen et F.A. Cole, « Sediment Toxicity, Contamination, and Macrobenthic Communities Near a Large Sewage Outfall », dans : *Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems*, T.P. Boyle (dir.), ASTM STP 865, ASTM, Philadelphie (PA) (1985a).

- Swartz, R.C., G.R. Ditsworth, D.W. Schults et J.O. Lamberson, « Sediment Toxicity to a Marine Infaunal Amphipod: Cadmium and its Interaction with Sewage Sludge », *Mar. Environ. Res.*, 18:133-153 (1985b).
- Swartz, R.C., F.A. Cole, D.W. Schults et W.A. DeBen, « Ecological Changes in the Southern California Bight Near a Large Sewage Outfall: Benthic Conditions in 1980 and 1983 », *Marine Ecology*, 31:1-13 (1986).
- Swartz, R.C., P.F. Kemp, D.W. Schults et J.O. Lamberson, « Effects of Mixtures of Sediment Contaminants on the Marine Infaunal Amphipod, *Rhepoxynius abronius* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:1013-1020 (1988).
- Swartz, R.C., F.A. Cole, J.O. Lamberson, S.P. Ferraro, D.W. Schults, W.A. DeBen, H. Lee et R.J. Ozretich, « Sediment Toxicity, Contamination, and Amphipod Abundance at a DDT and Dieldrin-contaminated Site in San Francisco Bay », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:949-962 (1994).
- Thursby, G.B., J. Heltshe et K.J. Scott, « Revised Approach to Toxicity Test Acceptability Criteria Using a Statistical Performance Assessment », *Environ. Toxicol. Chem.*, 16:1322-1329 (1997).
- Tomasovic, M., F.J. Dwyer, I.E. Greer et C.G. Ingersoll, « Recovery of Known-age *Hyaella azteca* (Amphipoda) from Sediment Toxicity Tests », *Environ. Toxicol. Chem.*, 14:1177-1180 (1995).
- Trussell, R.P., « The Percent Un-ionized Ammonia in Aqueous Ammonia Solutions at Different pH Levels and Temperatures », *Journal de l'Office des recherches sur les pêcheries du Canada*, 29:1505-1507 (1972).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents to Freshwater and Marine Organisms*, EPA-600/4-85/013, W.H. Peltier et C.I. Weber (dir.), USEPA, Cincinnati (OH) (1985a).
- _____, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, EPA-600/4-85/014, W.B. Horning et C.I. Weber (dir.), USEPA, Cincinnati (OH) (1985b).
- _____, *Ambient Water Quality Criteria for Ammonia - 1984*, EPA-440/5-85-001, USEPA, Washington, DC (1985c).
- _____, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, 2^e éd., EPA-600/4-89/001, USEPA, Cincinnati (OH) (1989).
- _____, *Field and Laboratory Methods Manual, EMAP Surface Waters, Northeast Lake Pilot*, rapport inédit, D.J. Klemm et J.M. Lazorchak (dir.), Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (1991a).
- _____, *Standard Operating Procedure for the Culture of *Hyaella azteca**, rapport inédit, J. Denny et S. Collyard, Environmental Research Laboratory, USEPA, Duluth (MN) (1991b).
- _____, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, EPA-600/4-90/027, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (1991c).
- _____, *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures* (2^e éd.), EPA-600/6-91/003, T.J. Norberg-King, D.I. Mount, E.J. Durhan, G.T. Ankley, L.P. Burkhard, J.R. Amato, M.T. Lukasewycz, M.K. Schubauer-Berigan et L. Anderson-Carnahan (réd.), Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, USEPA, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Rept 18-90, Duluth (MN) (1991d).
- _____, *Toxicity Identification Evaluation: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I*, EPA-600/6-91/005F, préparé par T.J. Norberg-King, D.I. Mount, J.R. Amato, D.A. Jensen et J.A. Thompson, Office of Research and Development, USEPA, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Rept. 02-92, Duluth (MN) (1992).
- _____, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, EPA-600/4-90/027F, Office of Research and Development, Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (1993).

- _____, *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*, EPA-600/R-94/024, USEPA, Duluth (MN) (1994a).
- _____, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms* (2^e éd.), EPA-600/4-91/003, Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati (OH) (1994b).
- _____, *1999 Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia* », EPA-823-F-99-013, Office of Water, USEPA, Washington, DC (1999).
- _____, *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates* (2^e éd.), EPA-600/R-99/064, Office of Research and Development, Mid-Continent Ecology Division, USEPA, Duluth (MN), et Office of Science and Technology, Office of Water, USEPA, Washington, DC (2000).
- _____, *Methods for Collection, Storage and Manipulation of Sediments for Chemical and Toxicological Analyses: Technical Manual*, EPA-823-B-01-002, Office of Water, USEPA, Washington, DC (2001).
- _____, *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms* (4^e éd.), EPA-821-R-02-013, Office of Water, USEPA, Washington, DC (2002).
- _____, *Guidance for the Use of Dilution-Water (negative) and Solvent Controls in Statistical Data Analysis for Guideline Aquatic Toxicology Studies*, Memo from Statistics Workgroup and Aquatic Biology Technical Team to Donald Brady, Director, Environmental Fate and Effects Division, Office of Pesticides Programs, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, USEPA, Washington, DC (2008).
- _____, *National Pollutant Discharge Elimination System Test of Significant Toxicity Implementation Document*, EPA-833-R-10-003, Office of Wastewater Management, USEPA, Washington, DC (2010).
- _____, *Suggested Requirements and Performance Criteria for Laboratories Conducting Sediment Toxicity Tests*, memo from David R. Mount, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, to D. Scott Ireland, Great Lakes National Program Office, Chicago (IL) (2011).
- USEPA/USACE (United States Environmental Protection Agency/United States Army Corps of Engineers), *Evaluation of Dredged Material Proposed for Discharge in Inland and Near Coastal Waters - Testing Manual (Draft)*, EPA-823-B-94-002, Washington, DC (1994).
- Van der Hoeven, N., « Power Analysis for the NOEC: What is the Probability of Detecting Small Toxic Effects on Three Different Species using the Appropriate Standardized Test Protocols? », *Ecotoxicology*, 7:355-361 (1998).
- Wang, N., R.J. Erickson, C.G. Ingersoll, C.D. Ivey, E.L. Brunson, T. Augspurger et M.C. Barnhart, « Influence of pH on the Acute Toxicity of Ammonia to Juvenile Freshwater Mussels (Tafmucket, *Lampsilis siliquoidea*) », *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(5):1141-1146 (2008).
- West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps et G.T. Ankley, « Comparison of the Relative Sensitivity of Three Benthic Invertebrates to Copper-contaminated Sediments from the Keweenaw Waterway », *Hydrobiologia*, 262:57-63 (1993).
- Whiteman, F.W., G.T. Ankley, M.D. Kahl, D.M. Rau et M.D. Balcer, « Evaluation of Interstitial Water as a Route of Exposure for Ammonia in Sediment Tests with Benthic Macroinvertebrates », *Environ. Toxicol. Chem.*, 15:794-801 (1996).
- Williams, D.A., « The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control », *Biometrics*, 28:519-532 (1972).
- Witt, J.D.S., et P.D.N. Hebert, « Cryptic Species Diversity and Evolution in the Amphipod genus *Hyalella* within central glaciated North America: A Molecular Phylogenetic Approach », *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques*, 57:687-698 (2000).

Yee, S., M. Van Rikxoort et D. McLeay, *The Effect of Holding Time on Eohaustorius washingtonianus During Ten-day Sediment Bioassays and Reference Toxicant Tests*, rapport inédit préparé pour Environnement Canada (Protection de l'environnement, Conservation et protection) et le Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique, North Vancouver (BC) (1992).

Zajdlik (Zajdlik and Associates Inc.), *Statistical Guidance for Ecotoxicological Data Derived Using Environment Canada Standardized Biological Test*

Methods », rapport inédit préparé par Zajdlik and Associates Inc., Rockwood (ON), pour la Section des méthodes biologiques, Environnement Canada, Ottawa (ON) (2010).

Zumwalt, D.C., F.J. Dwyer, I.E. Greer et C.G. Ingersoll, « A Water-renewal System that Accurately Delivers Small Volumes of Water to Exposure Chambers », *Environ. Toxicol. Chem.*, 13:1311-1314 (1994).

Annexe A

Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par l'Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada^a

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996 et mai 2007
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur <i>Daphnia</i> spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie du cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21 2 ^e édition	Février 2007	—
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22 2 ^e édition	Février 2011	—
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente <i>Photobacterium phosphoreum</i>	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce	SPE 1/RM/25 2 ^e édition	Mars 2007	—
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27 2 ^e édition	Février 2011	—
Essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique)	SPE 1/RM/28 2 ^e édition	Juillet 1998	—

^a Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Services des communications, Environnement Canada, Ottawa (ON) K1A 0H3, Canada. Pour en commander des copies papier, prière d'envoyer un courriel à epspubs@ec.gc.ca. Il est également possible de les télécharger gratuitement en format PDF à partir de l'adresse suivante : www.ec.gc.ca/faunescience-wildlifescience/default.asp?lang=Fr&n=0BB80E7B-1. Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le chef de la Section de l'évaluation biologique et normalisation, Environnement Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0H3, Canada.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)			
Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (<i>Chironomus tentans</i> ou <i>Chironomus riparius</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	—
Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyaella azteca</i> dans les sédiments	SPE 1/RM/33 2 ^e édition	Janvier 2013	—
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37 2 ^e édition	Janvier 2007	—
Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides (<i>Polydora cornuta</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	—
Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre (<i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia fetida</i> ou <i>Lumbricus terrestris</i>)	SPE 1/RM/43	Juin 2004	Juin 2007
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Février 2005	Juin 2007
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/47	Septembre 2007	—
B. Méthodes de référence^b			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2 ^e édition	Décembre 2000	Mai 2007
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 2 ^e édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/35	Décembre 1998	—
Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	—

^b Dans le présent contexte, on définit une *méthode de référence* comme étant une méthode d'essai biologique spécifique en vue de la réalisation d'un essai de toxicité, respectant une série de conditions expérimentales et de modes opératoires décrits avec précision dans un document écrit. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique génériques (polyvalentes ou « universelles ») publiées par Environnement Canada, les *méthodes de référence* sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
C. Documents d'orientation			
Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence	SPE 1/RM/12	Août 1990	—
Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques	SPE 1/RM/29	Décembre 1994	—
Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence	SPE 1/RM/30	Septembre 1995	—
Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats	SPE 1/RM/34	Décembre 1999	—
Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres	SPE 1/RM/44	Mars 2004	—
Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité	SPE 1/RM/46	Mars 2005	Juin 2007
Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/50	Mars 2008	—
Renseignements de base et conseils supplémentaires pour l'étude de la létalité aiguë d'un effluent d'eau usée pour la truite arc-en-ciel	—	Mars 2008	—
Guide d'échantillonnage et de préparation de sol contaminé aux fins d'essais biologiques	SPE 1/RM/53	Février 2012	—

Annexe B

Membres du Groupe intergouvernemental sur les essais écotoxicologiques (en mai 2012)

Gouvernement fédéral, Environnement Canada

Suzanne Agius
Section des programmes de protection marine
Gatineau (QC)

Fabiola Akaishi
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (NB)

Adrienne Bartlett
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (ON)

Lorraine Brown
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Joy Bruno
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Craig Buday
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Ken Doe (membre émérite)
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (NB)

Garth Elliott
Laboratoire des essais environnementaux des Prairies
et du Nord
Edmonton (AB)

Chris Fraser
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

François Gagné
Recherche sur les écosystèmes fluviaux
Montréal (QC)

Patricia Gillis
Division de la recherche sur la protection
des écosystèmes aquatiques
Burlington (ON)

Manon Harwood
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (QC)

Ryan Hennessy
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Dale Hughes
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (NB)

Paula Jackman
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (NB)

Nancy Kruper
Laboratoire des essais environnementaux des Prairies
et du Nord
Edmonton (AB)

Heather Lemieux
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Michelle Linssen-Sauvé
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Danielle Milani
Division de la recherche sur les conséquences
pour les écosystèmes aquatiques
Burlington (ON)

Warren Norwood
Division de la recherche sur la protection
des écosystèmes aquatiques
Burlington (ON)

Heather Osachoff
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Joanne Parrott
Division de la recherche sur la protection
des écosystèmes aquatiques
Burlington (ON)

Linda Porebski
Section des programmes de protection marine
Gatineau (QC)

Juliska Princz
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Jessica Rahn
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Ellyn Ritchie
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Grant Schroeder
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Richard Scroggins
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Rachel Skirrow
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Troy Steeves
Laboratoire des essais environnementaux
de l'Atlantique
Moncton (NB)

David Taillefer
Section des programmes de protection
du milieu marin
Gatineau (QC)

Lisa Taylor (présidente)
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Sylvain Trottier
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (QC)

Graham van Aggelen
Laboratoire des essais environnementaux
du Pacifique et du Yukon
North Vancouver (BC)

Leana Van der Vliet
Laboratoires de science et technologie
Ottawa (ON)

Brian Walker
Laboratoire des essais environnementaux du Québec
Montréal (QC)

Peter Wells (membre émérite)
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (NS)

***Gouvernement fédéral,
Pêches et Océans Canada***

Robert Roy
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (QC)

***Gouvernement fédéral,
Ressources naturelles Canada***

Melissa Desforges
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (ON)

Morgan King
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (ON)

Philippa Huntsman-Mapila
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (ON)

Carrie Rickwood
Programme Gestion du risque lié aux écosystèmes
Laboratoire des mines et des sciences minérales,
CANMET
Ottawa (ON)

Gouvernements provinciaux

Richard Chong-Kit
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (ON)

Kim Hunter
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (ON)

Mary Moody
Saskatchewan Research Council
Saskatoon (SK)

David Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (ON)

Julie Schroeder
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Toronto (ON)

Trudy Watson-Leung
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Etobicoke (ON)

Établissements privés de recherche/autres

Christian Bastien
Centre d'expertise en analyse environnementale
du Québec
Ste-Foy (QC)

Barbara Bayer
ALS Environmental
Winnipeg (MB)

Bozena Glowacka
ALS Environmental
Winnipeg (MB)

Annexe C

Administration centrale et bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada**Administration centrale**

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

Région de l'Atlantique

45, chemin Alderney
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région du Québec

1550, avenue d'Estimauville
Québec (Québec)
G1J 0C3

Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin
Downsview (Ontario)
M3H 5T4

Région de l'Ouest et du Nord**Bureau de l'Alberta :**

4999, 98^e Avenue
Edmonton (Alberta)
T6B 2X3

Bureau du Manitoba :

150-123, rue Main
Winnipeg (Manitoba)
R3C 4W2

Région du Pacifique et du Yukon**Bureau de Vancouver :**

401, rue Burrard
Vancouver (Colombie-Britannique)
V6C 3S5

Bureau du Yukon :

91782, route de l'Alaska
(Yukon)
Y1A 5B7

Annexe D

Variantes des méthodes d'élevage de *H.azteca*, décrites dans des documents canadiens et étatsuniens

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, selon le sigle de l'organisme dont ils émanent :

- MPO (1989)** : Borgmann et Munawar (1989) et Borgmann et coll. (1989). Ces deux publications énoncent les modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés à l'époque par le Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, ministère des Pêches et des Océans, Burlington (ON).
- USFWS (1990)** : Ingersoll et Nelson (1990). Cette publication énonce les modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés à l'époque par le National Fisheries Contaminant Research Center, Fish and Wildlife Service des États-Unis, Columbia (MO).
- ASTM (1991)** : Norme publiée par l'American Society for Testing and Materials, Philadelphie (PA), pour l'exécution d'essais toxicologiques sur un sédiment, avec des invertébrés dulcicoles. Le document a fait l'objet d'une nouvelle publication en 1993 (v. ASTM, 1991a, 1993, dans les références).
- USEPA (1991a)** : Comprend la version provisoire (avril 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage et d'essai utilisés par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (v. USEPA, 1991a, dans les références).
- USEPA (1991b)** : Version provisoire (25 octobre 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage utilisés par l'Environmental Research Laboratory, USEPA, Duluth (MN) (v. USEPA, 1991b, dans les références).
- USEPA (1991c)** : Présentation sommaire des méthodes d'élevage utilisées par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (v. Smith et coll., 1991a, dans les références).
- MPO (1992)** : Modes opératoires normalisés (document inédit) d'élevage et d'essai utilisés par U. Borgmann, Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, ministère des Pêches et des Océans, Burlington (ON). Ces mêmes modes opératoires sont décrits dans Borgmann et Norwood (1993) (v. MPO, 1992, dans les références).
- INRE (1992)** : Modes opératoires normalisés (document inédit) d'élevage et d'essai, utilisés par K. Day, Institut national de recherche sur les eaux, Direction de la recherche sur les cours d'eau, Centre canadien des eaux intérieures, Environnement Canada, Burlington (ON) (v. INRE, 1992, dans les références).
- USEPA (1992)** : Norberg-King (1992), Environmental Research Laboratory, USEPA, Duluth (MN). Résumé des modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés dans 18 laboratoires du Canada et des États-Unis.
- USFWS (1992)** : Ingersoll (1992), Fish and Wildlife Service des États-Unis, Columbia (MO). Énumération des modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés dans divers laboratoires.
- USEPA (1994a)** : Méthodes publiées de mesure de la toxicité et de la bioaccumulation des contaminants de sédiments, chez des invertébrés dulcicoles, par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger) (v. USEPA, 1994a, dans les références).

D-1. Origine des géniteurs

Document ^a	Origine des géniteurs
MPO (1989)	rivage marécageux d'un petit lac près de Burlington (ON)
USFWS (1990)	n.i. ^b
ASTM (1991)	eau douce naturelle, autre laboratoire ou fournisseur commercial
USEPA (1991a)	eau douce naturelle, autre laboratoire ou fournisseur commercial
USEPA (1991b)	meilleure source : une baie du lac Supérieur; sources acceptables : autres laboratoires, fournisseurs commerciaux, prélèvements locaux
USEPA (1991c)	souche Newtown de l'USEPA
MPO (1992)	rivage marécageux d'un petit lac près de Burlington (ON)
INRE (1992)	laboratoire du Centre canadien des eaux intérieures de Burlington (W. Norwood/ U. Borgmann)
USEPA (1992)	origines diverses (rivière St. Louis, 2 labos ^c ; lac près de Burlington, 2 labos; étang du Michigan, 1 labo; souche Nebeker, 8 labos; souche Newtown de l'USEPA, 4 labos)
USFWS (1992)	n.i. (origines diverses, selon le laboratoire)
USEPA (1994a)	origines diverses (éviter les populations sauvages, sauf s'il a été démontré qu'elles pouvaient se croiser avec des populations d'élevage)

^a Voir la page précédente pour les références exactes.

^b Non indiqué. Il s'agissait de la souche Corvallis de l'USEPA, fournie par A. Nebeker.

^c Laboratoires.

D-2. Récipients d'élevage, volume d'eau et nombre d'amphipodes

Document	Type de récipient	Volume d'eau (L)	Nombre d'amphipodes adultes par litre
MPO (1989)	bocal en verre Pyrex de 2,5 L	1,0	5-25
USFWS (1990)	aquarium en verre de 80 L	50	n.i. ^a
ASTM (1991)	aquarium de 10 ou de 20 L	n.i.	n.i.
USEPA (1991a)	aquarium de 8 L	6	n.i.
USEPA (1991b)	cuve de laboratoire ou aquarium de 2 L	1,0	60
USEPA (1991c)	gobelet de 30 mL	0,02	100
	bécher en verre de 1 L	n.i.	80
	aquarium de 8 L	6,0	17-33
	aquarium de 76 L	40,0	13-50
MPO (1992)	bocal en Pyrex de 2,5 L	1,0	5-25
INRE (1992)	aquarium en verre de 10 L	8,0	20-25
	bocal en verre de 1,2 L	1,0	20-25
USEPA (1992)	aquarium de 1-39 L	0,8 à 38	n.i.
USFWS (1992)	aquarium de 1-100 L ^b	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	bécher en verre de 2 L	1,0	50
	bocal en verre de 2,5 L	1,0	5-25
	aquarium de 80 L	50,0	n.i.

^a Non indiqué (dépend de la méthode utilisée).

^b De préférence.

D-3. Origine et dureté de l'eau, méthode de renouvellement de l'eau d'élevage

Document	Origine de l'eau	Dureté de l'eau	Méthode de renouvellement
MPO (1989)	rob. déchl. ^a	130 mg/L	RI ^d (une fois par semaine)
USFWS (1990)	puits	283 mg/L	RC ^e (~3 fois par jour)
ASTM (1991)	puits, eau de surface, rob. déchl. ^b ou reconst. ^c	facultative	RI (25-30 % par semaine) ou RC (100 mL/min)
USEPA (1991a)	selon ASTM (1991)	facultative	RC (100 mL/min) ou RI (≥50 %/semaine)
USEPA (1991b)	de surface ou reconst.	n.i. ^f	RI (une fois par semaine)
USEPA (1991c)	puits, diluée ou non ^g	100 mg/L, 200 mg/L	RI (quotidiennement) ou RC
MPO (1992)	rob. déchl.	130 mg/L	RI (une fois par semaine)
INRE (1992)	rob. déchl.	n.i.	RI (30 % une fois par semaine)
USEPA (1992)	rob. déchl. (7), puits (4), de surface (3), reconst. (3)	de très douce à très dure	RI ou RC
USFWS (1992)	origines diverses	douce/dure ^h	RI ou RC ^h
USEPA (1994a)	puits, de surface, reconst. ⁱ , rob. déchl. ^b , estuarienne ^j	facultative	RI ou RC ^k

^a Eau du robinet (aqueduc municipal) déchlorée.

^b On ne devrait utiliser de l'eau déchlorée qu'en dernier recours, car la déchloration est souvent incomplète.

^c Eau reconstituée.

^d Renouvellement intermittent.

^e Renouvellement continu.

^f Non indiqué.

^g Eau désionisée utilisée pour abaisser la dureté de l'eau de puits de 200 mg/L à 100 mg/L.

^h De préférence.

ⁱ Une formule est fournie pour préparer une eau reconstituée convenable d'une dureté de 90-100 mg/L.

^j *H. azteca* a été élevé dans de l'eau salée reconstituée d'une salinité de <15 ‰.

^k On recommande le renouvellement de l'eau d'élevage, par l'ajout d'au moins un volume par jour. On devrait pour le moins renouveler l'eau sus-jacente ≥1 une fois par semaine, par siphonnement.

D-4. Température, aération et éclairage au cours de l'élevage

Document	Température de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Éclairage
MPO (1989)	25	aucune aération	phot. de 16 h ^a , fluoresc. ^b , 55 µE/m ² /s ^c
USFWS (1990)	20 ± 2	débit lent (~2 bulles/s)	phot. de 16 h, 269-538 lux
ASTM (1991)	20 ± 2	débit lent si RI ^d	phot. de 16 h, 5382 lux
USEPA (1991a)	25 ± 2	débit lent si RI	phot. de 16 h, 5382 lux
USEPA (1991b)	25	débit lent (pierre poreuse)	phot. de 16 h, 1280 lux
USEPA (1991c)	25 (RC) ^e 23 (RI)	RI seulement	phot. de 16 h, 538-1076 lux
MPO (1992)	25	aucune aération	phot. de 16 h, fluoresc., 55 µE/m ² /s ^c
INRE (1992)	23 ± 1	débit lent	phot. de 16 h, 51 µE/m ² /s
USEPA (1992)	15-25 ^f	n.i. ^g	n.i.
USFWS (1992)	20 ^h -25	débit modéré	phot. de 16 h, 538-1076 lux
USEPA (1994a)	23	oui si en conditions statiques ou RI	phot. de 16 h, 500-1000 lux

^a Photopériode de 16 h.

^b Tubes fluorescents, éclairage vertical.

^c Dans le laboratoire de ces chercheurs, 1 µE/m²/s = 102,5 lux. Le coefficient de conversion pourrait différer selon le type d'éclairage.

^d Renouvellement intermittent.

^e Renouvellement continu.

^f 1 labo à 15 °C; 3 labos à 20 °C; 1 labo à 21 ± 2 °C; 8 labos à 23 °C; 4 labos à 25 °C.

^g Non indiqué.

^h De préférence.

D-5. Substrat d'élevage des amphipodes

Document	Description du substrat	Quantité de substrat
MPO (1989)	gaze en plastique ou de coton	plusieurs bandes par bocal
USFWS (1990)	feuilles d'érable à sucre, préalablement mises à tremper pendant 30 jours, puis rincées pendant 1 h avant l'emploi	n.i. ^a
ASTM (1991)	feuilles séchées d'érable, d'aulne, de bouleau ou de peuplier, préalablement mises à tremper plusieurs jours, puis rincées	n.i.
USEPA (1991a)	essuie-tout brun déchiqueté	n.i.
USEPA (1991b)	tampons de gaze de 10 cm × 10 cm, préalablement mis à tremper dans l'eau d'élevage pendant 24-48 h	1 par bocal
USEPA (1991c)	une seule épaisseur d'essuie-tout brun non blanchi	n.i.
MPO (1992)	bande de gaze stérile de 5 cm × 10 cm ou bande de 5 cm × 10 cm de tulle de nylon Nitex® à mailles de 210 µm	1 par bocal
INRE (1992)	bandes de 2,5 cm × 2,5 cm de tulle de nylon Nitex® à mailles de 500 µm, préalablement mises à tremper dans l'eau d'élevage pendant 24 h	8 par aquarium, 1 par bocal
USEPA (1992)	variable (gaze hydrophile, 4 labos ^b ; feuilles, 4 labos; essuie-tout, 2 labos; mailles en plastique, 2 labos; tulle de nylon Nitex®, 1 labo; tulle de nylon Nitex®, sable, essuie-tout, 1 labo; sédiment, essuie-tout, 1 labo; mailles en plastique, feuilles, 1 labo; mailles, essuie-tout, 1 labo; aucun, 1 labo)	n.i.
USFWS (1992)	feuilles d'érable ^c , tulle de nylon Nitex®, gaze de coton, toile en plastique 3-M	n.i.
USEPA (1994a)	variable (p. ex., gaze de coton, feuilles d'érable, tissé de synthèse spiralé)	n.i.

^a Non indiqué.^b Laboratoires.^c De préférence.

D-6. Alimentation pendant l'élevage

Document	Description des aliments	Quantité par litre ^a	Fréquence des repas
MPO (1989)	flocons ^b d'aliments pour poissons TetraMin®	20 mg	1-3 fois par semaine
USFWS (1990)	feuilles d'érable à sucre, plus mélange standard moulu Tetra®	n.i. ^c	à volonté
ASTM (1991)	choix de feuilles séchées d'érable, d'aulne, de bouleau ou de peuplier; granulés pour lapin; feuilles de céréales moulues; granulés d'aliments pour poissons; artémias; <i>Daphnia</i> tuées par la chaleur; algues vertes et épinards	n.i.	n.i.
USEPA (1991a)	flocons d'aliments pour poissons TetraMin® et artémias	3,3 mg	1 fois par jour
USEPA (1991b)	succès plus grand si on utilise des algues filamenteuses et le mélange de LCT ^d ; diatomées cultivées (<i>Synedra</i>), comme solution de rechange	10 mL de LCT une pincée d'algues	3 fois par semaine 1 fois par semaine
USEPA (1991c)	flocons moulus d'aliments pour poissons plus algues séchées (<i>Spirulina</i> sp.)	50-167 mg	2 fois par jour
MPO (1992)	flocons d'aliments pour poissons TetraMin® ^b	10 mg	1-3 fois par semaine
INRE (1992)	flocons d'aliments pour poissons Nutrafin® ^b	2 ou 4 gouttes ^e	2 fois par semaine
USEPA (1992)	divers aliments (un seul type d'aliment, 7 labos; plusieurs types, 11 labos) ^f	variable	variable ^g
USFWS (1992)	feuilles d'érable ^h , TetraMin®, nourriture pour lapin, diatomées	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	divers aliments (p. ex., LCT plus algues; TetraMin®)	variable	variable

^a Quantité de nourriture ajoutée par litre d'eau d'élevage.

^b Flocons moulus passés à travers un tamis à mailles de nylon de 500 µm.

^c Non indiqué.

^d Levure, Cerophyll^{MC} et nourriture pour truite (régime de l'USEPA pour l'élevage de *Ceriodaphnia dubia*).

^e 2 gouttes d'une suspension de 100 mg de Nutrafin® par millilitre, ajoutées dans chaque bocal; 4 gouttes dans chaque aquarium.

^f Comprennent diverses rations de levure, de Cerophyll^{MC}, d'algues, de diatomées, d'agropyre, de luzerne, de TetraMin®, de Nutrafin®, de LCT, de granulés pour lapin, de feuilles et de morceaux d'essuie-tout.

^g Pour les élevages avec renouvellement intermittent, la fréquence des repas allait de 1 fois par mois à 2 fois par jour (47 % des labos donnent 2 repas par semaine); dans les élevages avec renouvellement continu, la fréquence des repas variait de 1 fois par semaine à 1 fois par jour.

^h De préférence.

D-7. Prélèvement des jeunes destinés aux essais

Document	Mode opératoire	Fréquence	Nombre de jeunes par litre ^a
MPO (1989)	secouer le substrat; filtrer à travers un tamis à mailles de 275 µm et recueillir les sujets dans une boîte de Petri; rincer et trier ^b	1 fois par semaine	n.i. ^c
USFWS (1990)	par rinçage, détacher des feuilles une partie des sujets d'âges mélangés; filtrer à travers un tamis à mailles de 425 µm, de façon à obtenir des sujets de ≤3 mm de longueur; conserver pendant la nuit dans des béciers de 1 L, en eau aérée	n.i.	n.i.
ASTM (1991)	par rinçage, détacher des feuilles une partie des sujets d'âges mélangés; filtrer à travers un tamis à mailles de 250 µm (juvéniles) ou de 425 µm (adultes); conserver les juvéniles ≤24 h dans des béciers	n.i.	n.i.
USEPA (1991a)	obtenir à partir d'adultes ^d ou tamiser quotidiennement	1 fois par jour	n.i.
USEPA (1991b)	verser le contenu du bocal dans une cuvette peu profonde; rincer délicatement et détacher les animaux du substrat; compter et remettre les adultes dans le bocal; compter les jeunes et les utiliser ou les élever encore 7 jours	1 fois par semaine	n.i.
USEPA (1991c)	tamiser les jeunes issus des couples d'adultes	3 fois par semaine	33-120 ^e
MPO (1992)	conformément à Borgmann et Munawar (1989)	1 fois par semaine	5-25
INRE (1992)	passer le contenu du bocal au tamis à mailles de 363 µm et recueillir par rinçage les sujets dans une boîte de Petri; séparer les jeunes au moyen d'une pipette; compter les adultes; compter les jeunes et les conserver	1 fois par semaine	20-35
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	divers modes opératoires, pour obtenir des amphipodes âgés de 7-14 jours	variable	variable

^a Nombre estimatif de jeunes prélevés par litre d'eau d'élevage.

^b Une fois séparés, les jeunes sont conservés 2 jours dans des bocaux renfermant 1 L d'eau, une bande de gaze de 5 cm × 10 cm et 20 mg de TetraMin®, avant de servir aux essais. On peut ainsi s'assurer de leur survie et déterminer le nombre de jeunes dont on dispose.

^c Non indiqué.

^d Les couples d'adultes sont placés dans des béciers de 1 L, à raison de 25 couples par bécier, et sont nourris. Après 24 h, on prélève les jeunes.

^e Un bécier de 1 L, avec renouvellement quotidien de la nourriture et de l'eau, peut donner 120 jeunes par jour.

Variantes des modes opératoires des essais toxicologiques sur un sédiment, avec *H. azteca*, décrites dans des documents canadiens et étatsuniens

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, selon le sigle de l'organisme dont ils émanent :

MPO (1989) : Borgmann et Munawar (1989) et Borgmann et coll. (1989). Ces deux publications énoncent les modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés à l'époque par le Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, ministère des Pêches et des Océans, Burlington (ON).

USFWS (1990) : Ingersoll et Nelson (1990). Cette publication énonce les modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés à l'époque par le National Fisheries Contaminant Research Center, Fish and Wildlife Service des États-Unis, Columbia (MO).

ASTM (1991) : Norme publiée par l'American Society for Testing and Materials, Philadelphie (PA), pour l'exécution d'essais toxicologiques sur un sédiment, avec des invertébrés dulcicoles. Le document a fait l'objet d'une nouvelle publication en 1993 (v. ASTM, 1991a, 1993, dans les références).

USEPA (1991a) : Comprend la version provisoire (avril 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage et d'essai utilisés par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (v. USEPA, 1991a, dans les références).

USEPA (1991c) : Présentation sommaire des méthodes d'essai utilisées par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (v. Smith et coll., 1991b, dans les références).

MPO (1992) : Modes opératoires normalisés (document inédit) d'élevage et d'essai utilisés par U. Borgmann, Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, ministère des Pêches et des Océans, Burlington (ON). Ces mêmes modes opératoires sont décrits dans Borgmann et Norwood (1993) (v. MPO, 1992, dans les références).

INRE (1992) : Modes opératoires uniformisés (document inédit) d'élevage et d'essai, utilisés par K. Day, Institut national de recherche sur les eaux, Direction de la recherche sur les cours d'eau, Centre canadien des eaux intérieures, Environnement Canada, Burlington (ON) (v. INRE, 1992, dans les références).

USEPA (1992) : Norberg-King (1992), Environmental Research Laboratory, USEPA, Duluth (MN). Résumé des modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés dans 18 laboratoires du Canada et des États-Unis.

USFWS (1992) : Ingersoll (1992), Fish and Wildlife Service des États-Unis, Columbia (MO). Énumération des modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés dans divers laboratoires.

USEPA (1994a) : Méthodes publiées de mesure de la toxicité et de la bioaccumulation des contaminants de sédiments, chez des invertébrés dulcicoles, par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger) (v. USEPA, 1994a, dans les références).

E-1. Type d'essai, âge/taille des sujets, type de récipient, nombre d'amphipodes par récipient, nombre de répétitions par traitement et durée de l'essai

Document ^a	Type d'essai	Âge/taille des sujets	Récipient d'essai	Nombre de sujets par récipient	Nombre de répétitions	Durée de l'essai (jours)
MPO (1989)	c. stat. ^b	0-7 jours	bocal de 2,5 L	20	n.i. ^c	28
USFWS (1990)	c. stat. RC ^d	≤3 mm ^e	b. 1 L ^g	20	4	29
		≤3 mm	b. 1 L	20	4	29
ASTM (1991)	c. stat. c. stat. RC	2-3 mm ^f	b. 1 L	20	4	≤10-30
		2-3 mm	aquar. 20 L	100	≥2	≤10-30
		2-3 mm	b. 1 L	20	4	≤10-30
USEPA (1991a)	RI ^h	2 ± 1 jour	600 mL	20	4	7
USEPA (1991c)	RI	2 ± 1 jour	600 mL	20	4	7
MPO (1992)	c. stat.	0-7 jours	b. 250 mL	20	4	28
INRE (1992)	c. stat. ^b	1-10 jours	b. 250 mL	15	5	28
USEPA (1992)	c. stat. ⁱ	variable ^j	n.i.	n.i.	n.i.	10-28 ^k
USFWS (1992)	RC ^l	7-14 jours ^m	1 L ⁿ	20	4 ou 5	7-28 ^o
USEPA (1994a)	RI ou RC ^p	7-14 jours	300 mL	10	8 ^q	10

^a Voir la page précédente pour les références exactes.

^b Conditions statiques. Ajout d'eau distillée au besoin pour maintenir constant le niveau de l'eau.

^c Non indiqué.

^d Renouvellement continu.

^e Vers le troisième stade de développement.

^f Juvéniles, deuxième ou troisième stade de développement.

^g Bécher.

^h Renouvellement intermittent.

ⁱ Dans 10 des 12 laboratoires, l'eau n'était pas remplacée, les 2 autres complétaient le volume. Dans 9 des 18 laboratoires, les essais comportaient des renouvellements à une fréquence allant de toutes les 4-6 heures à 2 fois par semaine.

^j 7 labos, âge connu; 8 labos, tamisage en fonction de la taille ou de l'âge; 2 labos, âges mélangés; 1 labo, âge inconnu.

^k 8 labos, 10 jours; 1 labo, 10-14 jours; 4 labos, 14 jours; 1 labo, 20 jours; 4 labos, 28 jours.

^l Également en conditions statiques ou à renouvellement intermittent.

^m De préférence : âges mélangés (~7-14 jours); également, âge connu (0-7 jours ou 7-14 jours).

ⁿ De préférence; peut varier de 25 mL à 100 L.

^o De préférence : 10 jours.

^p Correspondant à l'ajout de 2 volumes d'eau par jour, par renouvellement intermittent ou continu.

^q Selon les objectifs de l'essai. Huit répétitions sont recommandées pour les essais courants.

E-2. Récipients d'essai et milieux

Document	Récipient	Couvercle	Quantité de sédiment	Quantité d'eau
MPO (1989)	bocal de Pyrex de 2,5 L, à couvercle vissant	feuille de Plexiglas ^{MC}	1-1,5 cm d'épaisseur	n.i. ^{a, b}
USFWS (1990)	bécher en verre de 1 L	verre de montre	200 mL	800 mL
ASTM (1991)	bécher en verre de 1 L aquarium de 20 L	verre de montre n.i.	200 mL 2-3 cm d'épaisseur	800 mL 15 cm d'épaisseur
USEPA (1991a)	600 mL	verre de montre ou feuille en verre/plastique	100 mL	400 mL
USEPA (1991c)	600 mL	n.i.	100 mL	400 mL
MPO (1992)	bécher de 250 mL	boîte de Petri en plastique ^c	40 mL ^d	160 mL ^d
INRE (1992)	bécher de 250 mL	boîte de Petri ^e	50 mL	200 mL
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	1 L ^f	n.i.	n.i. ^g	n.i. ^g
USEPA (1994a)	bécher de 300 mL, de forme haute, sans rebord	n.i.	100 mL	175 mL

^a n.i. : non indiqué.

^b Volume total (sédiment plus eau de mer) : 1,5 L.

^c Entaille, pour l'aération.

^d Le sédiment est versé dans le bécher après l'eau.

^e Orifice percé pour le passage d'une conduite d'air.

^f De préférence; plage de 25 mL à 100 L.

^g Le ratio sédiment-eau peut varier de 1:4 (de préférence) à 1:1.

E-3. Origine et dureté de l'eau, méthode de renouvellement de l'eau au cours de l'essai

Document	Origine de l'eau	Dureté de l'eau	Méthode de renouvellement
MPO (1989)	eau du robinet déchlorée ^a	130 mg/L	conditions statiques, avec ajout d'eau pour maintenir le niveau constant ^b
USFWS (1990)	restituée ^c	134 mg/L	conditions statiques, renouvellement continu ^{d, e}
ASTM (1991)	eau de puits, de surface, déchlorée (du robinet) ou reconstituée	facultative	conditions statiques ou à renouvellement continu
USEPA (1991a)	eau de puits diluée ^f	90-110 mg/L	RI ^g
USEPA (1991c)	eau de puits diluée ^f	100 mg/L	RI, quotidiennement
MPO (1992)	eau du robinet déchlorée ^a	130 mg/L	conditions statiques ^h
INRE (1992)	eau du robinet déchlorée ^a	n.i. ⁱ	conditions statiques ^j
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	conditions statiques ou renouvellement de l'eau ^k
USFWS (1992)	n.i.	douce, dure ^l	conditions statiques, RI, RC ^l
USEPA (1994a)	eau d'élevage, eau de puits, eau de surface, eau prélevée sur le site à l'étude ou eau reconstituée ^m	facultative	RI ou RC, 2 fois par jour ⁿ

^a Même origine et même dureté que l'eau d'élevage des amphipodes.

^b Ajout d'eau distillée, au besoin, pour maintenir le niveau constant.

^c On a utilisé une eau de puits d'une dureté de 283 mg/L pour l'élevage des amphipodes; au cours de l'essai, on a utilisé de l'eau reconstituée.

^d Renouvellement continu.

^e L'équivalent de 3,8 fois le volume du béccher, par jour.

^f Eau désionisée utilisée pour abaisser la dureté de l'eau de puits de 200 mg/L à 100 mg/L.

^g Renouvellement intermittent.

^h Renouvellement hebdomadaire de l'eau des milieux témoins uniquement.

ⁱ Non indiqué.

^j Les pertes par évaporation sont compensées hebdomadairement avec de l'eau distillée.

^k Sur 18 laboratoires, 10 fonctionnaient en conditions statiques, sans renouvellement de l'eau, 2 en conditions statiques avec maintien du niveau; 9 ont également renouvelé l'eau sus-jacente à une fréquence variant de 1 fois toutes les 4-6 h à 2 fois par semaine.

^l De préférence.

^m Une formule est fournie pour préparer une eau reconstituée convenable, d'une dureté de 90-100 mg de CaCO₃/L.

ⁿ Chaque récipient d'essai devrait recevoir 2 fois son volume d'eau sus-jacente par jour, de façon intermittente (ajout manuel ou automatisé) ou par renouvellement continu.

E-4. Température, aération et éclairage au cours de l'essai

Document	Température de l'eau (°C)	Conditions d'aération	Éclairage
MPO (1989)	21 ± 1	débit lent, au moyen de pierres poreuses suspendues à plusieurs centimètres au-dessus du sédiment	phot. de 16 h ^a , fluoresc. ^b 55 µE/m ² /s
USFWS (1990)	20 ± 2	débit lent (~2 bulles/s)	phot. de 16 h, 269-538 lux
ASTM (1991)	20-25	débit lent	phot. de 16 h, 538 lux
USEPA (1991a)	25 ± 1	débit lent	phot. de 16 h, 538 lux
USEPA (1991c)	25 ± 1	aucune aération	n.i.
MPO (1992)	25	débit lent, au moyen d'une pipette en verre jetable dont l'extrémité se trouve à une profondeur médiane de la colonne d'eau	phot. de 16 h, fluoresc.
INRE (1992)	23 ± 1	débit lent	phot. de 16 h
USEPA (1992)	20-25 ^c	n.i. ^d	n.i.
USFWS (1992)	20-25 ^e	aération nulle ou modérée ^f	phot. de 16 h, 269-538 lux
USEPA (1994a)	23 ± 1 ^g	normalement aucune ^h	phot. de 16 h, ~500-1000 lux, fluorescents à spectre étendu

^a Photopériode de 16 h.^b Tubes fluorescents, éclairage vertical.^c 7 laboratoires à 20 °C, 1 labo à 20-25 °C, 4 labos à 23 °C et 5 labos à 25 °C.^d Non indiqué.^e De préférence : 20 °C.^f De préférence : aucune aération.^g La température moyenne quotidienne doit être de 23 ± 1 °C; la température instantanée doit toujours être de 23 ± 3 °C.^h Aérer si la teneur en OD de l'eau sus-jacente chute à <40 % de la valeur de saturation.

E-5. Alimentation au cours de l'essai

Document	Description des aliments	Quantité par récipient	Fréquence des repas
MPO (1989)	flocons ^a d'aliments pour poissons TetraMin®	20 mg	1-3 fois par semaine
USFWS (1990)	granulés pour lapin Purina ^{MC}	14 ou 20 mg ^b	3 fois par semaine
ASTM (1991)	granulés pour lapin ^c	variable ^{b, d}	2-3 fois par semaine
USEPA (1991a)	flocons moulus d'aliments pour poissons TetraMin®	14 mg	3 fois par semaine
USEPA (1991c)	flocons d'aliments mélangés pour poissons	1 mL	aux jours 0, 2, 4 et 6
MPO (1992)	flocons ^a d'aliments pour poissons TetraMin®	5 mg	3 fois par semaine
INRE (1992)	flocons ^a d'aliments pour poissons Nutrafin®	8 mg ^e	2 fois par semaine
USEPA (1992)	n.i. ^f	n.i.	variable ^g
USFWS (1992)	variable ^h	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	LCT ⁱ	1,5 mL	quotidienne

^a Flocons moulus, puis passés au tamis de nylon à mailles de 500 µm.

^b Pour les essais en conditions statiques, 14 mg par béccher; pour les essais à renouvellement continu, 20 mg par béccher.

^c Il faudrait moudre les granulés, les disperser dans de l'eau désionisée et les remettre en suspension quand on en prélève des aliquotes.

^d On peut notamment donner 6 mg de granulés 3 fois par semaine pendant la première semaine et 12 mg par repas par la suite.

^e Suspension de Nutrafin® moulu, préparée par ajout de 1 g de flocons à 100 mL d'eau distillée, puis pulvérisation. Un volume de ~604 µL équivaut à 8 mg.

^f Non indiqué.

^g Sur 16 laboratoires, 5 ont donné 7 repas par semaine au cours des essais; 5 labos, 3 repas par semaine; 2 labos, 2 repas par semaine; 1 labo, 1 repas par semaine; 1 labo, 1 repas toutes les 48 h; 1 labo, 1 repas au début de l'essai seulement; 1 labo n'a donné aucun repas au cours de l'essai.

^h Aucune nourriture; nourriture pour lapin; LCT; feuilles d'érable; TetraMin®.

ⁱ Levures, Cerophyll^{MC} et nourriture pour truite.

E-6. Surveillance de la qualité de l'eau sus-jacente au cours de l'essai

Document	Variabes surveillées ^a	Fréquence
MPO (1989)	n.i. ^b	n.i.
USFWS (1990)	OD, pH, alc., dur., conduct.	au moins aux 10 jours, chaque traitement ^c
ASTM (1991)	OD pH, alc., dur., conduct. temp.	au début, à la fin et au moins toutes les semaines ^{d, e} au début, à la fin et au moins toutes les semaines ^d chaque jour ^{d, f}
USEPA (1991a)	OD, pH, alc., dur., conduct., temp.	au début et à la fin
USEPA (1991c)	n.i.	n.i.
MPO (1992)	OD, pH ammoniac	au début et au moins toutes les semaines ^c au début (facultatif, mais souhaitable)
INRE (1992)	OD, pH, conduct., temp.	aux jours 0, 14 et 28
USEPA (1992)	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	OD ^g pH ^g , alc., dur., conduct., ammoniac temp.	chaque jour au début et à la fin ^h chaque jour ^{d, f}

^a alc. : alcalinité totale; conduct. : conductivité spécifique; dur. : dureté totale; OD : oxygène dissous; pH : concentration de l'ion hydrogène; temp. : température.

^b Non indiqué.

^c Pour les mesures, on a prélevé 50 mL d'eau sus-jacente. Dans les essais en conditions statiques, on a remplacé ce prélèvement par de l'eau fraîche à température ajustée.

^d Mesures effectuées dans au moins un récipient d'essai représentatif de chaque traitement.

^e Mesure de l'OD obligatoire si on observe l'interruption de l'aération (en conditions statiques) ou du renouvellement de l'eau (renouvellement continu) et chaque fois que le comportement des sujets montre que la teneur en OD est trop faible (p. ex., amphipodes sortis du sédiment).

^f La température moyenne quotidienne doit se situer à ± 1 °C de la température souhaitée; la température instantanée doit se trouver à ± 3 °C de cette température.

^g Mesurable directement au moyen d'une sonde.

^h On devrait prélever de l'eau sus-jacente immédiatement avant le renouvellement de l'eau, à ~1-2 cm au-dessus du sédiment, à l'aide d'une pipette. Les valeurs ne devraient pas varier de >50 % au cours d'un essai.

E-7. Conditions d'entreposage et caractérisation du sédiment utilisé pour l'essai

Document	Conditions d'entreposage	Caractéristiques mesurées ^a
MPO (1989)	au réfrigérateur, dans des sacs en plastique	n.i. ^b
USFWS (1990)	à 4 °C dans des sacs en Téflon ^{MC} , dans les 24 h; à utiliser dans les 2 semaines	COT, CI, % d'eau, SLA, M, BPC, HAP
ASTM (1991)	4 ± 2 °C pendant ≤2 semaines ^c	au moins : pH, COT, % d'eau, SLA; facultatif : DBO, DCO, CI, MVT, SVA, Eh, HG, OS, AT, M, HAP, OP
USEPA (1991a)	4 °C pendant ≤2 semaines	n.i.
USEPA (1991c)	n.i.	n.i.
MPO (1992)	n.i.	% d'eau, MVT, MV
INRE (1992)	dans de petits seaux en plastique scellés, à 4 °C; à utiliser dans les 6 semaines	n.i.
USEPA (1992)	n.i.	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	4 °C ^d	au moins : pH et teneur en ammoniac total de l'eau de porosité, COT, % d'eau, SLA; facultatif : DBO, DCO, CEC, CI, MVT, SLA, Eh, HG, COS, M, HAP, OP

^a AT : ammoniac total; BPC : biphényles polychlorés totaux; CEC : capacité d'échange cationique; CI : carbone inorganique; COS : composés organiques de synthèse; COT : carbone organique total; DBO : demande biochimique en oxygène; DCO : demande chimique en oxygène; Eh : potentiel d'oxydo-réduction; HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques; HG : huiles et graisses; M : métaux (p. ex., As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn); MV : masse volumique (g/mL); MVT : matières volatiles totales; OP : eau de porosité; OS : organosiliiciés; pH : concentration de l'ion hydrogène; SLA : sable, limon et argile; SVA : sulfures volatils acides.

^b Non indiqué.

^c S'il est conservé >2 semaines, le sédiment devrait être soumis à de nouveaux essais pour confirmer que sa toxicité n'a pas changé.

^d Entreprandre l'essai toxicologique le plus tôt possible après le prélèvement de l'échantillon. S'il débute >2 semaines après le prélèvement, des caractérisations supplémentaires du sédiment sont souhaitables pour évaluer les effets possibles de l'entreposage.

E-8. Manipulation du sédiment avant l'essai

Document	Manipulation du sédiment
MPO (1989)	passer au tamis de nylon à mailles de 275 µm, en se servant de l'eau sus-jacente des bocaux utilisés pour l'essai; laisser reposer plusieurs jours avant de transférer les amphipodes
USFWS (1990)	mélanger dans le récipient d'entreposage; lisser l'aliquote avec une cuillère en Téflon ^{MC} dans le bécher d'essai; verser lentement l'eau sus-jacente le long de la paroi du bécher; laisser reposer pendant la nuit avant de transférer les amphipodes
ASTM (1991)	mélanger à fond; tamisage par voie humide autorisé pour éliminer les grosses particules et les organismes indigènes; on peut diluer et mêler le sédiment avec un volume égal d'eau sus-jacente pour faciliter le tamisage; lisser la couche de sédiment dans le récipient d'essai; verser lentement l'eau sus-jacente le long de la paroi du bécher, laisser reposer pendant la nuit avant de transférer les amphipodes
USEPA (1991a)	mélanger l'échantillon; lisser l'aliquote pour former une couche dans le récipient d'essai; verser lentement l'eau sus-jacente le long de la paroi du bécher; laisser reposer pendant la nuit avant de transférer les amphipodes
USEPA (1991c)	n.i.
MPO (1992)	mélanger l'échantillon ou prélever des aliquotes en plusieurs endroits; à l'aide d'une cuillère en acier inoxydable, transférer une aliquote dans le bécher renfermant déjà de l'eau; aérer vigoureusement l'eau sus-jacente pendant 24 h; réduire l'aération à un débit lent et laisser le sédiment reposer encore 24 h
INRE (1992)	passer à travers un tamis à mailles de 250 µm, en utilisant une partie de l'eau sus-jacente qui servira à l'essai; éliminer le refus du tamis et laisser le sédiment tamisé et l'eau sus-jacente reposer pendant la nuit; décanter l'eau sus-jacente pour l'utiliser dans l'essai; ajouter le sédiment dans les béchers de répétition puis l'eau sus-jacente; laisser reposer 24 h et aérer ≥1 h avant de transférer les amphipodes ^a
USEPA (1992)	n.i. ^b
USFWS (1992)	n.i.
USEPA (1994a)	mélanger, y compris toute eau s'étant séparée; on ne devrait pas tamiser les échantillons ^c ; retirer les gros organismes et les gros débris au moyen de pincettes

^a Dans certains cas, on congèle le sédiment tamisé pendant 24 h et on le fait dégeler, afin de tuer tous les œufs résiduels de tubificidés.

^b Non indiqué.

^c S'il faut tamiser le sédiment, on devrait prélever des échantillons avant et après le tamisage (p. ex., métaux présents dans l'eau de porosité) pour documenter l'influence du tamisage sur les propriétés chimiques du sédiment.

E-9. Fin de l'essai et paramètres de mesure biologiques

Document	Fin de l'essai	Paramètres de mesure biologiques
MPO (1989)	passer le contenu du bocal au tamis à mailles de 275 µm; trier, compter et peser les survivants	% moyen de survie, poids humide moyen
USFWS (1990)	tamiser le sédiment par voie humide; conserver les sujets dans une solution de sucre et de formol pour les mesures ultérieures de la longueur ^a	% de survie, longueur du corps (mm)
ASTM (1991)	au moyen d'une pipette, prélever les animaux survivants présents dans la colonne d'eau; passer le sédiment au tamis à mailles de 500 µm; compter les sujets vivants et morts; mesurer leur longueur ^b	% moyen de survie, longueur moyenne du corps, poids moyen, maturation
USEPA (1991a)	passer le contenu du bécher au tamis à mailles de 500 µm; rincer les animaux arrêtés par le tamis; compter les sujets vivants et morts; mesurer le poids sec moyen ^b	% moyen de survie, poids sec moyen
USEPA (1991c)	n.i.	% moyen de survie, poids sec moyen
MPO (1992)	passer le contenu du bocal au tamis à mailles de 275 µm; trier, compter et peser les survivants	% moyen de survie, poids humide moyen
INRE (1992)	passer le contenu du bécher au tamis à mailles de 500 µm; compter et peser les survivants	% moyen de survie, poids sec moyen ^c
USEPA (1992)	n.i. ^d	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	% de survie, croissance staturo-pondérale
USEPA (1994a)	à l'aide d'une pipette, prélever les amphipodes présents dans l'eau ou à la surface du sédiment; passer le sédiment au tamis à mailles de 710 µm ou à travers de nombreux tamis; compter les survivants et mesurer la croissance ^e	% moyen de survie, longueur ou poids ^e

^a On présume que les amphipodes manquants sont morts et se sont décomposés.

^b On peut utiliser des tamis à maille de plus grande taille. On peut conserver les animaux pour les déterminations ultérieures de la longueur ou du poids.

^c Les survivants de chaque bécher sont mis à sécher pendant 24 h à 60 °C, puis on les pèse collectivement.

^d Non indiqué.

^e On peut conserver les survivants dans une solution à 8 % de sucre et de formol en vue d'en mesurer la croissance (c.-à-d. la longueur du corps). Si on détermine le poids sec, grouper les survivants et les faire sécher à 60-90 °C, jusqu'à obtention d'un poids constant, ramener à la température ambiante et peser au centième de milligramme près. La mesure de la croissance est facultative.

E-10. Utilisation d'un sédiment témoin/de référence et exigences relatives à la validité de l'essai

Document	Sédiment témoin ou de référence	Condition de validité de l'essai
MPO (1989)	aucun ^a	n.i. ^b
USFWS (1990)	sédiment témoin fin	n.i.
ASTM (1991)	chaque essai exige un sédiment témoin négatif (non contaminé) ou un sédiment de référence non contaminé ^c	taux moyen de survie : $\geq 80\%$ ^d
USEPA (1991a)	chaque essai exige un sédiment témoin négatif (non contaminé) ou un sédiment de référence non contaminé ^c	taux moyen de survie : $\geq 80\%$ ^d ; taux de survie dans un récipient : $> 70\%$ ^d
USEPA (1991c)	sédiment témoin négatif	n.i.
MPO (1992)	aucun ^{a, e}	n.i.
INRE (1992)	sédiment de référence et sédiment témoin négatifs	taux moyen de survie : $\geq 80\%$ ^d
USEPA (1992)	sédiment témoin négatif	taux moyen de survie : $60-90\%$ ^f
USFWS (1992)	sédiment témoin négatif	taux moyen de survie : $\geq 80\%$ ^d
USEPA (1994a)	sédiment de référence et sédiment témoin négatifs	taux moyen de survie : $\geq 80\%$ ^d

^a Le taux de survie et la croissance des témoins ont été mesurés dans un récipient d'essai où le substrat était de la gaze hydrophile (pas de sédiment).

^b Non indiqué.

^c On devrait prélever un sédiment de référence sur le terrain, dans un endroit non contaminé; il devrait être représentatif du sédiment d'essai par ses caractéristiques (p. ex., granulométrie, teneur en carbone organique total, pH).

^d L'essai est inacceptable si le taux moyen de survie des organismes dans un récipient renfermant le sédiment témoin négatif est de $< 80\%$.

^e On a remplacé toutes les semaines l'eau des récipients témoins (mais non des béciers renfermant du sédiment).

^f 13 laboratoires fixent à 80% le taux de survie dans le milieu témoin pour que l'essai soit valide; 2 labos le fixent à 70% ; 1 labo, à 90% ; 1 labo, à 60% .

Annexe F

Variantes des modes opératoires des essais toxicologiques de référence avec *H. azteca*, décrites dans des documents canadiens et étatsuniens

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, selon le sigle de l'organisme dont ils émanent :

ASTM (1991) : Norme publiée par l'American Society for Testing and Materials, Philadelphie (PA), pour l'exécution d'essais toxicologiques sur un sédiment, avec des invertébrés dulcicoles. Le document a fait l'objet d'une nouvelle publication en 1993 (v. ASTM, 1991a, 1993, dans les références).

USEPA (1991a) : Comprend la version provisoire (avril 1991) des modes opératoires normalisés d'élevage et d'essai utilisés par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (v. USEPA, 1991a, dans les références).

USEPA (1991c) : Présentation sommaire des méthodes d'essai utilisées par l'Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH) (v. Smith et coll., 1991b, dans les références).

MPO (1992) : Modes opératoires normalisés (document inédit) d'élevage et d'essai utilisés par U. Borgmann, Laboratoire des Grands Lacs pour les pêches et les sciences aquatiques, ministère des Pêches et des Océans, Burlington (ON). Ces mêmes modes opératoires sont décrits dans Borgmann et Norwood (1993) (v. MPO, 1992, dans les références).

INRE (1992) : Modes opératoires normalisés (document inédit) d'élevage et d'essai utilisés par K. Day, Institut national de recherche sur les eaux, Direction de la recherche sur les cours d'eau, Centre canadien des eaux intérieures, Environnement Canada, Burlington (ON) (v. INRE, 1992, dans les références).

USEPA (1992a) : Norberg-King (1992), Environmental Research Laboratory, USEPA, Duluth (MN). Résumé des modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés dans 18 laboratoires du Canada et des États-Unis.

USEPA (1992b) : Smith et coll. (1992a), Environmental Monitoring Systems Laboratory, USEPA, Cincinnati (OH).

USFWS (1992) : Ingersoll (1992), Fish and Wildlife Service des États-Unis, Columbia (MO). Énumération des modes opératoires d'élevage et d'essai utilisés dans divers laboratoires.

USEPA (1994a) : Méthodes publiées de mesure de la toxicité et de la bioaccumulation des contaminants de sédiments, chez des invertébrés dulcicoles, par l'USEPA (principaux auteurs : C.G. Ingersoll, G.T. Ankley, G.A. Burton, F.J. Dwyer, T.J. Norberg-King et P.V. Winger) (v. USEPA, 1994a, dans les références).

F-1. Toxique de référence, type et durée de l'essai, fréquence d'emploi

Document ^a	Toxique de référence	Type d'essai	Durée de l'essai	Fréquence d'emploi
ASTM (1991)	aucun	aucun	—	—
USEPA (1991a)	CuSO ₄ , KCl, NaCl, dodécylsulfate de sodium	eau seulement ^b	96 h	≥1 fois par mois ^c
USEPA (1991c)	n.i. ^e	RI ^d , eau seulement	96 h	1 fois par semaine
MPO (1992)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
INRE (1992)	CuSO ₄	conditions statiques, eau seulement	48 h	1 fois par mois ^f
USEPA (1992a)	variable ^g	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1992b)	KCl	RI, sol enrichi ^h	7 jours	n.i.
USFWS (1992)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	NaCl, KCl, Cd, Cu ⁱ	conditions statiques, eau seulement	96 h	1 fois par mois ^j

^a Voir la page précédente pour les références exactes.

^b Les amphipodes sont exposés à une gamme de concentrations du toxique de référence dissous dans l'eau douce; aucun sédiment dans cet essai.

^c Si on le souhaite, on peut exécuter cet essai parallèlement aux essais toxicologiques sur un sédiment.

^d Renouvellement intermittent, avec remplacement quotidien de chaque solution d'essai.

^e Non indiqué.

^f On procède 2 fois par année à des essais de toxicité chronique avec du CuSO₄ et du CdCl₂ comme toxiques de référence.

^g Sur 18 laboratoires, 6 labos utilisaient le cadmium, 1 labo, le chrome, 3 labos, le cuivre, 5 labos, le chlorure de potassium, 1 labo, le chlorure de sodium et 1 labo, le zinc. On peut présumer que les 4 labos restants n'utilisaient pas de toxique de référence.

^h On a enrichi un échantillon de sol artificiel sec avec une série de concentrations du toxique de référence en solution. Chaque concentration, qui représentait l'eau sus-jacente dans le béccher, a été renouvelée quotidiennement au cours de l'essai.

ⁱ On peut utiliser le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, le chlorure de cadmium et le sulfate de cuivre. Il pourrait être irréaliste de mettre à l'essai >1-2 toxiques de référence de façon systématique (c.-à-d. mensuellement).

^j Idéalement, on devrait effectuer des essais avec des toxiques de référence parallèlement aux essais toxicologiques sur un sédiment.

F-2. Âge/taille des sujets, type de récipients, volume de matière d'essai, nombre d'amphipodes par enceinte et nombre de répétitions par traitement

Document	Âge/taille des sujets	Récipient d'essai	Volume de solution	Volume de sédiment	Nombre d'amphipodes par récipient	Nombre de répétitions
USEPA (1991a)	n.i. ^a	n.i.	n.i.	aucun	n.i.	n.i.
USEPA (1991c)	2 ± 1 jour	n.i.	20 mL	aucun	5	4
INRE (1992)	1-10 jours	bécher de 250 mL	200 mL	aucun	15	3-5
USEPA (1992b)	3-7 jours ^b	bécher de 175 mL	100 mL	25 mL	20	4
USEPA (1994a)	7-14 jours	bécher de 250 mL ^c	≥100 mL ^c	aucun	≥10 ^c	≥3 ^c

^a Non indiqué.

^b En prenant des sujets âgés de 7 jours, on accroît la puissance de l'essai parce que la variation diminue.

^c On peut également utiliser des gobelets en plastique de 30 mL, avec 20 mL de matière d'essai et 1 amphipode par gobelet et ≥10 répétitions par gobelet.

F-3. Origine et dureté de l'eau utilisée dans les essais, et variables contrôlées

Document	Origine de l'eau	Dureté de l'eau	Variables contrôlées ^a	Fréquence des contrôles
USEPA (1991a)	n.i. ^b	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1991c)	eau de puits diluée ^c	100 mg/L	n.i.	n.i.
INRE (1992)	eau du robinet déchlorée ^d	n.i.	OD, pH, conduct.	au début et à la fin
USEPA (1992b)	eau de puits diluée ^e	100 mg/L	n.i.	n.i.
USEPA (1994a)	eau d'élevage, de puits, prélevée sur le site à l'étude, de surface, reconstituée ^f	facultative ^f	pH, alc., dur., conduct. temp., OD	au début et à la fin, quotidiennement

^a alc. : alcalinité totale; conduct. : conductivité spécifique; dur. : dureté totale; OD : oxygène dissous; pH : concentration de l'ion hydrogène; temp. : température.

^b Non indiqué.

^c Mélange d'eau de puits et d'eau désionisée.

^d Même origine et même dureté que l'eau d'élevage des amphipodes.

^e Mélange d'eau de puits, d'eau du robinet déchlorée et d'eau désionisée.

^f Une formule est fournie pour la préparation d'une eau reconstituée convenable, d'une dureté de 90-100 mg de CaCO₃/L.

F-4. Température, aération et éclairage au cours des essais avec un toxique de référence

Document	Température de l'eau (°C)	Aération	Photopériode
USEPA (1991a)	n.i. ^a	n.i.	n.i.
USEPA (1991c)	25 ± 1	n.i.	n.i.
INRE (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1992b)	25 ± 1	n.i.	16 h
USEPA (1994a)	23	aucune	16 h, 500-1000 lux, tubes fluorescents à spectre étendu

^a Non indiqué.

F-5. Substrat utilisé dans les essais avec un toxique de référence

Document	Description du substrat	Quantité de substrat
USEPA (1991a)	n.i. ^a	n.i.
USEPA (1991c)	n.i.	n.i.
INRE (1992)	bandes de 2,5 cm × 2,5 cm de tulle de nylon Nitex® de 500 µm, préalablement trempées dans l'eau d'élevage pendant 24 h	1 par béccher
USEPA (1992b)	sol artificiel sec, enrichi avec une série de concentrations du toxique de référence ^b	25 mL par répétition
USEPA (1994a)	tulle de nylon Nitex® (110 mailles au pouce)	n.i.

^a Non indiqué.

^b Chaque concentration, qui représente l'eau sus-jacente et l'eau de porosité, est remplacée quotidiennement.

F-6. Alimentation pendant les essais avec un toxique de référence

Document	Aliments	Quantité par récipient	Fréquence des repas
USEPA (1991a)	n.i. ^a	n.i.	n.i.
USEPA (1991c)	<i>S. capricornutum</i> extrait de feuilles de céréales	0,1 mL d'algues 0,1 mL de céréales	1 fois par jour
INRE (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1992b)	algues et Cerophyll ^{MC}	1 mL	1 fois par jour
USEPA (1994a)	LCT ^b	0,5 mL ^c	aux jours 0 et 2

^a Non indiqué.

^b Levure, Cerophyll^{MC} et nourriture pour truite; 1800 mg/L, préparation de départ.

^c Pour un bécher de 250 mL comptant 10 amphipodes. Utiliser 0,1 mL de LCT si le récipient d'essai est un gobelet de 30 mL renfermant 1 amphipode.

F-7. Paramètres de mesure et conditions de validité des essais avec un toxique de référence

Document	Paramètres biologiques	Paramètres statistiques	Conditions de validité
USEPA (1991a)	n.i. ^a	CE ₅₀ ^b	n.i.
USEPA (1991c)	survie	CL ₅₀ ^c	n.i.
INRE (1992)	taux moyen de survie	CE ₅₀	taux moyen de survie : ≥90 % ^d
USEPA (1992b)	survie ^e	CI ₅₀ ^f , CI ₂₅ ^f , CSEO ^g	n.i.
USEPA (1994a)	survie	CL ₅₀	taux moyen de survie : ≥90 % ^d

^a Non indiqué.

^b Concentration efficace médiane.

^c Concentration létale médiane.

^d Survie des témoins.

^e On a constaté que le poids sec moyen était un paramètre insensible dans les essais avec le KCl.

^f Concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet précisé (ici, inhibition de 50 % ou de 25 %).

^g Concentration sans effet observé.

Annexe G

Systematique generale de *Hyaella azteca* (Saussure, 1858)¹⁰²***Taxinomie et relations phylogénétiques***

Hyaella azteca (Saussure, 1858) fait partie de la famille Hyaellidae, qui appartient à la superfamille Talitroidea de l'ordre des amphipodes (Bulycheva, 1957). La superfamille Talitroidea comprend également les familles Talitridae (puces de mer et orchesties), Dogielinotidae (fouisseurs arénicoles du Pacifique Nord), Najnidae (perceurs d'algues de la même région) et Hyalidae (brouteurs de varech). Quand Bulycheva a révisé la taxinomie des Hyaellidae, cette famille comptait une vingtaine d'espèces décrites, toutes du genre *Hyaella* et toutes endémiques aux eaux douces sud-américaines (la plupart du lac Titicaca), sauf l'espèce nord-américaine *H. azteca*. Bousfield (1979, 1982) a redéfini les Hyaellidae et y a intégré les genres *Parhyaella*, des environnements côtiers antillais, ainsi que *Chiltonia* (Nouvelle-Zélande), *Austrochiltonia* (Australie) et *Afrochiltonia* (Afrique du Sud), des eaux saumâtres et douces des antipodes. Ces trois derniers genres (des chiltoniines) avaient été intégrés dans la famille Ceinidae inquiline et marine par Barnard (1972) ainsi que par Barnard et Barnard (1983). Par suite de la révision de Bousfield (1996), *Hyaella* comprend désormais ~35 espèces décrites (et réparties en quatre genres), presque toutes confinées à l'Amérique du Sud, mais dont 5 sont présentes dans les eaux douces nord-américaines (y compris *H. azteca*). Le genre se serait détaché du genre *Alorchestes*, qui lui ressemble et qui fréquente les eaux côtières du Pacifique, probablement à la fin du Crétacé (à l'époque du Gondwana), lorsque l'Amérique du Sud a commencé à être isolée des autres masses continentales extérieures de l'hémisphère Sud (Bousfield, 1984). *H. azteca* est presque certainement un nouveau venu dans les eaux douces d'Amérique du Nord, dans lesquelles ont pénétré ses ancêtres immédiats (à partir de l'Amérique du Sud) après la fermeture de l'isthme de Panama au cours du Pliocène et du Miocène.

La figure G.1 illustre la conformation de *H. azteca*. L'espèce possède les caractéristiques typiques suivantes des talitroïdes (par opposition aux gammaroïdes) :

- 1) antennule 1 sans flagelle accessoire;
- 2) pièces buccales dont la mandibule possède une forte molaire, mais est dépourvue de palpe, tandis que le palpe de la maxille 1 est vestigial;
- 3) gnathopodes 1 et 2 ordinairement subchéliformes et presque semblables chez les femelles et les immatures, mais très inégaux chez les mâles à maturité (le gnathopode 2 est beaucoup plus gros et puissant);
- 4) uropode 3 pourvu uniquement d'un seul ramus court;
- 5) lobes du telson courts ou fusionnés (à l'apparence de plaque);
- 6) branchies coxales situées sur les péréiopodes 2-6 uniquement (manquant sur le péréiopode 7);
- 7) plaques incubatrices (chez la femelle) larges et bordées de courts poils à extrémité recourbée.

¹⁰² Préparé par E.L. Bousfield, chercheur associé, Royal British Columbia Museum, 675, rue Bellevue, Victoria (BC) V8V 1X4.

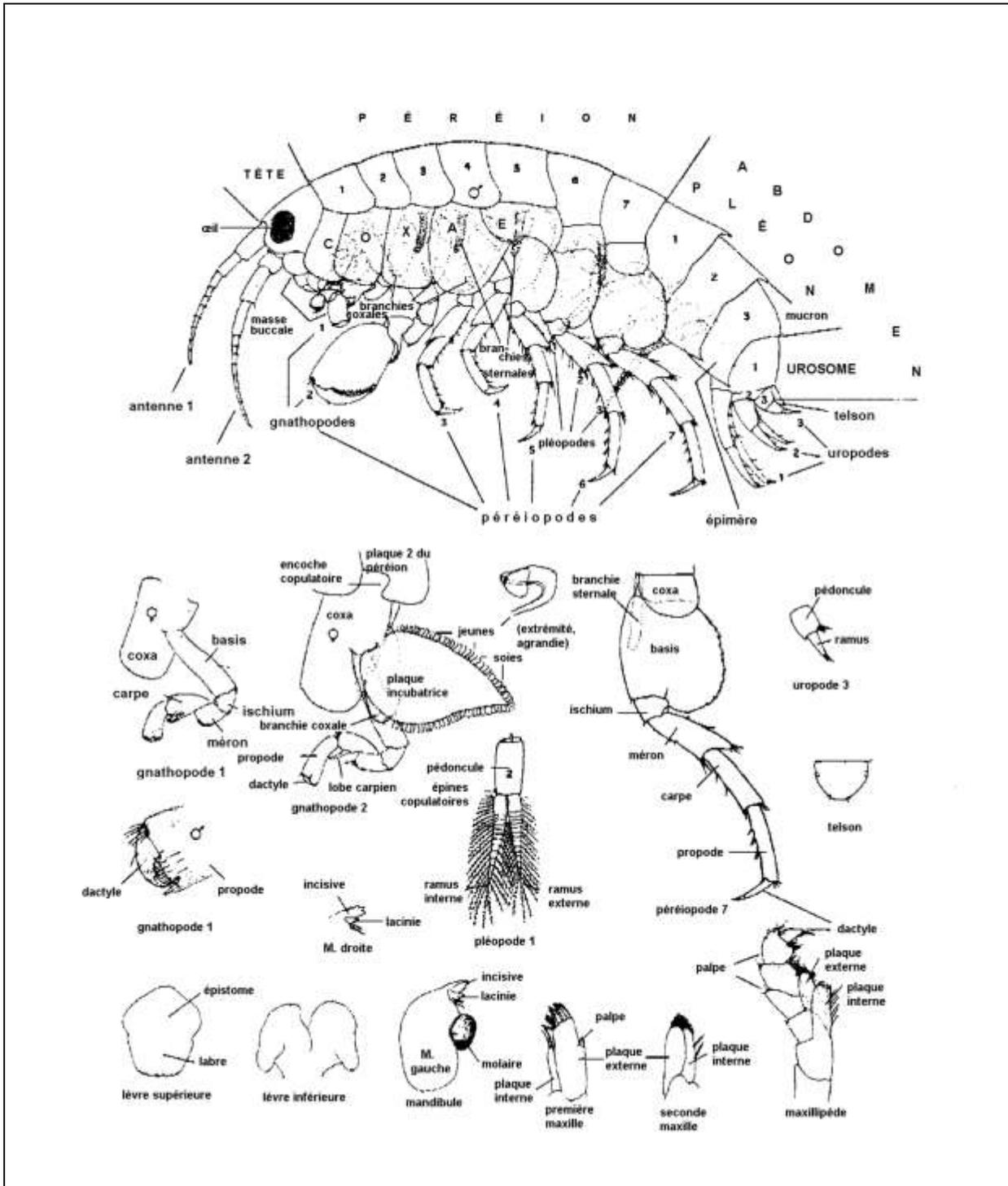


Figure G1. Schéma du corps, des appendices et des pièces buccales de *H. azteca* (actualisé d'après Bousfield, 1973)

Hyalella azteca (Saussure, 1858)

Figure G.1. Diagnose (modifiée d'après Bousfield, 1973)

Longueur du corps : jusqu'à 8 mm chez le mâle; jusqu'à 6 mm chez la femelle. Corps petit, dorsalement mucroné sur les segments pléonaux 1 et 2, parfois sur le 3, ou lisse (forme *inermis*). Plaques coxales très développées, la quatrième étant la plus grande; marge inférieure légèrement et régulièrement épineuse. Tête : œil subové, noir, légèrement plus gros chez le mâle.

Antenne 1 : segments pédonculaires 1 et 2 subégaux, flagelles 8, 9 et 10 segmentés. Antenne 2 : pédoncule plus ténu, segment 5 plus long que le 4; flagelles 9 et 10 segmentés.

Maxillipède : segment 2 du palpe plus large que long, dépassant la plaque extérieure.

Gnathopode 1 du mâle : propodite court, moins développé que le carpe, s'élargissant vers l'extrémité distale; palme oblique, convexe; de la femelle : propodite étroit, court; palme verticale, convexe. Gnathopode 2 du mâle : propodite très gros, le plus large à l'extrémité distale; marge postérieure légèrement concave; palme convexe, avec grosses dents basses près de la charnière; lobe carpien profond; de la femelle : propodite ténu, allongé, s'élargissant vers l'extrémité distale; palme courte, convexe, verticale.

Péréiopodes 3 et 4 : marge postérieure des segments 5 et 6 possédant 3-5 épines courtes, robustes. Péréiopodes 5, 6 et 7 : base généralement élargie, marge postérieure portant 4-10 sillons peu prononcés; segments 5 et 6 sans épine ou soie sur la marge postérieure. Plaques latérales abdominales (épimères) 2 et 3 : angles postérieurs nettement subquadratiques, non allongés.

Uropodes 1 et 2 : deux épines marginales ténues sur les deux ramus. Uropode 3 : ramus et pédoncule subégaux en longueur, longue épine (il peut y en avoir plus d'une) sur l'apex. Telson : apex arrondi, avec deux épines ténues, distantes l'une de l'autre.

Branchies coxales des péréiopodes 2-6 normales, en forme de sac, la plus petite sur le 6. Branchies sternales en paires à la base des péréiopodes 3, 4, 5 et 7, de forme régulière, non allongée ni fortement courbée.

H. azteca (Saussure) diffère habituellement des autres espèces nord-américaines du genre *Hyalella* par une dent ou mucron postérodorsal unique sur chacun de ses segments 1 et 2 pléonaux (parfois également sur le 3) et par la forme relativement allongée et étroite du propodite et du carpe du gnathopode 2 chez la femelle, notamment.

H. azteca est typique des Hyalellidae, puisqu'il possède les caractéristiques suivantes réunies :

- 1) antenne 1 plus longue que le pédoncule de l'antenne 2;
- 2) palpe du maxillipède possédant un dactyle puissant;
- 3) gnathopode 2 (chez la femelle) régulier (et non en forme de moufle);
- 4) marge inférieure du péréion 2 (chez la femelle) portant une « encoche copulatoire »;
- 5) segments distaux du péréiopode non élargis ni modifiés pour permettre le fouissage;
- 6) pléopodes normaux (non réduits, non modifiés, non vestigiaux);
- 7) telson entier, à l'apparence de plaque;
- 8) branchies coxales régulières, non modifiées;
- 9) branchies sternales se présentant de diverses façons sur la marge coxale intérieure des péréiopodes 3 à 7.

Sur le plan du comportement, les hyalellides semblent incapables de sauter dans l'air, à l'instar de tous les Talitridae et de beaucoup de Hyalidae.

Si on le compare aux autres genres des Hyalellidae, le genre *Hyaella* diffère de *Parhyaella* par ses branchies sternales et la présence d'un palpe sur la maxille 1. Il diffère des trois genres australiens (des chiltoniines, évoquées ci-dessus) par les caractéristiques plésiomorphes suivantes : les mâles possèdent des pléopodes non modifiés au stade de la maturité sexuelle et un lobe carpien postérieur distinct sur le gnathopode 2.

Répartition et écologie

D'après Bousfield (1958, 1973) et de March (1978), on a observé la présence de *H. azteca* en Amérique du Nord depuis le centre du Mexique jusqu'à la limite de croissance des arbres au Canada et en Alaska, vers le nord et, à la grandeur du continent, dans presque toutes les eaux douces permanentes où la température en surface, l'été, est régulièrement d'au moins 10 °C. D'un point de vue écologique, l'espèce préfère les eaux douces quelque peu dures ou alcalines, dont le pH normal est de 6,0-8,0. Toutefois, on l'a régulièrement observée aussi dans les parties amont (soumises à l'action des marées) des estuaires marins, où la salinité pourrait atteindre $\geq 2-3$ ‰, de même que dans certains lacs aux eaux alcalines dont la dureté totale pourrait être de >200 mg/L et où coexistent des artémias (p. ex., dans certains des lacs Quill de la Saskatchewan).

Pour ce qui concerne le substrat et le débit de l'eau, on constate que l'espèce abonde habituellement dans les eaux lenticules ou les étangs où la végétation (particulièrement algale) lui fournit abri et nourriture. Elle est plus rare dans les cours d'eau et les autres milieux lotiques, en particulier lorsque le fond est constitué de sédiments fins de granulométrie uniforme, qui n'offrent ni protection ni nourriture organique.

Les échanges respiratoires gazeux passent surtout par les paires de branchies coxales des péréiopodes 2-6. L'espèce semble mieux tolérer les faibles concentrations d'OD et les fortes concentrations de dioxyde de carbone et de gaz de décomposition que la plupart des autres amphipodes d'eau douce d'Amérique du Nord. Les paires de branchies sternaes (à la base des péréiopodes 3, 4, 5 et 7) joueraient principalement un rôle d'osmorégulation et pourraient faciliter la tolérance à une large gamme d'ions du milieu aquatique et à la fluctuation rapide de leur teneur. Elles serviraient également à la respiration.

Cycle biologique et comportement reproducteur

Le cycle biologique de *H. azteca* est annuel (Cooper, 1965; Strong, 1972; Conlan et Hendrycks, comm. pers.¹⁰³). Au printemps, lorsque la température de l'eau a franchi pour de bon la barre de 10 °C, les femelles ayant hiverné pondent jusqu'à 30 œufs. Après l'éclosion et la libération des juvéniles de la poche à couvée, elles continuent de s'accoupler et de pondre. En raison du réchauffement estival de l'eau, les pontes s'accélèrent, mais le nombre d'œufs a tendance à diminuer. Les juvéniles venant d'éclore traversent 5-6 stades de développement avant d'atteindre la maturité. Les femelles s'étant reproduites au printemps meurent avant le début du deuxième hiver, et les générations de la fin de l'été forment la prochaine population qui hivernera.

Le comportement reproducteur dans les superfamilles d'amphipodes primitifs (nageant librement) est le suivant : les mâles pélagiques se mettent à la recherche de femelles et s'accouplent avec elles librement dans la colonne d'eau. Ce comportement est souvent cyclique. Comme membre de la superfamille Talitroidea, toutefois, *H. azteca* est classé parmi les amphipodes apparentés aux gammares rampants ou benthiques, plus évolués sur le plan de la reproduction (Bousfield, 1992; Bousfield et Staude, 1994). Chez ces groupes, dans un processus connu sous le nom de précopulation, préamplexus ou défense du partenaire (Borowskiy, 1984; Conlan, 1990 et 1991), le mâle se fixe au dos de la femelle, habituellement par ses premiers gnathopodes tactiles et préhensiles. Chez *Hyalella*, le dactyle du premier gnathopode du mâle s'insère dans une encoche copulatoire spéciale (à la marge inférieure de la plaque 2 du péréion; v. figure G.1) sur les deux côtés du corps de la femelle, ce qui libère les deuxièmes gnathopodes, qui sont gros, pour faire tourner la femelle dans une position qui convient à son transport ou pour repousser les autres mâles. Dans cette position de « monte », le mâle et la femelle restent accouplés plusieurs heures ou plusieurs jours, jusqu'à la mue de la femelle. L'accouplement (amplexus, transfert de sperme) suit immédiatement, sur ou dans le substrat, et il prend peu de temps, souvent quelques secondes, après quoi le couple se sépare. Au cours du bref intermède suivant la mue, la femelle est particulièrement vulnérable à la prédation, parfois des mâles d'espèces concurrentes (ou de la même espèce), comme on l'a montré chez certaines espèces de gammaroïdes.

¹⁰³ Musée canadien de la nature, Ottawa (ON).

Annexe H

Préparation du mélange de LCT¹⁰⁴ destiné à *H. azteca*

Préparation de la levure

1. Ajouter 5,0 g de levure sèche, par exemple la levure Fleischmann's^{MC}, à 1 L d'eau désionisée.
2. Agiter sur un agitateur magnétique, brasser vigoureusement à la main ou mélanger mécaniquement au mélangeur, à faible vitesse, jusqu'à ce que la levure soit bien dispersée.
3. Combiner immédiatement (ne pas laisser reposer) la suspension de levure avec des volumes égaux du surnageant des préparations de nourriture pour truite et de Cerophyll^{MC} présentées ci-dessous. Éliminer tout excédent.

Préparation du Cerophyll^{MC} (feuilles séchées de céréales en poudre)

1. Mettre 5,0 g de Cerophyll^{MC} en poudre séché, de feuilles de céréales, de feuilles de luzerne ou de granulés pour lapin¹⁰⁵ dans un mélangeur.
2. Ajouter 1 L d'eau désionisée.
3. Mélanger à haute vitesse pendant 5 min au mélangeur, ou agiter à vitesse moyenne pendant la nuit sur un agitateur magnétique.
4. Si on utilise un mélangeur, mettre ce dernier au réfrigérateur pour la nuit afin de laisser reposer le mélange. Si on utilise un agitateur magnétique, laisser reposer 1 heure. Recueillir le surnageant et le combiner avec des volumes égaux du surnageant des préparations de nourriture pour truite et de levure (v. ci-dessous). Éliminer tout excédent.

¹⁰⁴ Ration mixte constituée de levure, de Cerophyll^{MC} (ou d'un produit de remplacement acceptable) et de nourriture pour truite (ou un aliment de remplacement acceptable). Tiré de USEPA, 1989, 1994a, 2000.

¹⁰⁵ On peut acheter le Cerophyll^{MC} auprès de Ward's Natural Science Establishment Inc., C.P. 92912, Rochester (NY) 14692-9012 (716-359-2502). Parmi les produits de remplacement convenables du Cerophyll^{MC}, on compte les feuilles de céréales séchées en poudre, les feuilles de luzerne et les granulés pour lapin (USEPA, 1994a, 2000). On peut se procurer les feuilles de céréale auprès de Sigma Chemical Company, C.P. 14508, St. Louis (MO) 63178 (800-325-3010). On peut se procurer des feuilles de luzerne en poudre et séchées dans des magasins de produits de santé, et les granulés pour lapin dans les animaleries.

Préparation de nourriture digérée pour truite¹⁰⁶

1. La préparation de nourriture pour truite prend une semaine. Utiliser des granulés de démarrage ou n° 1¹⁰⁷.
2. Ajouter 5,0 g de granulés de nourriture pour truite à 1 L d'eau désionisée (Milli-Q^{MC} ou l'équivalent). Bien mélanger au mélangeur et verser dans une ampoule à décantation de 2 L. Avant l'utilisation, laisser digérer par aération continue à partir du fond du récipient, pendant une semaine, à la température ambiante du laboratoire. Remplacer l'eau perdue par évaporation au cours de la digestion. En raison de l'odeur très désagréable habituellement dégagée pendant la digestion, il faudrait placer le récipient sous une hotte ou dans un autre endroit isolé et aéré.
3. À la fin de la digestion, placer le récipient au réfrigérateur et laisser reposer ≥ 1 h. Passer le surnageant au tamis fin (p. ex., Nitex®, 110 mailles au pouce). Combiner avec des volumes égaux du surnageant des préparations de Cerophyll^{MC} et de levure (v. ci-dessus). On peut utiliser le surnageant à l'état frais ou le garder congelé jusqu'à l'emploi. Éliminer ce qui reste de matières particulaires.

Préparation du mélange de LCT

1. Mélanger à fond des volumes égaux (p. ex., 300 mL) des trois aliments décrits ci-dessus.
2. Transférer des aliquotes du mélange dans de petites bouteilles en plastique à couvercle vissant (50-100 mL).
3. Idéalement, on devrait conserver l'aliment à 4 °C et l'utiliser dans les 2 semaines suivant sa préparation. On peut utiliser immédiatement la préparation fraîche ou la congeler jusqu'à l'utilisation. L'aliment dégelé est conservé au réfrigérateur entre les repas et on doit l'utiliser au plus pendant 1 semaine. Ne pas garder l'aliment congelé >3 mois.
4. Il est conseillé de mesurer, avant l'emploi, le poids sec de solides dans chaque lot de LCT. L'aliment devrait en renfermer 1,7-1,9 g par litre.

¹⁰⁶ Selon l'USEPA (1994a), des flocons d'aliments pour poissons (du commerce), comme le TetraMin®, peuvent remplacer la nourriture pour truite.

¹⁰⁷ Fournisseurs de nourriture pour truite : Zeigler Bros. Inc., C.P. 95, Gardners (PA) 17324 (717-780-9009); Glencoe Mills, 1011 Elliott, Glencoe (MN) 55336 (612-864-3181); Murray Elevators, 118 West 4800 South, Murray (UT) 84107 (800-521-9092).

Annexe I

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques¹⁰⁸

Colonne (nombre de concentrations entre 10,0 et 1,00 ou entre 1,00 et 0,10)¹⁰⁹

1	2	3	4	5	6	7
10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
3,2	4,6	5,6	6,3	6,8	7,2	7,5
1,00	2,2	3,2	4,0	4,6	5,2	5,6
0,32	1,00	1,8	2,5	3,2	3,7	4,2
0,10	0,46	1,00	1,6	2,2	2,7	3,2
	0,22	0,56	1,00	1,5	1,9	2,4
	0,10	0,32	0,63	1,00	1,4	1,8
		0,18	0,40	0,68	1,00	1,3
		0,10	0,25	0,46	0,72	1,00
			0,16	0,32	0,52	0,75
			0,10	0,22	0,37	0,56
				0,15	0,27	0,42
				0,10	0,19	0,32
					0,14	0,24
					0,10	0,18
						0,13
						0,10

¹⁰⁸ Modifié d'après Rocchini et coll. (1982).

¹⁰⁹ Dans une colonne, on peut choisir une série de concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage massique (p. ex., mg/kg) ou volumique (p. ex., mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par n'importe quelle puissance de 10. La colonne n° 2, avec ses deux ordres de grandeur, pourrait être utilisée si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. Il n'est pas recommandé d'utiliser des concentrations plus largement espacées, car elles ne permettraient pas de définir avec précision les limites de confiance entourant toute valeur à effet de seuil calculée. Pour les essais sur un effluent, on gagne rarement en précision en choisissant des concentrations dans les colonnes à droite des colonnes 3 ou 4; les valeurs plus rapprochées des colonnes 4 à 7 peuvent parfois être utiles pour les essais sur des substances chimiques dont l'effet de seuil est abrupt.

www.ec.gc.ca

Pour des renseignements supplémentaires :

Environnement Canada

Infomathèque

10, rue Wellington, 23^e étage

Gatineau (Québec) K1A 0H3

Téléphone : 1-800-668-6767 (au Canada seulement) ou 819-997-2800

Télécopieur : 819-994-1412

ATS : 819-994-0736

Courriel : enviroinfo@ec.gc.ca