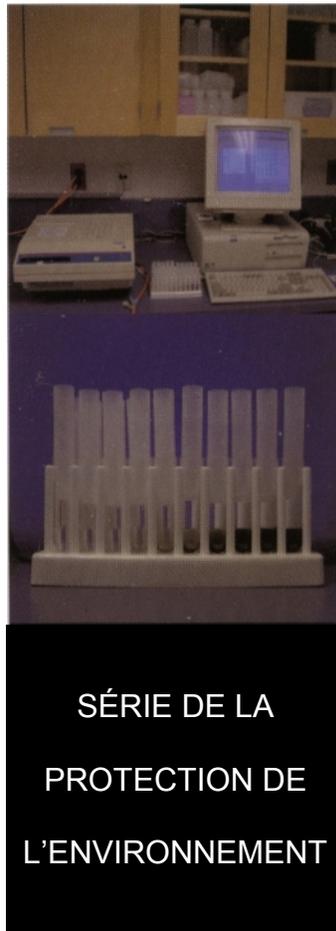


SPE 1/RM/42 — avril 2002

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Direction générale de l'avancement des technologies
environnementales
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada



Méthode d'essai biologique : méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide



Environnement
Canada

Environment
Canada

Canada

Méthode d'essai biologique : méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/42
Avril 2002

Données de catalogage avant publication de la Bibliothèque nationale du Canada

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique. Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide.

(Rapport d'information SPE 1/RM/42)

Publié aussi en anglais sous le titre : Biological test method. Reference method for determining the toxicity of sediment using luminescent bacteria in a solid-phase test.

Publié aussi sur Internet.

Comprend des références bibliographiques.

ISBN 0-660-96753-7

N° de cat. En49-24/1-54F

1. *Vibrio fischeri* -- Essais.
2. Organiques aquatiques -- Effet de la pollution de l'eau sur les -- Essais -- Méthodologie -- Normes -- Canada.
3. Effluents -- Qualité -- Essais -- Méthodologie -- Normes -- Canada.
4. Toxicité -- Essais -- Méthodologie -- Normes -- Canada.
- I. Centre de technologie environnementale (Canada). Section de l'élaboration et de l'application des méthodes.
- II. Canada. Environnement Canada.
- III. Coll. : Rapport d'information (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/42.

QR82.Z9B56 2002

579.34

C2002-980219-9

Commentaires

Adressez les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins
Section de l'élaboration et de l'application des méthodes
Centre de technologie environnementale
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English under the title *Biological Test Method : Reference Method for Determining the Toxicity of Sediment Using Luminescent Bacteria in a Solid-Phase Test* from:

Environmental Protection Publications
Environment Canada
Ottawa, Ontario
K1A 0H3

Avis de révision

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'une appellation commerciale ou d'un produit offert sur le marché ne constitue ni une approbation du produit par Environnement Canada ni une recommandation de son emploi. D'autres produits de valeur semblable existent.

Résumé

*Le présent rapport décrit une méthode de référence pour la détermination de la toxicité d'échantillons de sédiment entier dans des conditions maîtrisées et définies de laboratoire. La méthode utilise une bactérie luminescente (*Vibrio fischeri*), l'effet biologique mesuré étant l'inhibition de la production lumineuse de la bactérie en phase solide. Pour réaliser l'essai, il faut préparer une série de dilutions de l'échantillon, mélanger les prises d'essai avec un inoculum de *V. fischeri* et faire incuber le tout 20 minutes, en tubes à essai gardés dans un bain d'eau à $15 \pm 0,5$ °C, filtrer le contenu de chaque tube, stabiliser les filtrats à $15 \pm 0,5$ °C pendant 10 minutes dans une série de cuvettes de verre insérées dans les puits d'un photomètre, lire ensuite la bioluminescence subsistant dans les filtrats. Le paramètre statistique de l'essai est la concentration d'échantillon que l'on estime inhiber la luminescence bactérienne de 50% (c'est-à-dire la CI50).*

*S'inspirant de la méthode générique (polyvalente) intitulée Méthode d'essai biologique : essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum*, publiée par Environnement Canada (1992, SPE 1/RM/24), la méthode de référence est destinée à être utilisée sur les échantillons de sédiments effectivement ou potentiellement contaminés.*

La méthode préconise des conditions et des modes opératoires particuliers, notamment : des directives sur l'obtention, l'expédition, la conservation et l'entreposage des organismes d'essai (réactif bactérien) ; des conditions et des modes opératoires acceptables pour le transport, l'entreposage et la manipulation des échantillons de sédiments à utiliser ; les analyses physicochimiques requises du sédiment ; les modes opératoires et les conditions à respecter dans la préparation et la conduite de l'essai ; les critères d'acceptabilité de l'essai et de validité de ses résultats ; les mesures et les observations à faire ; les analyses exigées ou recommandées des données ; des orientations sur l'interprétation des résultats ; les exigences minimales sur les rapports à produire. La méthode renferme aussi des instructions sur l'emploi d'essais de toxicité de référence.

Abstract

*A reference method for measuring the toxicity of samples of whole sediment under controlled and defined laboratory conditions is described in this report. It uses luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) as the test organism and inhibition of light production by the bacteria in a solid-phase test as the biological endpoint. The test involves the preparation of a series of concentrations of the sample by serial dilution in water, their mixing with an inoculum of test organisms (*V. fischeri*) and incubation for 20 minutes in test tubes held in a water bath at 15 ± 0.5 °C, the filtration of the contents of each test tube, the subsequent stabilization of the filtrate at 15 ± 0.5 °C for 10 minutes in a series of glass cuvettes held within wells of a photometer, and thereafter the photometric reading of light produced by the luminescent bacteria remaining in the filtrate. The statistical endpoint of the test is the concentration of sample which is estimated to cause 50% inhibition of light production by the bacteria (i.e., the IC50).*

*This reference method follows and is built upon the generic (multipurpose) biological test method “Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (*Photobacterium phosphoreum*)” published previously by Environment Canada (1992; EPS 1/RM/24). It is intended for use with samples of contaminated or potentially contaminated sediment.*

Specific conditions and procedures are stipulated that include instructions on obtaining, shipping, holding, and storing test organisms (Bacterial Reagent); acceptable procedures and conditions for transporting, storing, and manipulating samples of sediment to be used in the test; required physicochemical analyses of sediment; procedures and conditions to be followed in preparing for and conducting the test; criteria for acceptable performance and valid test results; measurements and observations to be made; required or recommended data analyses; guidance for interpreting test results; and minimum reporting requirements. Instructions on the use of reference toxicity tests are also provided.

Avant-propos

*Voici l'un des titres de la collection des **méthodes de référence**, pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets toxiques exercés sur une espèce aquatique ou terrestre exposée à des échantillons de matières ou de substances dans les conditions maîtrisées et définies du laboratoire.*

*Par **méthode de référence**, on entend une méthode biologique particulière d'essai de la toxicité, c'est-à-dire une méthode écrite comportant un ensemble explicite de directives et de conditions expérimentales décrites avec précision. Contrairement aux méthodes d'essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement Canada, la **méthode de référence** est souvent limitée, dans son emploi, aux essais exigés par certains règlements (p. ex. le Règlement sur l'immersion de déchets en mer, sous le régime de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement de 1999 ; LCPE, 1999 ; gouvernement du Canada, 2001).*

*Les **méthodes de référence** sont celles qui ont été élaborées et publiées par Environnement Canada et qui sont préférées dans les cas suivants :*

- pour un emploi à des fins réglementaires, dans les laboratoires d'écotoxicologie des organismes fédéraux et provinciaux ;*
- pour les essais à des fins réglementaires impartis par Environnement Canada ou demandés par des organismes de l'extérieur ou l'industrie ;*
- pour la surveillance réglementaire, dans le cadre d'un règlement ou d'un permis fédéral, provincial ou municipal dans le domaine de l'environnement ;*
- comme base de l'énoncé de directives très explicites.*

*Dans l'annexe A, on trouve une liste des **méthodes de référence** préparées pour publication par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada, à Ottawa, de méthodes génériques (aux applications plus larges) d'essai biologique et de guides à l'appui.*

Les termes définis sous la rubrique « Terminologie » se détachent en italiques, dans le corps du document, quand ils sont employés conformément à leur définition. Les italiques feront aussi ressortir d'autres termes.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Avant-propos	vii
Liste des tableaux	xii
Abréviations et formules chimiques	xiii
Terminologie	xiv
Remerciements	xxii
 <i>Section 1</i>	
Introduction	1
 <i>Section 2</i>	
Organismes d'essai	3
2.1 Espèce	3
2.2 Source et entretien	3
 <i>Section 3</i>	
Installations, équipement et fournitures	4
3.1 Installations	4
3.2 Appareillage	4
3.2.1 Nettoyage	4
3.2.2 Grandes lignes de l'essai et appareillage connexe	4
3.2.3 Équipement	4
3.2.4 Fournitures	5
 <i>Section 4</i>	
Essai du sédiment	7
4.1 Prélèvement de l'échantillon	7
4.2 Étiquetage, transport et entreposage des échantillons	8
4.3 Manipulation et caractérisation des échantillons	9
4.4 Sédiments témoins négatif et positif	11
4.5 Conditions d'essai	12
4.5.1 Grandes lignes de l'essai	12
4.5.2 Manipulations, réglages et corrections	12
4.5.3 Température	13
4.5.4 Durée des manipulations	13
4.5.5 Tableau des dilutions	15
4.6 Modes opératoires	15
4.6.1 Photomètre, bain d'eau et fiche de laboratoire	15
4.6.2 Sous-échantillons pour la détermination de l'humidité	16
4.6.3 Solution mère	16
4.6.4 Solutions filles	16

4.6.5	Reconstitution du réactif bactérien	17
4.6.6	Inoculation et incubation	17
4.6.7	Préparation de l'ordinateur	18
4.6.8	Filtration	18
4.7	Mesures et observations	19
4.8	Critère de validité de l'essai	19

Section 5

Essai d'un toxique de référence	20
--	-----------

Section 6

Analyse et interprétation des données	22
6.1 Analyse des données	22
6.2 Interprétation des résultats	24

Section 7

Renseignements à fournir dans les rapports	28
7.1 Exigences minimales pour le procès-verbal de l'essai	29
7.1.1 Matériel d'essai	29
7.1.2 Organismes d'essai	29
7.1.3 Installations et appareillage d'essai	29
7.1.4 Solution de reconstitution et « diluant en phase solide »	29
7.1.5 Méthode d'essai	29
7.1.6 Conditions de l'essai et modes opératoires	29
7.1.7 Résultats des essais	30
7.2 Rubriques supplémentaires à communiquer	30
7.2.1 Matériel d'essai	30
7.2.2 Organismes d'essai	30
7.2.3 Installations d'essai et appareillage	30
7.2.4 Solution de reconstitution et « diluant en phase solide »	31
7.2.5 Méthode d'essai	31
7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires	31
7.2.7 Résultats de l'essai	31

Références	32
-------------------------	-----------

Annexe A

Méthodes d'essai biologique et guides à l'appui publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada ..	36
---	-----------

Annexe B

Composition du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (avril 2002)	38
--	-----------

Annexe C

**Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux
d'Environnement Canada** 40

Annexe D

Membres du Groupe consultatif scientifique 41

Annexe E

**Variantes du mode opératoire des essais de toxicité de sédiments en phase
solide employant des bactéries luminescentes et décrites dans les méthodes
canadiennes, états-uniennes et néerlandaises** 43

Annexe F

**Fiche de laboratoire employée pour les essais de toxicité des sédiments
employant *V. fischeri*** 61

Liste des tableaux

1	Liste de contrôle des conditions expérimentales exigées ou recommandées	14
---	--	----

Abréviations et formules chimiques

CI50	concentration inhibitrice à 50%
CI _p	concentration inhibitrice, au pourcentage <i>p</i> (précisé) d'effet
CL50	concentration létale médiane
cm	centimètre
CNRC	Conseil national de recherches du Canada
CV	coefficient de variation
EC	Environnement Canada
EPS	essai en phase solide
g	gramme
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
HNO ₃	acide nitrique
L	litre
m/v	masse par volume
MD	marque déposée
mg	milligramme
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
MON	mode opératoire normalisé
NaCl	chlorure de sodium
NaNO ₃	nitrate de sodium
nm	nanomètre
°C	degré Celsius
<i>p</i>	probabilité
TFE	tétrafluoroéthylène
USEPA	Agence de protection de l'environnement des États-Unis
v.	voir
v/v	volume/volume, en volume
μL	microlitre
μm	micromètre
σ	écart-type
≤	inférieur (ou égal)
±	plus ou moins
%	pourcentage, pour cent
<	strictement inférieur
>	strictement supérieur
≥	supérieur (ou égal)

Terminologie

Les mots et expressions définis ci-dessous se détachent en italiques, dans le corps du document, quand ils sont employés conformément à leur définition. Les italiques feront aussi ressortir d'autres termes.

Nota : Toutes les définitions ci-dessous s'inscrivent dans le contexte de la méthode ; 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 dans la mesure du possible la condition ou le mode opératoire.

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

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

Vocabulaire technique général

conformité, respect des exigences officielles des règlements ou des permis.

eau estuarienne, eau de la zone côtière de l'océan, sensiblement diluée par les eaux douces fluviales.

eau marine, eau provenant de l'océan, de la mer ou d'une zone côtière où elle n'a pas subi de dilution appréciable par les eaux douces naturelles apportées par les cours d'eau.

fin, se dit d'un sédiment ou de particules dont la taille mesure au plus 0,063 mm. La détermination du pourcentage de particules fines englobe toutes celles que l'on définit sous l'appellation de *limons* (c'est-à-dire de 0,004 à 0,063 mm) ou d'*argiles* (c'est-à-dire de moins de 0,004 mm). Ces fractions portent aussi le nom de *fines*.

fines, V. FIN.

méthode de référence, protocole particulier d'un essai de toxicité, c'est-à-dire méthode écrite d'essai biologique assortie d'un ensemble explicite de conditions et de modes opératoires, officiellement convenu par les parties et décrit avec précision. Contrairement aux autres méthodes biologiques polyvalentes (génériques) publiées par Environnement Canada, la *méthode de référence* est souvent limitée, dans son emploi, aux essais exigés par certains règlements (p. ex., Gouvernement du Canada en 2001).

pH, logarithme négatif de l'activité des ions hydrogène, mesurée par leur concentration en équivalents-grammes par litre. Cette valeur exprime le degré ou l'intensité des réactions acide et alcaline sur une échelle de 0 à 14, où 7 représente la neutralité. Les pH inférieurs à 7 correspondent, en ordre décroissant, à des réactions de plus en plus acides, tandis que les pH supérieurs à 7 indiquent, en ordre croissant, des réactions de plus en plus basiques ou alcalines.

salinité, quantité totale de substance solide, en grammes, dissoute dans un litre d'eau (de mer) ; exprimée traditionnellement en parties pour mille (‰). On la détermine après conversion de tous les carbonates en oxydes, remplacement de tous les bromures et iodures par des chlorures et oxydation de toute la matière organique. On peut aussi la mesurer directement à l'aide d'un salinomètre-conductimètre ou par d'autres moyens (v. APHA *et al.*, 1995).

surveillance, vérification régulière (p. ex. quotidienne, hebdomadaire, mensuelle ou trimestrielle) de la qualité, de la collecte et de la diffusion de l'information. S'applique soit à la vérification et à la mesure périodique (régulière) de certaines variables biologiques ou de la qualité de l'eau ou, encore, à la collecte et à l'essai de toxicité d'échantillons de sédiments.

Vocabulaire relatif aux matières ou substances d'essai

diluant, solution de chlorure de sodium à 3,5 % dans l'eau *distillée* ou *désionisée*, préparée à partir de sel de qualité réactif. Il peut être utilisé avec des échantillons de sédiment marin, estuarien ou d'eau douce. Voir aussi EAU DISTILLÉE et EAU DÉSIONISÉE.

eau de porosité, eau occupant les interstices entre les particules de sédiment. Syn. EAU INTERSTITIELLE.

eau désionisée, eau débarrassée des ions Ca^{++} et Mg^{++} , etc., par passage sur colonnes de résine ou par osmose inverse.

eau distillée, eau purifiée par la distillation dans un appareil en verre borosilicaté ou d'un autre matériau.

emplacement, étendue délimitée de sédiment utilisée ou envisagée pour servir de zone d'étude, habituellement parce qu'elle est contaminée ou susceptible d'être contaminée par l'activité humaine.

essai de toxicité de référence, essai employant, dans le cadre d'un essai de toxicité d'un sédiment, un *toxique de référence* afin d'évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'évaluation de la substance d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire. Les résultats s'écartant d'un intervalle normal établi signifient que la sensibilité des organismes ainsi que la réalisation et la précision de l'essai sont douteuses. Pour les besoins de la présente *méthode de référence*, on devrait employer, pour l'essai de référence, un *sédiment témoin positif*, qui peut être soit un sous-échantillon de la matière de

référence renfermant du *sédiment contaminé étalon* dans lequel les concentrations de contaminants sont connues (comme le sédiment du Conseil national de recherches du Canada) soit un *sédiment témoin enrichi*. V. aussi TOXIQUE DE RÉFÉRENCE, SÉDIMENT TÉMOIN POSITIF, SÉDIMENT CONTAMINÉ ÉTALON et SÉDIMENT TÉMOIN ENRICHÉ.

essai de toxicité en milieu exclusivement aqueux, essai dont on exclut tout sédiment ou toute autre matière solide (en employant, par exemple, la solution aqueuse d'un *toxique de référence*). Synonyme : *essai de toxicité en phase liquide*. Cet essai sert à confirmer que la *solution de reconstitution* ne diminue pas la bioluminescence de *Vibrio fischeri* (v. § 3.2.4). V. aussi ESSAI DE TOXICITÉ EN PHASE LIQUIDE et ESSAI DE TOXICITÉ EN PHASE SOLIDE.

essai de toxicité en phase liquide, essai se déroulant exclusivement en solution aqueuse, en l'absence de toute particule de sédiment ajoutée. Voir aussi ESSAI DE TOXICITÉ EN PHASE SOLIDE.

essai de toxicité en phase solide, essai d'une série de concentrations de sédiment entier (c'est-à-dire les particules, plus l'eau de porosité, ajoutées en un mélange homogène) préparées au moyen d'une partie aliquote de ce sédiment. Voir aussi ESSAI DE TOXICITÉ EN PHASE LIQUIDE.

matière, substance ou substances dont est faite une chose. Ses caractéristiques peuvent être hétérogènes, même après mélange. Un sol, un sédiment ou une eau de surface sont des matières. Habituellement, la *matière* renferme un nombre plus ou moins grand de substances. Voir aussi SUBSTANCE.

produit, préparation du commerce renfermant au moins une substance. V. aussi PRODUIT CHIMIQUE.

produit chimique, tout élément, composé, formule ou mélange de substances chimiques qui pourrait se trouver associé à des sédiments ou à de l'eau, y être mélangé ou y être déposé.

réactif bactérien, culture normalisée d'une souche particulière de *Vibrio fischeri*, lyophilisée, conservée dans de petits flacons scellés, renfermant chacun 100 millions d'organismes.

sédiment, matériau naturel formé de particules ayant été transportées dans l'eau puis s'étant déposées sur le fond. Peut également désigner un substrat artificiel, constitué de matières particulières choisies (p. ex. un sable d'une granulométrie donnée, de la bentonite [argile], etc.).

sédiment artificiel, sédiment synthétique, préparé au laboratoire, selon une formule précise d'argiles, de limons et/ou de sables, pour simuler un sédiment naturel. Au laboratoire, on mélange des quantités convenables d'argiles, de limons ou de sables *non contaminés* aux pourcentages voulus de matières fines et grossières, afin d'obtenir un *sédiment témoin négatif artificiel (non pollué)*. On mélange une formule précise d'argiles, de limons et/ou de sables avec un toxique (ou, dans certains cas, avec un échantillon contaminé, fortement toxique, de sédiment prélevé sur le terrain), opération portant le nom d'enrichissement, pour obtenir une

ou plusieurs concentrations de *sédiment témoin positif artificiel*. Voir aussi SÉDIMENT NON POLLUÉ, SÉDIMENT TÉMOIN NÉGATIF, SÉDIMENT TÉMOIN POSITIF.

sédiment de référence, échantillon, prélevé sur le terrain, d'un sédiment que l'on estime non contaminé, choisi pour ses propriétés (p. ex. granulométrie, compacité, teneur en matière organique totale), qui correspondent étroitement à celles du ou des échantillons du sédiment d'essai, sauf à la teneur en contaminants chimiques. On le prélève souvent dans un endroit à l'abri ou le plus à l'abri possible de la contamination d'origine anthropique, mais généralement à proximité des endroits où on prélève le sédiment d'essai. Un échantillon du *sédiment de référence* devrait faire partie de chaque série d'essais de toxicité d'un ou de plusieurs *sédiments d'essai*. Ce sédiment de référence pourrait (ou pourrait ne pas) se révéler toxique en raison de la présence (ou de l'absence) de substances naturelles telles que le sulfure d'hydrogène ou l'ammoniaque, ou en raison de la présence inattendue (ou de l'absence) de concentrations nocives de contaminants anthropiques. Il faudrait éviter l'emploi de ce sédiment (s'il se révèle toxique) comme *sédiment de référence* dans les essais ultérieurs de toxicité, à moins que le plan d'expérience n'en tienne compte et que le ou les chercheurs ne veuillent comparer les résultats obtenus avec cette matière à ceux d'un ou de plusieurs échantillons de sédiment d'essai. V. aussi SÉDIMENT NON CONTAMINÉ et SÉDIMENT D'ESSAI.

sédiment contaminé, sédiment renfermant des concentrations de substances posant une menace connue ou potentielle pour l'environnement ou la santé humaine.

sédiment contaminé étalon, sédiment prélevé sur le terrain, dont le titre en contaminants est connu, consigné et accessible (p. ex. au Conseil national de recherches du Canada), s'étant en outre révélé toxique pour *Vibrio fischeri*, selon la *méthode de référence* décrite dans le présent document.

sédiment d'essai, échantillon de sédiment entier, prélevé sur le terrain, dans un emplacement marin, estuarien ou en eau douce, que l'on croit contaminé (ou pouvant être contaminé) par au moins un produit chimique et destiné à être employé dans l'*essai de toxicité en phase solide* avec des bactéries luminescentes. Dans certains cas, la notion s'applique à tout échantillon solide (notamment le *sédiment de référence*, le *sédiment artificiel*, le *sédiment témoin négatif*, le *sédiment témoin positif* ou les déblais de dragage) utilisé dans l'essai. V. aussi ESSAI DE TOXICITÉ EN PHASE SOLIDE, SÉDIMENT DE RÉFÉRENCE, SÉDIMENT ARTIFICIEL, SÉDIMENT TÉMOIN NÉGATIF, SÉDIMENT TÉMOIN POSITIF.

sédiment non contaminé, sédiment ne renfermant aucune concentration de contaminant(s) qui atténuerait la bioluminescence émanant de *Vibrio fischeri* durant l'essai.

sédiment témoin enrichi, sédiment artificiel non contaminé ou sédiment de référence non contaminé, prélevé sur le terrain, auquel, pour les besoins de l'expérience, on a ajouté une substance ou une matière d'essai, par exemple un produit chimique, un mélange de produits chimiques, de la boue de forage, des déblais contaminés, de la boue ou du *sédiment contaminé*, après quoi on a mélangé le tout à fond afin de l'homogénéiser. V. aussi SÉDIMENT NON CONTAMINÉ, SÉDIMENT ARTIFICIEL, SÉDIMENT DE RÉFÉRENCE, SÉDIMENT CONTAMINÉ et SÉDIMENT TÉMOIN POSITIF.

sédiment témoin négatif, sédiment ne renfermant aucun contaminant en concentration susceptible de modifier le comportement (en l'occurrence la bioluminescence) des organismes soumis à l'essai. Ce peut-être un sédiment naturel prélevé sur le terrain, dans un endroit non contaminé, ou un *sédiment artificiel*. Il ne doit être additionné d'aucune matière ou substance d'essai et doit assurer une bioluminescence acceptable par *Vibrio fischeri*, conformément aux conditions et aux modes opératoires de l'essai. Il permet de juger de la toxicité d'un sédiment grossier (< 20% de fines). Voir aussi SÉDIMENT TÉMOIN ARTIFICIEL et SÉDIMENT NON CONTAMINÉ.

sédiment témoin positif, sédiment que l'on sait contaminé par au moins un toxique et qui provoque une réaction toxique prévisible (en l'occurrence l'inhibition de la bioluminescence) chez l'organisme en expérience, conformément aux modes opératoires et aux conditions de l'essai. Ce sédiment pourrait être soit un *sédiment contaminé étalon*, soit *sédiment artificiel* ou un *sédiment de référence* additionné de toxique, pour les besoins de l'expérience. Ce pourrait être aussi un échantillon fortement contaminé de sédiment prélevé sur le terrain, qui se serait déjà révélé toxique pour *Vibrio fischeri* et dont on connaîtrait les caractéristiques physicochimiques. Ce sédiment aide à interpréter les résultats des essais de toxicité des sédiments. Pour les besoins de la présente *méthode de référence*, on doit l'utiliser comme *toxique de référence* lorsque l'on évalue la sensibilité de l'organisme d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats qu'obtient le laboratoire avec cette matière. V. aussi SÉDIMENT CONTAMINÉ ÉTALON, SÉDIMENT ARTIFICIEL, SÉDIMENT DE RÉFÉRENCE et TOXIQUE DE RÉFÉRENCE.

sol, matière entière et intacte, manipulée le moins possible après le prélèvement, représentative du milieu terrestre. Le sol provient de la désagrégation physicochimique des roches et du dépôt d'une litière de feuilles et/ou de la décomposition et du recyclage des nutriments provenant de la vie végétale et animale. Ses caractéristiques physicochimiques dépendent de l'activité des microbes et des invertébrés qui y vivent ainsi que de l'activité humaine.

solution de reconstitution, eau distillée ou désionisée non toxique, utilisée pour activer un flacon de *réactif bactérien*.

station d'échantillonnage, point précis, dans un emplacement ou une unité d'échantillonnage (selon le plan de l'étude) située sur le terrain, où, on prélève le ou les échantillons de sédiment destinés aux essais de toxicité et aux analyses physicochimiques connexes. Voir aussi EMPLACEMENT.

substance, type particulier de matière, aux propriétés plus ou moins uniformes. La notion englobe toutes les sortes de matières organiques ou inorganiques, qu'elles soient animées ou inanimées, que l'on peut distinguer.

témoin, dans une enquête ou une étude, variante expérimentale répétant toutes les conditions et facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf sur la condition particulière faisant l'objet de l'étude. Dans un essai de toxicité en milieu aquatique, le témoin doit répéter toutes les conditions d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de matière ou de substance d'essai ajoutée. Il sert à déterminer l'absence de toxicité mesurable, attribuable aux conditions de

base de l'essai (p. ex. température, santé des organismes, effets de leur manipulation ou de leur manutention).

toxique de référence, étalon constitué d'un *sédiment témoin positif* et servant mesurer la sensibilité de l'organisme d'essai afin d'établir le degré de confiance dans les résultats des essais de toxicité employant une substance ou une matière d'essai. Dans la plupart des cas, l'essai de toxicité employant un *toxique de référence* sert à évaluer la sensibilité des organismes au moment de l'évaluation de la substance ou de la matière d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire à l'égard de ce toxique.

V. aussi SÉDIMENT TÉMOIN POSITIF.

Terminologie statistique et toxicologique

aigu, qui se manifeste sur une courte période (de l'ordre de quelques minutes, dans le cas des bactéries) relativement à la durée de vie de l'organisme en expérience.

batterie d'essais, combinaison de plusieurs essais de toxicité, normalement sur différents organismes (*Vibrio fischeri*, un ou plusieurs amphipodes marins ou estuariens, un ver polychète).

carte de contrôle, graphique permettant de suivre l'évolution de l'effet exercé par un toxique de référence. On reporte, pour la date de l'essai se trouvant sur l'axe horizontal, la concentration à laquelle l'effet est observé, cette concentration se trouvant sur une échelle logarithmique verticale.

coefficient de variation (CV), quotient de l'écart-type (σ) des mesures obtenues sur un échantillon à la moyenne (\bar{x}), exprimé en pourcentage : $CV (\%) = 100 \sigma \div \bar{x}$.

concentration inhibitrice (CI_p), concentration correspondant à un pourcentage (désignée par *p*) d'effet. C'est une estimation ponctuelle de la concentration de la substance ou de la matière d'essai qui inhibe, selon le pourcentage précisé, un paramètre biologique quantitatif tel que la bioluminescence des bactéries ou la croissance du poisson, par rapport à la même fonction chez le témoin. Par exemple, une CI₅₀ pourrait être la concentration que l'on estime réduire de moitié la bioluminescence des organismes à la fin de l'essai par rapport à la bioluminescence des témoins. L'expression vaut pour tout essai de toxicité mesurant un effet variable continu tel que la bioluminescence, la reproduction, la respiration ou la masse sèche à la fin de l'essai.

échantillon subdivisé, échantillon de matière donnée après sa répartition en sous-échantillons en vue d'essais multiples (en double ou plus) de la toxicité selon des modes opératoires et dans des conditions identiques (c'est-à-dire *répétitions de laboratoire*).

échantillons réitérés, échantillons de sédiment prélevé dans la même station d'échantillonnage, afin d'estimer l'erreur d'échantillonnage ou d'améliorer la précision de l'estimation. Un échantillon unique prélevé dans une station est considéré comme une *répétition*. Les

échantillons supplémentaires sont considérés comme des *échantillons réitérés* lorsqu'ils sont soumis à un traitement identique, mais en étant gardés dans des récipients séparés (c'est-à-dire qu'ils ne forment pas d'échantillons composites).

échantillonnage réitéré, prélèvement de plus d'un échantillon de matière d'essai au même moment dans un endroit et à une profondeur donnés.

effet mesuré, valeur(s) ou mesure(s) caractérisant les résultats de l'essai (p. ex. la Clp). Peut aussi s'entendre de la réaction de l'organisme en expérience montrant l'effet mesuré à la fin de l'essai (p. ex. inhibition de la bioluminescence).

essai de toxicité, détermination de l'effet d'une matière ou d'une substance sur l'organisme en expérience (p. ex. *Vibrio fischeri*) dans des conditions définies. L'essai de toxicité en milieu aquatique mesure habituellement soit : a) la proportion d'organismes touchés (*essai quantique*) ; b) le degré d'effet observé (*essai quantitatif* ou *gradué*), après exposition à une matière particulière (p. ex. un échantillon de sédiment) ou un mélange particulier (p. ex. d'une substance chimique et d'un sédiment). L'essai de toxicité en *phase solide* employant des bactéries luminescentes doit être considéré comme *quantitatif* (gradué), parce qu'on n'y mesure pas la proportion de chaque bactérie directement touchée, mais, plutôt, le degré global de réduction d'une fonction physiologique (c'est-à-dire de la bioluminescence) manifesté par des groupes de bactéries.

essai toxicologique, v. ESSAI DE TOXICITÉ.

gamma, mesure de l'extinction lumineuse servant à calculer la Clp. On calcule le gamma de chaque cuvette renfermant un filtrat d'une concentration donnée, d'après le rapport de la bioluminescence d'un filtrat d'essai et à celle de solutions témoins, comme suit : $\Gamma = (I_t/I_e) - 1$, où I_t = valeur moyenne de la bioluminescence des filtrats de solutions *témoins* ; I_e = valeur moyenne de la bioluminescence des filtrats d'une concentration particulière de la matière d'*essai* (§ 6.1). Lorsque $\Gamma = 1$, cela correspond à l'extinction de la moitié de la bioluminescence du fait de la toxicité ou d'autres facteurs de confusion (§ 6.2).

limite de la zone de confiance, limite, calculée logarithmiquement, située à plus ou moins deux écarts-types ($\pm 2 \sigma$), de part et d'autre de la moyenne géométrique de l'effet d'un toxique de référence mesuré par des essais de toxicité.

moyenne géométrique, moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. Son avantage est de faire en sorte que les valeurs extrêmes n'influent pas sur sa propre valeur, comme cela se produit avec la moyenne arithmétique. On peut calculer la moyenne géométrique comme étant la racine $n^{\text{ième}}$ du produit de n valeurs et, aussi, comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes des n valeurs.

paramètre de mesure, v. EFFET MESURÉ.

précision, mesure de la dispersion de mesures répétées de la même quantité, c'est-à-dire du degré d'écart entre les résultats. Elle décrit la certitude entourant un résultat ou la petitesse de l'intervalle dans lequel se situe le résultat du calcul statistique de l'effet mesuré, p. ex. la CIp.

prélèvement réitéré, v. échantillonnage réitéré.

répétition, chaque enceinte expérimentale renfermant l'inoculum prescrit d'organismes, en présence d'une concentration de la matière ou de la substance d'essai ou dans le(s) milieu(x) témoin(s) ou de référence. Elle constitue une unité expérimentale indépendante. C'est pourquoi tout transfert d'organismes ou de matières d'une enceinte à l'autre invalide l'essai.

toxicité, capacité propre qu'a une matière de provoquer un ou des effets nocifs chez des organismes. L'effet ou les effets pourraient être létaux ou sublétaux.

toxicité aiguë, manifestation d'un effet nocif (létaux ou sublétaux) chez l'organisme en expérience, après une courte exposition au *sédiment d'essai* (pour les besoins de la présente méthode, en quelques minutes).

toxique, adj. Nocif pour les organismes vivants (s'il se trouve en quantité suffisante au bon endroit). ♦ n. m., substance toxique, poison.

variante, sédiment (p. ex. prélevé en un *emplacement donné* ou *sédiment de référence* prélevé à une station et à une profondeur données) ou concentration de ce sédiment. Dans un essai de toxicité, elle est habituellement représentée par plusieurs échantillons ou sous-échantillons du sédiment d'essai. Voir RÉPÉTITION.

Remerciements

Rédigée par D. McLeay (McLeay Environmental Ltd., Victoria) et G. Wohlgeschaffen (Dartmouth [N.-É.]), la présente *méthode de référence* est l'aboutissement d'un projet entrepris et financé par la Direction du milieu marin d'Environnement Canada (EC), avec l'appui et l'encouragement de L. Porebski et de J. Osborne (EC, Canada, Hull). En sa qualité d'autorité scientifique, R. Scroggins (Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, EC, Canada, Ottawa) a fourni l'apport technique et des orientations tout au long des travaux. Les conseils techniques et les notes de révision fournis par K. Doe (Centre des sciences environnementales de l'Atlantique, EC, Moncton) au cours de l'élaboration, de la validation et de la rédaction de la méthode ont été particulièrement utiles, et nous lui en savons particulièrement gré. Les données et les observations techniques fournies par D. Lee (EC, North Vancouver [C.-B.]) et D. St. Laurent (EC, Montréal) ont également aidé à la préparation de cette méthode de référence. À M. G. Schroeder (EC, North Vancouver), nous sommes redevables de l'élaboration des feuilles de calcul électroniques recommandées ici pour la comparaison de deux CI50.

Le Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (GIE, annexe B) a participé à l'élaboration du rapport et à sa révision. En le remerciant, nous remercions aussi les agents d'Environnement Canada dans les régions et à l'Administration centrale (annexe C) pour leur appui.

Des remerciements particuliers vont à chaque membre du groupe consultatif scientifique chargé de des conseils et de l'apport scientifiques qui, au cours de l'élaboration et de la révision du document, a fait de nombreuses observations utiles. Ce groupe comprenait M. C. Buday (EC, North Vancouver), le Dr A. Burton, fils (Université d'État Wright, Dayton, Ohio), M. K. Doe (EC, Moncton), le Dr K. Ho (USEPA, Narragansett, Rhode Island), Mme P. Jackman (EC, Moncton), M. J. Osborne (EC, Hull), Mme L. Porebski (EC, Hull), le Dr P. Ross (Colorado School of Mines, Golden, Colorado) et MM. R. Scroggins (EC, Ottawa), P. Topping (EC, Hull) et S. Trottier (EC, Montréal). L'annexe D donne les coordonnées de chacun ainsi que de l'autorité scientifique et des consultants.

Les photos de la première de couverture ont été fournies par Paula Jackman, Troy Steeves et Dale Hughes (Centre des sciences environnementales, EC, Moncton).

Introduction

La présente *méthode de référence* précise les marches à suivre et les conditions à employer pour préparer et entreprendre un essai de mesure, en *phase solide*, de la *toxicité* d'échantillons d'un sédiment à l'aide de bactéries luminescentes (*Vibrio fischeri*). Représentant une des méthodes biologiques employées dans le cadre d'évaluations des *sédiments* compatibles avec le règlement fédéral concernant l'immersion en mer, sous le régime de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (EC, 1997a ; LCPE, 1999 ; Gouvernement du Canada, 2001), cette méthode *peut* aussi servir à mesurer la toxicité d'échantillons de sédiment dont on envisage l'élimination sur la terre ferme ou dans les *emplacements* en eau douce, *estuarienne* ou *marine* pour lesquels sont prescrits des évaluations réglementaires ou des modes opératoires rigoureux. Environnement Canada a publié une autre méthode de référence, destinée aux échantillons de sédiment (EC, 1998). Il existe aussi d'autres méthodes fédérales (Environnement Canada) d'essai biologique pour mesurer la toxicité de sédiments (v. annexe A).

Les chercheurs et les responsables de la réglementation au Canada, aux États-Unis et ailleurs utilisent les essais en *phase solide* pour mesurer la toxicité d'un sédiment à l'aide de bactéries luminescentes (*V. fischeri*, auparavant identifié comme *Photobacterium phosphoreum*) depuis la première application de ce mode opératoire, par des chercheurs canadiens, aux sédiments du port de Hamilton (Brouwer *et al.*, 1990). La société Microbics (Carlsbad, Californie) a ultérieurement normalisé un essai de toxicité *aiguë* d'un sédiment (ou d'un sol) en phase

solide et l'a inclus dans ses méthodes Microtox^{MD} (Microbics, 1992). À l'époque, Environnement Canada (1992) a recommandé la méthode Microtox en *phase solide* pour évaluer la toxicité d'échantillons de sédiments ou de matières solides semblables, tout en reconnaissant que sa normalisation se trouvait encore à ses premiers balbutiements. Néanmoins, la méthode publiée par Environnement Canada (1992), qui reste une référence utile (et de mise pour les essais *en phase liquide*), complétera bien la présente méthode, lorsqu'il s'agira de réaliser des *essais de toxicité* aiguë en *phase solide* avec des bactéries luminescentes.

Beaucoup de conditions et d'éléments des modes opératoires précisés dans la présente méthode correspondent aux indications et aux approches décrites pour la mesure de la toxicité de sédiments en phase solide au moyen de *V. fischeri*, dans diverses méthodes ou divers modes opératoires normalisés de laboratoire, notamment : EC (1992), Microbics (1992, 1995a), ASTM (1995), EC (1996a), AZUR (1997), AZUR (1998a, b), EC (1999a) et NICMM (1999). L'annexe E examine les similitudes et les différences que présentent ces documents. Reconnaisant leur apport à toutes les parties de la présente méthode, nous recommandons de les consulter comme sources explicatives. Toutefois, dans la planification et la réalisation, à des fins réglementaires, d'essais de toxicité de sédiments en *phase solide* à l'aide de bactéries luminescentes (*V. fischeri*) au Canada, il *faudrait* considérer les modes opératoires et conditions énoncés ici comme définitifs.

Outre les lignes directrices méthodologiques ou les modes opératoires normalisés dont on résume, dans l'annexe E, les conditions et manipulations s'appliquant avant et pendant les essais, un certain nombre de publications scientifiques offrent désormais d'autres précisions utiles sur la réalisation d'essais de toxicité des sédiments en phase solide à l'aide de bactéries luminescentes. Ce sont notamment (et l'énumération n'est pas limitative) : des études de l'influence de la composition des sédiments sur la toxicité apparente (Benton *et al.*, 1995 ; Ringwood *et al.*, 1997 ; Tay *et al.*, 1998) ; une étude du rôle de la toxicité des sulfures dans les sédiments réduits comme facteur de la toxicité des sédiments des eaux douces (Brouwer et Murphy, 1995) ; une étude des corrélations entre un certain nombre d'essais de toxicité des sédiments en phase solide et la structure in situ des communautés benthiques (Day *et al.*, 1995) ; la contribution des essais de toxicité des sédiments en phase solide à l'aide de *V. fischeri* aux plans d'expérience et à l'interprétation des données (Ross et Leitman, 1995) ; une étude de la toxicité des sédiments du port de Halifax (Cook et Wells, 1996) ; le rôle de cet essai et d'autres essais de toxicité des sédiments dans l'évaluation de la toxicité des sédiments (Ross, 1998 ; Bombardier et Birmingham, 1999) et la *précision* interlaboratoires d'un essai de toxicité des sédiments en phase solide employant *V. fischeri* (Ross *et al.*, 1999).

Avant de donner à la présente *méthode de référence* sa forme finale, on a effectué deux séries d'études interlaboratoires avec des échantillons de référence et des sédiments contaminés, pour déterminer sa précision intra- et interlaboratoires et la valider. À

chaque série ont participé les mêmes laboratoires (six) diversement expérimentés (de moins d'une à huit années d'expérience) dans les essais de toxicité des sédiments en phase solide à l'aide de bactéries luminescentes. La première série a été appliquée par chaque laboratoire à un ensemble identique de parties aliquotes (sous-échantillons) de huit matières sèches, uniquement identifiées par les numéros 1 à 8. Sept matières étaient des sédiments étalons certifiés (de référence ou contaminés), secs, fournis par le CNRC, tandis que la huitième était constituée à 100 % de kaolin (une argile) séché. Bien qu'elles n'aient pas été identifiées comme telles, quatre de ces huit matières étaient des sous-échantillons prélevés dans le même lot d'un seul échantillon composite de sédiment étalon contaminé du CNRC. Pour la seconde série d'essais, on a envoyé à chaque laboratoire, un ensemble identique de 11 sous-échantillons de sédiment « humide », prélevés sur le terrain, dans un certain nombre de stations contaminées ou de stations d'échantillonnage de référence, situées dans les eaux côtières du Canada. Bien qu'elles n'aient pas été identifiées comme telles, trois des 11 matières provenaient du même lot d'un échantillon composite d'un seul sédiment de référence. Les conclusions de ces études, qui sont exposées en détail dans un rapport technique que l'on peut obtenir de la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada (McLeay *et al.*, 2001), ont révélé une très bonne précision intra- et interlaboratoires pour chaque série d'essais ayant respecté les conditions préalables à l'essai et les conditions d'essai exposées en détail dans la présente *méthode de référence*.

Organismes d'essai

2.1 Espèce

Les organismes utilisés dans l'essai proviennent d'une culture normalisée (souche NNRL B-11177 ; v. tableau 10, annexe E). Ils appartiennent à une espèce particulière de bactérie marine luminescente (c'est-à-dire *Vibrio fischeri*, auparavant classé dans l'espèce *Photobacterium phosphoreum*). Cette bactérie vit normalement dans l'océan et émet une lumière bleu-vert continue, à la faveur de réactions enzymatiques, si la teneur en oxygène est suffisant (EC, 1992).

2.2 Source et entretien

Les cultures étalons de *V. fischeri* peuvent être achetées de Strategic Diagnostics Inc.¹. Les bactéries sont commercialisées sous la forme de souche uniforme de bactéries (« réactif bactérien ») lyophilisées (c'est-à-dire que l'on a séchées par congélation sous vide), récoltées au cours de la phase de croissance exponentielle. Les lots de production sont vendus en paquets renfermant chacun au moins 10 flacons scellés. Chaque flacon renferme 100 millions (10⁸) d'organismes lyophilisés.

Dans son récipient, le *réactif bactérien* lyophilisé serait stable un an au maximum,

s'il est conservé au congélateur à -20 °C (EC, 1992)². La température de conservation devrait être constante et se tenir dans l'intervalle de -25 à -20 °C ; on ne devrait pas utiliser de congélateur sans givre, se réchauffant au cours du dégivrage. On devrait déterminer la viabilité des nouveaux lots de bactéries ou de chaque lot utilisé sur une longue période par un essai de toxicité de référence en *phase solide* effectué avec au moins une substance chimique, conformément aux modes opératoires et aux conditions décrits dans la section 5. Chaque lot convient à un essai d'au moins deux heures (EC, 1992) et d'au plus trois heures (Gaudet, 1998), après reconstitution.

Il faut consigner le numéro du lot des bactéries utilisées dans chaque essai de toxicité et la date de péremption de ce lot ; cette information doit figurer dans le procès-verbal de l'essai, ainsi que le nom de l'espèce et de la souche (v. § 7.1.2). Les autres données propres à l'organisme d'essai, notamment sa source, sa date de réception et sa température d'entreposage ou de maintien doivent soit figurer dans le procès-verbal de l'essai ou le rapport général ou être conservées en archives pendant au moins cinq ans (v. § 7.2.2).

¹ Ce produit et les produits apparentés ainsi que des quantités permettant la réalisation d'essais de toxicité en phase solide avec *V. fischeri* ont d'abord été commercialisés par AZUR Environmental Ltd. (Carlsbad, CA). Les droits de commercialisation des produits et des réactifs Microtox^{MD} ont été acquis par Strategic Diagnostics Inc. de Newark, Delaware (DE). Pour obtenir les coordonnées de cette société, allez sur son site Web, à www.sdix.com, ou, par téléphone, faites le 1-800-544-8881.

² Sur les étiquettes des boîtes et des flacons fournis par Strategic Diagnostics Inc., la température recommandée de conservation se situe entre -25 et -20 °C.

Installations, équipement et fournitures

3.1 Installations

L'essai peut se dérouler dans un laboratoire normal, propre, à l'éclairage standard. Le degré de danger posé par les échantillons et le risque de contamination des échantillons et de l'appareillage commanderaient l'emploi d'installations particulières. Les lieux doivent être bien aérés, exempts d'émanations et isolés des causes de perturbations physiques et des contaminants atmosphériques qui pourraient perturber les organismes en expérience. Les installations d'essai devraient aussi être isolées des lieux de préparation des sédiments d'essai et éloignées, également, des lieux où l'on nettoie l'équipement.

3.2 Appareillage

3.2.1 Nettoyage

Toute pièce d'équipement et toute fourniture qui pourraient entrer en contact avec le sédiment ou l'eau d'essai doivent être propres et sèches. Tout le matériel non jetable devrait être lavé après usage. Le mode suivant de nettoyage (EC, 1997b, c) est recommandé.

1. Faire tremper dans l'eau du robinet pendant 15 min, puis nettoyer à fond au détergent ou laver dans un lave-vaisselle automatique.
2. Rincer deux fois à l'eau du robinet.
3. Rincer soigneusement avec de l'acide nitrique (HNO_3) ou chlorhydrique (HCl) fraîchement préparé, dilué (10 % v/v³) pour supprimer le tartre, les métaux et les bases.

4. Rincer deux fois à l'eau désionisée.
5. Rincer une fois à l'acétone non diluée, de qualité convenant à l'analyse des pesticides, pour éliminer les composés organiques (sous hotte). Contre les résidus huileux, utiliser de l'hexane.
6. Rincer trois fois à l'eau désionisée de qualité.

3.2.2 Grandes lignes de l'essai et appareillage connexe

Cet essai en phase solide de mesure de la toxicité d'échantillons de sédiment entier comporte les étapes suivantes :

- préparation d'une série de dilutions de l'échantillon dans l'eau ;
- mélange de ces dilutions avec un inoculum d'organismes d'essai (*V. fischeri* reconstitué), puis incubation, pendant 20 min, dans des tubes à essai plongés dans un bain d'eau à $15 \pm 0,5$ °C ;
- immédiatement après, filtration du contenu de chaque tube ;
- stabilisation du filtrat, à $15 \pm 0,5$ °C, pendant 10 min, dans une série de cuvettes maintenues dans les puits d'un photomètre ;
- photométrie de la bioluminescence des bactéries subsistant dans le filtrat.

3.2.3 Équipement

L'équipement et les fournitures nécessaires à la réalisation de ces étapes sont rapidement décrits ci-dessous. On devrait consulter le fournisseur pour obtenir plus de précisions sur ses articles. L'équipement et les fournitures entrant en contact avec les

³ En ajoutant, soigneusement, 10 mL d'acide concentré à 90 mL d'eau désionisée.

sédiments ou l'eau ne doivent pas renfermer de *substances* lixiviables ou solubles en quantités nuisibles pour les organismes en expérience. On devrait les choisir soigneusement afin de réduire au minimum la sorption de *matières* de l'eau.

L'équipement permettant l'exécution de l'essai de toxicité des sédiments en phase solide comprend ce qui suit :

- photomètre Microtox^{MD} modèle 500 *Analyzer* (appelé ci-après « modèle 500 de Microtox ») ou photomètre équivalent, thermostaté ($15 \pm 0,5$ °C pour au moins 15 cuvettes renfermant les solutions d'essai ; $5,5 \pm 1$ °C pour une seule cuvette renfermant les bactéries reconstituées dans l'alvéole du *réactif*), capable de mesurer la bioluminescence à la longueur d'onde de 490 ± 100 nm (ASTM, 1995) ;
- bain d'eau thermostaté à $15 \pm 0,5$ °C ;
- portoir de tubes à essai ou compartiment d'incubateur pour l'incubation des tubes à essai renfermant des dilutions de la matière d'essai et *V. fischeri* dans le bain d'eau ;
- congélateur (qui n'est pas du type sans givre) pour conserver les bactéries lyophilisées (*réactif bactérien*) ;
- pipettes automatiques débitant des volumes de 20, 500, 1000 et 1500 µL, à cônes de plastique jetables⁴ ;

⁴ La précision et l'exactitude des pipettes devraient être élevées (p. ex. pour 20 µL, précision de 2% et exactitude de 10% au moins ; pour 500 µL, 1 et 5%, respectivement ou mieux ; pour 1500 µL, 2 et 5% respectivement ou mieux. Les cônes jetables des pipettes débitant 1500 µL devraient avoir une ouverture de plus de 1,5 mm de diamètre, pour réduire au minimum le colmatage dû aux particules solides (ASTM, 1995 ; EC, 1996a).

- tubes à *essai en phase solide* (tubes d'*EPS*) [15,5 mm sur 56, capacité de 7,5 mL, fond hémisphérique] ou tubes à essai équivalents ;
- cuvettes de verre jetables (verre borosilicaté, 3 mL de capacité, 50 mm de longueur sur 12 de diamètre, à fond plat) ;
- colonnes de filtration jetables pour les tubes d'*EPS* ou les tubes à essai équivalents⁵ ;
- verrerie jaugée borosilicatée (lavée à l'acide conformément au § 3.2.1) pour le traitement de petites aliquotes d'échantillons ;
- chronomètre ou minuterie à affichage de compte à rebours ;
- mélangeur à barreau magnétique enrobé de téflon ;
- balance, d'une précision de 0,01 g ;
- étuve (100 ± 5 °C) ;
- récipients de pesée pour la détermination du poids sec ;
- cuillère ou spatule de métal pour l'homogénéisation des échantillons.

3.2.4 Fournitures

On se procure les bactéries qui serviront à l'essai en culture normalisée et lyophilisée (« *réactif bactérien* », v. section 2) et on les

⁵ Ce sont des colonnes de séparation sérique en polyéthylène, de 13 mm de diamètre extérieur, 11 mm de diamètre intérieur, 67 mm de hauteur, dont l'extrémité inférieure, où le filtre s'adapte aux tubes d'*EPS*, est dotée d'un joint d'étanchéité souple de 15 mm de diamètre. Le filtre même, qui occupe la partie inférieure de la colonne, possède un diamètre de 6 mm et une épaisseur de 4 mm. La taille des pores va de 15 à 45 µm, d'après le fournisseur [Evergreen Scientific, Los Angeles, tél. : (323) 583-1331, pièce n° 208-3193-020].

garde au congélateur à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EC 1992 ; ASTM 1995).

On se sert d'eau distillée ou désionisée non toxique pour activer un flacon de *réactif bactérien* (v. § 4.6). Pour désigner cette eau, on parle souvent de *solution de reconstitution*, que l'on peut soit acheter telle quelle (v. tableau 11 ; annexe E), soit prendre dans les fournitures du laboratoire et utiliser après essai confirmant qu'elle ne diminue pas la bioluminescence de *V. fischeri*. Pour cet essai, on utilise de l'eau devant servir de *solution de reconstitution*, comme eau *témoin* ou comme eau servant à la préparation des solutions filles du ou des *toxiques de référence* utilisés systématiquement au laboratoire pour l'évaluation de l'essai mené avec *V. fischeri*. En conséquence, on devrait évaluer la bioluminescence de *V. fischeri* due à la *solution de reconstitution* prévue dans un

essai de toxicité en milieu exclusivement aqueux, avec un ou plusieurs *toxiques de référence*, conformément aux modes opératoires et aux conditions exposés dans Environnement Canada (1990), de même que dans la section 4 « *Méthodes universelles* » de la méthode d'essai biologique publiée par Environnement Canada et exposant les *essais de toxicité en phase liquide* employant la bactérie luminescente *V. fischeri* (EC, 1992).

Pour diluer chaque échantillon de sédiment d'essai, il faut une réserve de « *diluant en phase solide* » (v. tableau 5 ; annexe E) constituée d'une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 3,5% (v. § 4.6). On peut acheter ce *diluant* ou, encore, le préparer en dissolvant 35,0 g de NaCl (de qualité « réactif ») dans 1000 mL de *solution de reconstitution* (c'est-à-dire d'eau distillée ou désionisée non toxique).

Essai du sédiment

4.1 Prélèvement de l'échantillon

Environnement Canada (1994) donne des orientations sur les plans d'échantillonnage sur le terrain et sur les bonnes techniques de prélèvement des échantillons, qu'il faudrait suivre si ces échantillons sont destinés aux essais de toxicité à l'aide de la présente *méthode de référence*.

Les modes opératoires et les préleveurs (c'est-à-dire carottiers, bennes, dragues, préleveurs d'échantillons composites) dépendent de la nature des échantillons ainsi que des objectifs de l'étude ou des exigences réglementaires. On devrait prélever les échantillons de déblais de dragage à toutes les profondeurs auxquelles on s'intéresse.

Chaque série d'essais de toxicité selon la présente *méthode de référence* devrait comprendre un ou plusieurs échantillons de *sédiment de référence*. On devrait chercher ce sédiment dans les endroits où ses propriétés géochimiques, notamment la granulométrie, sont semblables à celles du *sédiment d'essai* (contaminé ou susceptible d'être contaminé) dans le lieu de prélèvement de ce sédiment. Idéalement, le sédiment de référence devrait provenir d'un endroit à l'abri de l'influence de la source ou des sources de contamination, mais dans les parages des endroits où on prélève le sédiment d'essai. Il est recommandé de prélever le sédiment de référence en plus d'un emplacement, pour accroître la probabilité d'une bonne correspondance de la granulométrie et d'autres caractéristiques physicochimiques avec celles des sédiments d'essai.

Le plan d'expérience d'un essai de toxicité employant un ou plusieurs échantillons de sédiment d'essai grossier comportant moins de 20% de *fines* doit comprendre un échantillon de *sédiment de référence non contaminé* ou de *sédiment témoin négatif*, pour comparer la toxicité des échantillons (v. § 6.2). Le taux de fines de ces sédiments de référence ou témoin ne doit pas différer de plus de 30% du taux de fines de l'échantillon ou des échantillons de sédiment d'essai auquel on les compare (§ 6.2). Si leur taux de fines satisfait à cette exigence, ces sédiments prélevés sur le terrain peuvent servir de référence ou de témoin, auquel cas l'orientation relative au prélèvement des échantillons s'applique. On peut aussi, pour faire coïncider étroitement le taux de fines avec celui du ou des échantillons de sédiment d'essai grossier, opter pour la préparation d'un ou de plusieurs échantillons de *sédiment témoin négatif artificiel*. Les orientations sur sa préparation sont données dans les § 4.3 et 4.4.

Le nombre de stations à échantillonner dans l'emplacement étudié et le nombre d'*échantillons réitérés* par station sont particuliers à l'étude. Dans la plupart des cas, il s'agira d'établir un compromis entre les contraintes logistiques et pratiques (p. ex. temps et coûts) et les besoins statistiques. Il faudrait consulter Environnement Canada (1994) pour obtenir des orientations sur le plan d'échantillonnage, y compris le nombre minimal recommandé de prélèvements réitérés sur le terrain. On peut trouver des orientations supplémentaires sur l'échantillonnage pour l'immersion en mer dans Environnement Canada (1995a ; 2002a). Nous incitons les demandeurs à consulter le

Bureau régional de l'immersion en mer d'Environnement Canada (coordonnées dans l'annexe C) avant d'entreprendre les prélèvements et les essais.

Lorsque cela est pratique et est compatible avec le plan et les objectifs de l'étude, on devrait prélever au moins cinq échantillons de sédiment dans chaque *station d'échantillonnage* et à chaque profondeur à laquelle on s'intéresse. Lorsque cela est pratique et convenable (v. section 6), les échantillons prélevés devraient comprendre au moins cinq échantillons d'au moins une station de référence (c'est-à-dire d'emplacements où on peut trouver un sédiment non contaminé, aux propriétés physicochimiques semblables à celles des sédiments d'essai) dans les parages. L'objectif du prélèvement réitéré d'échantillons dans chaque station (*prélèvements réitérés*) est de permettre des comparaisons statistiques quantitatives relativement à la station ou entre différentes stations (EC, 1994 ; 1998 ; 2002b). En conséquence, chacun de ces « véritables échantillons réitérés » de sédiment devrait être soumis à un essai de sa *toxicité aiguë* pour *V. fischeri*. Des *répétitions de laboratoire* employant des sous-échantillons de chaque échantillon prélevé sur le terrain de sédiment d'essai et de référence, après mélange et autres manipulations (v. § 4.3), pourraient aussi faire partie d'une étude, dans les cas où l'homogénéité des échantillons ou la précision des résultats expérimentaux sont douteuses.

On devrait utiliser une benne (p. ex. Smith-MacIntyre, Van Veen, PONAR) ou un carottier pour prélever le sédiment, plutôt qu'une drague, afin de perturber au minimum l'échantillon. On devrait veiller, au cours de l'échantillonnage, à réduire au minimum la perte de fines. On devrait utiliser partout la même méthode de prélèvement.

Le volume d'échantillons nécessaire à un essai de toxicité des sédiments employant *V. fischeri* et portant sur plusieurs concentrations est faible (v. § 4.6). Environ 100 mL devraient être expressément utilisés pour la réalisation de l'essai⁶. On a souvent besoin, par échantillon, d'au moins 5 à 7 L de sédiment entier (EC, 1994), bien que ce volume dépende des objectifs et du plan de l'étude ainsi que de la nature des analyses physicochimiques connexes et de la *batterie d'essais* de toxicité à effectuer. Pour obtenir le volume nécessaire d'échantillons pour la batterie d'essais, il est souvent nécessaire de combiner des sous-échantillons obtenus au moyen du préleveur. On devrait suivre les orientations données dans Environnement Canada (1994) pour obtenir un échantillon composite à partir de sous-échantillons prélevés sur le terrain.

4.2 *Étiquetage, transport et entreposage des échantillons*

Outre les consignes qui suivent, on trouve des orientations plus détaillées et utiles concernant l'étiquetage, le transport et le stockage des échantillons dans Environnement Canada (1994), document qu'il faudrait bien connaître à cette fin.

Les récipients servant au transport et à l'entreposage des échantillons doivent être neufs ou nettoyés et rincés à fond avec de l'eau propre. On devrait consulter Environnement Canada (1994) pour obtenir des orientations sur le choix des récipients convenables. Chaque récipient devrait être rempli entièrement de l'échantillon, pour en exclure l'air. Sans délai, on devrait le sceller, puis l'étiqueter ou le coder. L'étiquetage et

⁶ Volume suffisant pour donner plus de 100 g de sédiment humide et permettre au moins 10 essais sur l'échantillon.

les enregistrements connexes qui accompagnent cette opération doivent comprendre au moins un code que l'on peut utiliser pour identifier l'échantillon ou le sous-échantillon. Un registre à renvois croisés, qui pourrait ou pourrait ne pas accompagner l'échantillon ou le sous-échantillon, doit être établi par le personnel de terrain identifiant le type d'échantillon (p. ex. prélevé par benne, carottier, échantillon composite), sa source, le lieu précis du prélèvement (p. ex. hydronyme, latitude, longitude, profondeur), le numéro d'*échantillon réitéré* et la date du prélèvement. Cet enregistrement devrait aussi comprendre le ou les noms et signatures du ou des préposés au prélèvement, lesquels devraient aussi conserver des registres décrivant :

- la nature, l'aspect, le volume et/ou la masse de chaque échantillon ;
- la méthode et l'appareillage utilisés pour le prélèvement ;
- toute méthode utilisée pour obtenir un échantillon composite ou des sous-échantillons des sédiments prélevés par benne ou carottier ;
- le nombre d'échantillons réitérés prélevés dans chaque *station d'échantillonnage* ;
- le calendrier d'échantillonnage ;
- les types de récipients utilisés pour le transport des échantillons et leur nombre ;
- toute mesure effectuée sur le terrain (p. ex. température, *salinité*, *pH*, oxygène dissous) dans la colonne d'eau ou dans le sédiment sur les lieux du prélèvement) ;
- les méthodes et les conditions concernant le refroidissement et le transport des échantillons.

Dès le prélèvement, on devrait refroidir les échantillons tièdes ($> 7\text{ }^{\circ}\text{C}$) entre 1 et $7\text{ }^{\circ}\text{C}$, avec de la glace ordinaire ou des contenants réfrigérants (« cryosacs ») et les maintenir froids ($4 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), dans l'obscurité, durant le transport (EC, 1994 ; 1998). Au besoin, on devrait utiliser des contenants réfrigérants, de la glace ordinaire, des glacières ou d'autres moyens de réfrigération pour maintenir l'intervalle de températures de l'échantillon dans la fourchette de 1 à $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler, pas même en partie, au cours du transport ou de l'entreposage, et on ne doit pas les laisser sécher (EC, 1994).

À l'arrivée au laboratoire, il faut enregistrer la température de l'échantillon et sa date de réception sur une fiche à l'usage du laboratoire (voir l'exemple de l'annexe F). Les échantillons à conserver pour usage ultérieur doivent être gardés dans des récipients étanches, à l'obscurité, à $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EC, 1994 ; 1998). Il est recommandé de soumettre à l'essai le plus tôt possible après le prélèvement, les échantillons de sédiment ou de matières particulaires semblables. L'essai de toxicité du sédiment devrait commencer dans les deux semaines suivant le prélèvement, de préférence dans la semaine qui suit ce dernier ; l'essai ne doit pas démarrer plus de six semaines après le prélèvement (EC, 1994 ; 1997b ; 1997c ; 1998).

4.3 Manipulation et caractérisation des échantillons

Il ne faut pas soumettre au tamisage hydraulique les échantillons de *sédiment de référence* et *d'essai* prélevés sur le terrain. Il faudrait en éliminer les particules d'au moins 2 mm ainsi que les gros débris ou les gros organismes indigènes. Selon l'échantillon, on *peut* à cette fin travailler avec une pincette ou

un gant, qu'on devrait rincer ou remplacer, entre chaque échantillon, pour en prévenir la contamination croisée. Si un échantillon renferme beaucoup de particules d'au moins 2 mm et beaucoup d'organismes indigènes macroscopiques qui ne peuvent pas être éliminés avec la pincette ou la main gantée, on peut soumettre l'échantillon à un tamisage sous pression (non hydraulique) au travers d'au moins un tamis d'acier inoxydable à ouvertures convenablement calibrées (p. ex. ≥ 2 mm). Cette manipulation devrait s'appliquer à toutes les fractions de l'échantillon utilisées pour les analyses physicochimiques (y compris l'analyse granulométrique), de même qu'aux fractions destinées aux essais de toxicité des sédiments en phase solide avec *V. fischeri*. Les modes opératoires utilisés pour la manipulation de chaque échantillon doivent être notés sur la fiche de laboratoire (voir la colonne intitulée « Notes » dans l'exemple de l'annexe F).

Il faut homogénéiser de nouveau le sédiment et l'eau de porosité qui se seraient séparés au cours de l'expédition et de l'entreposage. À cette fin, on mélange l'échantillon, soit dans le récipient qui a servi à son transport ou à son entreposage, soit dans un récipient propre servant à cette opération. On devrait normalement employer un outil non toxique (p. ex. une cuillère ou une spatule en acier inoxydable), tant que la texture et la couleur ne sont pas homogènes. On peut aussi utiliser une méthode mécanique (EC, 1994 ; 1998) pour homogénéiser l'échantillon. Pour chaque échantillon faisant partie d'un essai, il faut que les conditions de mélange, y compris la durée et la température à laquelle l'opération se déroule soient aussi semblables que possible. Si on doute de l'efficacité du brassage de l'échantillon, on devrait prélever des sous-échantillons du sédiment après le mélange, puis en analyser séparément l'homogénéité.

Immédiatement après le mélange de l'échantillon, il faut prélever les sous-échantillons de la matière exigée pour cet essai de toxicité et d'autres (p. ex. EC, 1998) et pour les analyses physicochimiques, les placer dans des enceintes d'essai étiquetées et dans les récipients étiquetés exigés pour l'entreposage des échantillons destinés à des analyses physicochimiques ultérieures. Il faudrait alors transvaser aussi toute fraction subsistant de l'échantillon homogénéisé qui pourrait être nécessaire à des essais supplémentaires de toxicité employant des amphipodes (EC, 1998) ou d'autres organismes dans des récipients étiquetés. On devrait conserver tous les sous-échantillons à entreposer dans des récipients scellés, sans espace d'air, et on doit les ranger à l'obscurité, à 4 ± 2 °C, jusqu'à l'emploi ou l'analyse. Immédiatement avant de l'analyser ou de l'employer dans l'essai de toxicité, il faut mélanger de nouveau à fond chaque sous-échantillon, pour s'assurer de son homogénéité.

On doit caractériser chaque échantillon (notamment de *sédiment de référence*, de *sédiment témoin négatif* et de *sédiment témoin positif*), au moyen de sous-échantillons, au moins relativement aux paramètres suivants (EC, 1998) : dans le cas d'un sédiment entier, le pourcentage de particules très grossières (c'est-à-dire $> 1,0$ mm), de sables ($> 0,063$ à $2,0$ mm), de fines ($0,063$ mm ou moins), d'eau et de carbone organique total ; dans le cas de l'eau de porosité, la salinité et le pH. On pourrait également englober d'autres analyses : la teneur en carbone inorganique total, en matières volatiles totales, la demande biochimique d'oxygène, la demande chimique d'oxygène, la capacité d'échange cationique, les sulfures extractibles à l'acide, les métaux, les composés organiques de synthèse, les huiles et les graisses, les hydrocarbures de pétrole, tandis que les

analyses de l'eau de porosité porteraient sur diverses caractéristiques physicochimiques telles que l'ammoniac (total et non ionisé) ou le sulfure d'hydrogène. Les modes opératoires recommandés pour le prélèvement de l'eau de porosité sont décrits dans Environnement Canada (1994). Il faudrait s'y conformer pour les besoins de la présente méthode. Pour les applications concernant l'immersion en mer, les renseignements minimaux exigés sont expliqués dans deux lignes directrices d'Environnement Canada (c'est-à-dire EC, 1995a ; 2002a).

Il faut entreprendre le plus tôt possible après le prélèvement des échantillons, les analyses de la répartition granulométrique, pour faciliter la sélection du ou des échantillons convenables de *sédiment de référence* et, le cas échéant, du *sédiment témoin négatif* (v. § 4.4 et 6.2).

À la faveur d'études antérieures, on a constaté que *V. fischeri* tolère tout à fait les fortes concentrations d'ammoniaque (Qureshi *et al.*, 1982) y compris dans l'eau de porosité d'échantillons de sédiments prélevés en milieu marin ou estuarien (McLeay *et al.*, 2001). D'après ces données limitées, les fortes concentrations d'ammoniaque dans l'eau de porosité ne sont pas un facteur majeur de confusion pour les résultats des essais. Cependant, on pourrait vouloir mesurer la contribution de l'ammoniaque de l'eau de porosité à la toxicité de l'échantillon déterminée par la présente *méthode de référence*. À cette fin, il faudrait mesurer le pH, et la salinité de l'eau de porosité et en doser l'ammoniaque dans les 24 heures suivant l'essai de toxicité du sédiment en phase solide à l'aide de *V. fischeri*, pour déterminer à quelles concentrations d'ammoniac total et non ionisé les organismes ont été exposés (§ 6.2). Les analyses de l'ammoniaque doivent employer

un mode opératoire reconnu et normalisé (par exemple APHA *et al.*, 1995 ; *Standard Methods*). Les calculs des concentrations d'ammoniac non ionisé doivent se fonder sur la température à laquelle se déroule l'essai, le pH de l'eau de porosité et la salinité de l'échantillon (Trussell, 1972 ; Bower et Bidwell, 1978).

4.4 *Sédiments témoins négatif et positif*

Les essais de toxicité limités à un ou à plusieurs échantillons de sédiment fin (renfermant au moins 20 % de fines) n'ont pas besoin d'échantillon de sédiment témoin négatif ni de sédiment de référence *non contaminé*, puisque la toxicité de ces échantillons ne s'estime pas par comparaison des résultats des essais aux résultats donnés par un échantillon de sédiment non contaminé possédant des caractéristiques granulométriques semblables. Cependant, tout essai de toxicité portant sur un ou plusieurs échantillons de sédiment renfermant moins de 20% de fines doit comprendre un échantillon de *sédiment non contaminé* dont le taux de fines ne diffère pas de plus de 30% de celui du ou des échantillons de sédiment d'essai auxquels on le compare pour estimer la toxicité (v. § 6.2). On peut se servir, à cette fin, d'un sédiment *non contaminé* prélevé sur le terrain, dans un emplacement non contaminé. Il est cependant recommandé d'employer un sédiment témoin négatif préparé en laboratoire (*artificiel*), puisqu'on peut faire correspondre étroitement sa teneur en fines à celle du ou des sédiments d'essai. Pour sa préparation, on devrait employer un mélange convenable de sable de silice lavé et/ou de kaolin du commerce, dont la granulométrie correspond à celle du ou des sédiments d'essai. On devrait mélanger ces ingrédients à fond, dans des proportions semblables à celles que l'on trouve dans le ou

les sédiments d'essai. Le mode opératoire de la préparation et les résultats des essais de toxicité en phase solide avec *V. fischeri* employant un sédiment témoin négatif artificiel sont présentés dans Ringwood *et al.* (1997), Tay *et al.* (1998) et McLeay *et al.* (2001).

On devrait faire correspondre aussi étroitement que possible le taux de fines du ou des échantillons de sédiment témoin négatif englobés dans l'essai de toxicité et le taux de fines du ou des sédiments d'essai. Si, dans le cadre d'une étude, on soumet consécutivement à des essais de toxicité une série de sédiments renfermant une large gamme de pourcentages de fines, on pourrait y englober plus d'un sédiment témoin négatif, dont le taux de fines correspondrait aussi étroitement que possible à l'intervalle trouvé dans les sédiments d'essai.

Dans chaque série d'essais de toxicité, on recommande d'inclure un ou plusieurs échantillons de *sédiment témoin positif*, pour faciliter l'interprétation des résultats (§ 6.2). Ce témoin pourrait être un *sédiment contaminé étalon*, comme on peut s'en procurer par le Programme des matériaux de référence certifiés (PMRC, autrefois Programme des étalons d'analyse chimique marine) du CNRC, à Ottawa (p. ex. HS-3, Cook et Wells, 1996 ; HS-6, Tay *et al.*, 1998). Ce pourrait aussi être un échantillon de *sédiment non contaminé* (p. ex. un *sédiment témoin négatif artificiel* ou un *sédiment de référence non contaminé* prélevé sur le terrain), enrichi, au laboratoire, d'un ajout dosé de *toxique* (EC, 1995b). Une troisième possibilité serait d'utiliser un échantillon fortement contaminé de sédiment prélevé sur le terrain, dont on aurait démontré la toxicité pour *V. fischeri* dans des essais en phase solide ; on évite cette option à moins de bien connaître d'avance les caractéristiques de ce sédiment (y compris

son comportement dans un essai en *phase solide* employant *V. fischeri*). On doit utiliser un *sédiment témoin positif* comme *toxique de référence* quand on évalue la sensibilité des organismes d'essai ainsi que la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire pour cette matière de référence (section 5).

4.5 Conditions d'essai

4.5.1 Grandes lignes de l'essai

L'essai de mesure de la toxicité d'échantillons de sédiment entier, en phase solide, comprend les étapes et l'appareillage décrit sommairement dans le § 3.2.2.

Le tableau 1 est la liste de contrôle des conditions exigées ou recommandées pour la *méthode de référence*. D'autres détails figurent dans les § 4.5.2 à 4.5.5.

4.5.2 Manipulations, réglages et corrections

- On ne doit pas soumettre les sédiments d'essai, y compris le ou les échantillons de *sédiment de référence* dont on recommande l'inclusion dans chaque série d'essais, au tamisage hydraulique. On n'autorise aucune correction de la salinité de l'eau de porosité⁷.
- On ne doit pas ajuster le pH des échantillons.
- On ne devrait pas aérer les échantillons, les solutions filles ou les filtrats.
- Il ne faut pas ajuster ou corriger les lectures de la bioluminescence

⁷ La préparation de séries de dilutions (solutions filles) au moyen du « *diluant en phase solide* » (solution de NaCl à 3,5%) [v. § 4.6.4], permet une correction osmotique efficace sur les échantillons de sédiment marin, estuarien ou d'eau douce.

correspondant aux concentrations des sédiments d'essai à l'aide de lectures relatives aux concentrations de sédiments de référence ou d'autres sédiments⁸.

- Il faut normaliser, compte tenu de l'humidité de l'échantillon, l'effet mesuré statistique de l'essai (c'est-à-dire la CI 50 ; v. § 6.1).

4.5.3 Température

- L'essai emploie la bactérie luminescente *Vibrio fischeri*, souche NRRL B-11177, que l'on réactive dans une eau pure et non toxique et que l'on conserve à $5,5 \pm 1,0$ °C, jusqu'au transvasement des aliquotes dans chaque solution fille. Normalement, on obtient cette température si on insère la cuvette renfermant la solution bactérienne reconstituée dans le puits indiqué du photomètre (si on utilise le modèle 500 de Microtox). Sinon, il faut employer un incubateur thermostaté.
- On doit faire incuber toutes les dilutions de chaque échantillon de sédiment d'essai (y compris le sédiment de référence) inoculées avec les bactéries pendant 20 min à $15 \pm 0,5$ °C. Un bain d'eau ou un local thermostaté ferait l'affaire.
- Après incubation et filtration, on doit garder à $15 \pm 0,5$ °C, pendant les 10 min que dure leur stabilisation, tous les filtrats des dilutions transvasés dans des cuvettes.

⁸ Dans un certain nombre d'essais de toxicité des sédiments en phase solide, actuels ou anciens, employant des bactéries luminescentes, on corrige l'effet de la couleur et/ou de la turbidité des sédiments en ajustant les valeurs de la bioluminescence en fonction de valeurs correspondantes obtenues avec le sédiment de référence (v. annexe E, tableaux 14 et 16). Cela suppose une correspondance étroite, mais problématique, de ces variables entre les sédiments d'essai et de référence.

Cette température est normalement maintenue dans les puits du photomètre. On peut aussi maintenir les filtrats dans cet intervalle de température en plaçant leurs cuvettes dans un portoir que l'on garde dans un incubateur ou un local thermostaté.

4.5.4 Durée des manipulations

- Les bactéries lyophilisées devraient être reconstituées immédiatement avant d'être inoculées dans les solutions filles. Cette solution bactérienne devrait être utilisée dans les deux heures suivant la reconstitution et doit l'être dans les trois heures. Le moment de la reconstitution devrait être enregistré sur la fiche de laboratoire (voir exemple, annexe F).
- Il faut laisser les solutions filles se stabiliser à $15 \pm 0,5$ °C pendant au moins 10 min avant l'inoculation avec la solution bactérienne. L'inoculation devrait se dérouler le plus vite possible : 4 min, au plus, pour toutes les dilutions d'essai. Sur la fiche de laboratoire (annexe F), enregistrer l'heure de la première inoculation comme heure de départ de l'essai.
- On doit laisser toutes les solutions filles incuber pendant 20 min. Une fois ces solutions filtrées et transvasées dans les cuvettes, les filtrats doivent être mis à incuber dans les cuvettes pendant 10 min avant d'en mesurer la production lumineuse⁹.
- La durée totale du transvasement des filtrats des cuvettes et la lecture de leur bioluminescence devrait être semblable à

⁹ Cela vise à stabiliser la température des solutions filles et les bactéries luminescentes après leur filtration, avant la photométrie de la bioluminescence.

Tableau 1 Liste de contrôle des conditions expérimentales exigées ou recommandées

Installations et équipement	— photomètre (p. ex. modèle 500 <i>Analyser</i> de Microtox ^{MD}) capable de lire l'émission lumineuse à 490 ± 100 nm ; incubateur pour une seule cuvette renfermant les bactéries reconstituées à $5,5 \pm 1$ °C ; pour au moins 15 cuvettes, à la température d'essai ($15 \pm 0,5$ °C), dans un incubateur ou dans un local thermostaté.
<i>Solution de reconstitution</i>	— eau pure, non toxique.
Eau témoin ou de dilution (« <i>diluant</i> »)	— solution de NaCl de 3,5%, du commerce (p. ex. de Strategic Diagnostics Inc.) ou préparée à l'aide de la <i>solution de reconstitution</i> .
Température de l'essai	— $15 \pm 0,5$ °C.
pH et salinité de l'échantillon	— pas d'ajustement.
Couleur, turbidité	— pas de correction.
Aération	— aucune nécessaire.
Sous-échantillons pour la détermination de la teneur en humidité	— 3 de $5,0 \pm 0,2$ g (précision, $\pm 0,01$ g) séchés à 100 ± 5 °C pendant 24 h.
Solution mère	— $7,00 \text{ g} \pm 0,05$ de sédiment homogénéisé entier dans 35,0 mL d'eau de dilution, dans un becher de verre ou de plastique jetable, mélangés pendant 10 min au moyen d'un barreau magnétique revêtu de téflon, à une vitesse telle que la profondeur du tourbillon est la moitié de celle du liquide.
Solutions filles (dilutions)	— Maximum normalement de 197 000 mg/L (19,7%, en poids de sédiment humide par rapport au volume), avec, en tout, 12 dilutions à la demie, dans des tubes de polystyrène ; trois solutions <i>témoins</i> (<i>diluant</i> seulement) ; laissées à équilibrer 10 minutes, à la température d'essai.
Espèce	— <i>Vibrio fischeri</i> , souche NRRL B-11177, reconstitué par tourbillonnement du flacon, trois ou quatre fois, dont on vide le contenu dans une cuvette de verre jetable, mélangé 10 fois avec le contenu d'une pipette de 0,5 mL et conservé à $5,5 \pm 1$ °C.
Inoculum	— 20 µL dans chaque dilution, mélangés trois fois avec le contenu d'une pipette de 1,5 mL.
Incubation	— 20 min à la température d'essai, les colonnes de filtration insérées au sommet des tubes d' <i>EPS</i> , au-dessus de la surface de la solution.
Transvasement du filtrat	— 500 µL dans des cuvettes de verre jetables, à la température d'essai, puis 10 min de repos.
Observations	— insertion des cuvettes dans le puits de lecture, mesure de la luminescence de tous les filtrats et témoins.
<i>Effet mesuré</i>	— CI50 (mg/L), calculée par le logiciel ou « à la main » ; normalisée compte tenu de l'humidité du sédiment (c'est-à-dire ramenée au poids du sédiment sec).
<i>Sédiment de référence</i>	— devrait faire partie de la série d'essais, en étant soumis aux mêmes modes opératoires que l'échantillon ou les échantillons du sédiment d'essai (contaminé ou susceptible de l'être).
Essai avec <i>toxique de référence</i>	— effectué moins d'un mois après l'essai de toxicité du sédiment en phase solide avec <i>V. fischeri</i> , en employant un <i>sédiment témoin positif</i> convenable ainsi que les modes opératoires et les conditions exposés dans le présent document, pour mesurer la toxicité du sédiment d'essai.

celle de l'inoculation bactérienne des solutions filles (≤ 4 min).

4.5.5 Tableau des dilutions

- Les solutions expérimentales comprennent trois témoins (eau de dilution uniquement) et 12 solutions filles (dilutions).
- La concentration maximale est normalement de 197 000 mg/L (19,7%, poids de sédiment humide en volume), chaque concentration successive étant la moitié de la précédente.

4.6 Modes opératoires

La méthode d'essai biologique comporte l'incubation simultanée d'au moins trois solutions témoins (constituées d'un inoculum de *V. fischeri* reconstitué dans le *diluant*) ainsi que de 12 dilutions différentes de la matière d'essai dans le *diluant*¹⁰. Après la période prescrite d'incubation, on filtre les solutions incubées (se trouvant dans les tubes à essai, à une température fixée) et les solution filles, puis on transvase les filtrats dans les cuvettes. Après une courte période de stabilisation des conditions de maintien des filtrats, on mesure par photométrie la bioluminescence des organismes subsistant dans le filtrat.

Dans la présente section, les modes opératoires appliqués à un photomètre présupposent l'emploi du modèle 500 de Microtox ou d'un photomètre possédant des

caractéristiques semblables. Comme le modèle 500 possède 30 puits pour conserver les cuvettes renfermant les filtrats des dilutions, le technicien a la possibilité de dédoubler l'essai ou d'effectuer deux essais simultanément sur des échantillons différents. La description qui suit du mode opératoire suit le parcours d'un échantillon de sédiment dans ses diverses étapes. Selon le plan de l'expérience et la nature ainsi que la source des sédiments d'essai, on devrait aussi inclure dans chaque étude un ou plusieurs échantillons de *sédiment de référence* prélevés sur le terrain (v. § 4.1 et 6.1). Les essais de toxicité comportant un ou plusieurs échantillons de sédiment grossier (c'est-à-dire moins de 20% de fines) doivent comprendre un *sédiment témoin négatif* (artificiel ou naturel) ou un *sédiment de référence*, dont le taux de fines ne diffère pas de plus de 30% du taux se trouvant dans le ou les sédiments d'essai (v. § 6.2). On recommande aussi l'inclusion d'un *sédiment témoin positif* (§ 4.4) dans chaque série d'essais de toxicité. Pour englober un ou plusieurs échantillons de *sédiment d'essai* en même temps qu'un *sédiment de référence*, un *sédiment témoin négatif* et/ou *sédiment témoin positif* dans une seule étude, il est nécessaire de passer chaque échantillon l'un après l'autre.

4.6.1 Photomètre, bain d'eau et fiche de laboratoire

- Mettre l'ordinateur, le photomètre et la balance sous tension.
- Dans le cas du modèle 500 de Microtox, s'assurer que la commande de la température derrière l'appareil est réglée à « Microtox Acute ».
- Insérer 15 cuvettes dans les trois premières rangées (A à C) de puits. Ceux-ci seront maintenus à $15 \pm 0,5$ °C. Les puits d'incubation sont disposés selon

¹⁰ Le modèle 500 possède 30 puits pour l'incubation des cuvettes à $15 \pm 0,1$ °C. Ce photomètre ou un photomètre thermostaté équivalent, à au moins 30 puits d'incubation, permet de passer simultanément deux échantillons. McLeay *et al.* (2001) préconisent ce mode opératoire, plus efficace, selon eux, pour analyser des échantillons multiples et économiser le plus de *réactif bactérien*.

une matrice de rangées étiquetées A à C et de colonnes numérotées 1 à 5. On les désigne A1 à C5.

- Insérer une cuvette dans le puits de réactif et y transvaser à la pipette 1,0 mL de *solution de reconstitution*. Cette solution sera maintenue à $5,5 \pm 1$ °C.
- Mettre sous tension l'incubateur du bain d'eau. Laisser la température de l'eau se stabiliser à $15 \pm 0,5$ °C.
- Brassier l'échantillon pour l'homogénéiser, à la cuillère d'acier inoxydable.
- Remplir la fiche de laboratoire (v. § 7.2.7 et l'annexe F). Placer 15 tubes d'*EPS* (v. annexe E, tableau 5) dans un portoir.

4.6.2 *Sous-échantillons pour la détermination de l'humidité*

- Pour chaque sédiment d'essai, étiqueter et peser trois flacons vides (p. ex. flacons de verre pour spectrométrie de scintillation, de 20 mL, ou autres récipients convenant au séchage et à la pesée) et en noter les poids à 0,01 g près. Saisir les données, si on emploie une feuille de calcul pour convertir la CI50 en une valeur basée sur le poids du sédiment sec (§ 6.1).
- Ajouter $5,0 \pm 0,2$ g de sédiment aux flacons et noter les poids à 0,01 g près (ou les saisir dans la feuille de calcul).
- Faire sécher les sous-échantillons en portant les flacons dans une étuve à 100 ± 5 °C pendant 24 h. Noter la température de l'étuve.
- Noter les poids secs à 0,01 g près.

4.6.3 *Solution mère*

- Peser $7,00 \pm 0,05$ g d'échantillon homogénéisé dans un becher de verre ou de plastique jetable de 50 mL.

- Ajouter une tige magnétique revêtue de téflon de 2,5 cm et 35,0 mL de « *diluant en phase solide* » au becher.
- Agiter 10 min sur un agitateur magnétique, à une vitesse suffisante pour créer un tourbillon dont la profondeur atteint la moitié de celle du liquide.

4.6.4 *Solutions filles*

- Verser 1,50 mL de « *diluant en phase solide* » (section 3) dans les 14 premiers tubes sur le portoir (§ 4.6.1). Le tube 15 renfermera la concentration maximale, provenant de la solution mère.
- À la fin des 10 min d'agitation de la solution mère, utiliser l'extrémité d'une macropipette à cône de grand calibre pour transvaser 1,50 mL de suspension du becher de 50 mL, dont on continue d'agiter le contenu, vers chacun des tubes d'*EPS* n^{os} 15 et 14. À cette fin, insérer plonger l'extrémité de la pipette près de la paroi du becher à environ la moitié de la profondeur de l'échantillon en train d'être agité. Éviter de colmater l'extrémité tout en aspirant l'échantillon.
- En commençant par le tube d'*EPS* 14, dans lequel se trouvent 3,00 mL de solution, effectuer une série de dilutions à la 1/2 comme suit : mélanger le contenu trois fois avec la macropipette, puis prélever rapidement 1,50 mL à environ un tiers de la profondeur (pour aider à prélever une partie des sables lourds). Transvaser cette aliquote dans le tube 13. Répéter l'opération de mélange et de transvasement du tube 13 au tube 12, puis poursuivre, à la suite, du 12 au 11, etc. jusqu'au transvasement de 1,5 mL d'une dilution à la 1/2 dans le tube 4. Enfin, mettre au rebut 1,5 mL du tube 4. Les tubes 1 à 3 ne renferment que du *diluant* et servent de témoins.

- Placer le portoir et ses tubes d'*EPS* renfermant toutes les solutions (dilutions) filles (y compris les témoins) dans le bain d'eau, à 15 ± 0.5 °C. Les laisser 10 min pour permettre à la température de s'équilibrer. Le niveau de l'eau dans le bain devrait se situer juste au-dessus du niveau du liquide dans les tubes d'*EPS*.

4.6.5 Reconstitution du réactif bactérien

- Prendre un flacon de bactéries lyophilisées (Microtox *Acute Reagent*) en entreposage.
- L'ouvrir et en reconstituer le contenu, en versant rapidement de la *solution de reconstitution* de la cuvette se trouvant dans le puits de réactif du modèle 500 de Microtox (ou d'un autre photomètre) dans le flacon, en faisant tourbillonner le contenu trois fois et en versant les bactéries réhydratées dans la même cuvette.
- Remettre la cuvette dans le puits de réactif.
- À l'aide d'une pipette de 500 µL, aspirer tout le *réactif bactérien reconstitué* du flacon, l'ajouter à la cuvette et mélanger 10 fois à l'aide de la même pipette et du même cône de pipette.
- Noter le numéro de lot du réactif, la date de péremption et l'heure de la reconstitution sur la fiche de laboratoire (v. § 7.2.7 et annexe F).

4.6.6 Inoculation et incubation

- Préparer les trois pipettes suivantes :
a) une pipette automatique (telle que la pipette Eppendorf ou Oxford Nichiryo), dotée d'une seringue de 0,5 mL de capacité à cône « ultramicro » ; *b)* une macropipette (p. ex. Oxford, de 1 à 5 mL) ; *c)* une pipette de 500 µL.

- Après équilibrage de la température pendant 10 min des tubes d'*EPS* renfermant les solutions filles (§ 4.6.4), régler un chronomètre à 20 min, mais sans le mettre en marche.
- S'assurer que la pipette automatique est réglée pour distribuer 20 µL par éjection. Placer le cône sous la surface de bactéries reconstituées (*réactif bactérien reconstitué*) et aspirer suffisamment de *réactif* pour au moins 18 éjections.
- En maintenant le cône au-dessus du *réactif* et contre la paroi de la cuvette, effectuer deux éjections. Essuyer soigneusement le cône avec une serviette de papier propre (p. ex. KimWipe^{MD}) après avoir aspiré le *réactif*. Plonger ensuite le cône dans un tube ou un becher renfermant du « *diluant en phase solide* » et effectuer une autre éjection (pour rincer l'extérieur du cône). Rejeter le contenu de ce tube ou de ce becher.
- Mettre en marche la minuterie réglée à 20 min, noter l'heure (ce sera l'heure de démarrage de l'essai) sur la fiche de laboratoire, puis éjecter immédiatement 20 µL de *réactif* dans chacun des tubes d'*EPS*, en débutant par le tube 1 (première solution témoin) et poursuivre, à la suite, jusqu'au tube 15 inclusivement. En appuyant le collier du cône « ultramicro » sur le rebord supérieur de chaque tube, on fait en sorte que le cône se trouve à la surface de l'échantillon et non au fond du tube.
- Enlever et mettre au rebut le cône « ultramicro ». Éjecter ce qui reste de *réactif* de la seringue dans la cuvette d'attente du puits de réactif.
- Si on est censé effectuer un second essai (c'est-à-dire soit avec un deuxième échantillon, soit un essai en double avec

le même échantillon), en même temps, dans les 15 puits restants du photomètre, fixer de nouveau un cône propre à la seringue, remplir cette dernière de *réactif*, puis inoculer la série suivante de solutions filles. Ce second essai (parallèle) peut être effectué avec soit un autre échantillon de *sédiment d'essai* (effectivement ou peut-être *contaminé*), de *sédiment de référence*, de *sédiment témoin négatif* ou de *sédiment témoin positif*.

- Avec la macropipette réglée à 1,5 mL, mélanger le contenu de chaque tube deux fois, en commençant par le tube 1 (premier témoin) et en passant consécutivement aux tubes suivants jusqu'au tube 15, inclusivement.
- Insérer une colonne de filtration (v. note 5, § 3.2.3) sur chaque tube, son extrémité inférieure étant positionnée à environ 1 cm au-dessus de la surface du liquide. Ne pas mouiller le filtre, ce qui pourrait nuire à la filtration de l'échantillon.

4.6.7 Préparation de l'ordinateur

- Préparer l'ordinateur à la réception des données du photomètre.
- Faire démarrer le progiciel et les menus pour l'essai en *phase solide*.
- Suivre les consignes à l'écran.
- Consulter le guide de l'utilisateur pour obtenir des renseignements complémentaires.
- Le logiciel pourrait demander la saisie du nombre de témoins (3), du nombre de dilutions (12), de la concentration initiale (197 000 mg/L), du coefficient de dilution (2) et de la durée de l'essai (30 min).

4.6.8 Filtration

- Au son de la minuterie réglée à 20 min, donner au logiciel les réponses convenables.
- Remettre la minuterie à 10 min et la déclencher. Avec le logiciel de Strategic Diagnostics Inc. (Omni^{MD} Version 1.18 ou l'équivalent), le démarrage est automatique. Sinon, programmer le logiciel pour qu'il fasse démarrer cette période de 10 min automatiquement, par l'action d'une touche sur le clavier.
- Pousser doucement le filtre dans le tube 1 (premier témoin) vers le bas, suffisamment loin pour obtenir légèrement plus de 500 µL de filtrat dans le tube. Puis, en utilisant la pipette de 500 µL, transvaser 500 µL de filtrat dans la cuvette se trouvant dans le puits A1 du photomètre.
- Répéter cette étape pour les 15 tubes, à l'aide du même cône de pipette, en terminant avec 500 µL de filtrat transférés du tube 15 à la cuvette C5.
- Prendre note du temps exigé pour terminer tous les transvasements.
- Souvent, quand on manipule des sédiments riches en *fines* , le filtre de la solution fille la plus concentrée (tube 15) se colmate. Obtenir ce qui peut être récupéré et le transvaser dans la cuvette désignée (C5). Habituellement, la luminescence de ces échantillons aura diminué à zéro avant la lecture de la concentration maximale. Signaler ce type de problème sur la fiche de laboratoire (v. § 7.2.7 et annexe F).
- À la fin de tous les transvasements, répondre à l'ordinateur, s'il y a lieu. Habituellement, cela nécessitera la photométrie de la luminescence (§ 4.8),

ce qui prendra à peu près le même temps qu'il a fallu pour la filtration et le transvasement des filtrats vers les cuvettes.

- Les données sont souvent envoyées du photomètre à l'ordinateur, étant reçues par le logiciel qui construit un fichier de données.

4.7 Mesures et observations

Consulter le § 4.3 pour connaître les exigences et les recommandations concernant la caractérisation des échantillons (p. ex. mesures de la granulométrie et d'autres caractéristiques physicochimiques de la matière d'essai).

Le mode opératoire de la mesure de la luminescence bactérienne dans les solutions filles varie selon le photomètre et le logiciel utilisés. Dans le cas du modèle 500 de Microtox, placer le premier témoin (cuvette A1) dans le puits de lecture, puis appuyer sur le bouton de réglage « *set* ». L'instrument abaisse la cuvette dans le puits (parfois 2 ou 3 fois) pour régler la lecture de zéro (obscurité) et du témoin à environ 95 et, de la sorte, établir la gamme convenable de sensibilité pour les mesures photométriques. Quand le voyant vert s'allume, appuyer sur le bouton de lecture « *read* ». Lire la cuvette, puis la retirer du puits de lecture et la

remettre dans le bloc d'incubation. Si le logiciel n'enregistre pas les données photométriques, les noter sur la fiche de laboratoire. Faire la lecture et l'enregistrement de la luminescence de toutes les cuvettes, en prenant à peu près le même temps par cuvette qu'il en a fallu pour la filtration et le transvasement (v. § 4.6.8). Avec le logiciel de Strategic Diagnostics Inc. (Omni^{MD} Version 1.18 ou l'équivalent), le minutage est effectué par l'ordinateur, et un signal indique le moment où on devrait lire chaque cuvette.

Si un problème survient, consulter les guides de l'utilisateur du photomètre et du logiciel utilisés.

4.8 Critère de validité de l'essai

Le critère suivant décide de la validité de l'essai de toxicité du sédiment effectué à l'aide de la présente *méthode de référence*¹¹ :

Le coefficient de variation représentant la lecture photométrique moyenne des filtrats des trois solutions témoins faisant partie de l'essai doit être inférieur ou égal à 12%.

¹¹ Ce critère s'inspire d'ASTM (1995) [v. annexe E, tableau 17).

Essai d'un toxique de référence

L'emploi systématique d'un toxique de référence est nécessaire pour évaluer, dans des conditions normalisées, la sensibilité relative des bactéries après reconstitution, l'exactitude des techniques de dilution et d'autres facteurs influant sur la précision et la fiabilité des données produites par le personnel de laboratoire employant la méthode de référence en phase solide (EC, 1992). Le ou les toxiques de référence doivent être testés au moins une fois par mois au cours des périodes où l'on exécute des essais de toxicité des sédiments en phase solide à l'aide de *V. fischeri* et au début de la première utilisation d'un nouveau lot ou d'un nouvel envoi de *réactif bactérien*.

Il faut utiliser comme toxique(s) de référence pour cette *méthode de référence* un ou plusieurs échantillons de *sédiment témoin positif* (v. § 4.4). Lorsque l'on effectue chaque *essai de toxicité de référence*, il faut suivre les modes opératoires et respecter les conditions d'essai définies dans les § 4.5 et 4.6.

Pour effectuer un essai de toxicité de référence conformément aux modes opératoires et aux conditions précisées dans la présente méthode, il est recommandé d'utiliser un *sédiment contaminé étalon* tel que la matière de référence de port marin du CNRC (Harbour Marine Reference Material, p. ex. HS-5 ou HS-6), que l'on peut se procurer auprès du CNRC¹². On peut aussi utiliser comme toxique de référence un

sédiment témoin enrichi après normalisation des modes opératoires convenables pour l'enrichissement. À cet égard, il faudrait consulter le guide d'Environnement Canada sur l'emploi d'un sédiment témoin enrichi d'un toxique de référence (EC, 1995b).

Pour les besoins de l'essai de toxicité de référence, on devrait choisir une série de concentrations qui, d'après des essais préliminaires ou des essais antérieurs réalisés dans les mêmes conditions et avec les mêmes modes opératoires, permettront de calculer une CI50 pour la luminescence de *V. fischeri* (v. § 6.1), avec des limites de confiance à 95% d'une étroitesse acceptable. Les concentrations choisies devraient encadrer la CI50 prédite.

Il revient au personnel de laboratoire de montrer qu'il est capable d'obtenir des résultats constants, précis, avec le toxique de référence avant d'effectuer des essais définitifs sur les sédiments à l'aide de la présente *méthode de référence*. À cette fin, il devrait d'abord déterminer la précision intralaboratoire, exprimée sous forme de pourcentage par un coefficient de variation (CV), en effectuant au moins cinq essais de toxicité de référence avec différents lots de *réactif bactérien* (§ 2.1), en utilisant le même toxique de référence et les modes opératoires et conditions définis dans le présent document. Cet essai devrait servir à acquérir l'expérience du mode opératoire et servir de point de comparaison pour les essais ultérieurs (EC, 1998). Tout en l'appliquant systématiquement à chaque lot de *réactif bactérien*, le personnel ne devrait pas s'écarter du mode opératoire. Dès que l'on possède des données suffisantes (EC, 1995b), il faut porter les CI50 successives

¹² Conseil national de recherches du Canada, Programme d'étalons de chimie analytique marine, Institut des biosciences marines, 1411, rue Oxford, Halifax, NS ; tél. : 902-426-8280 ; téléc. : 902-426-9413 ; courriel : crm.imb@nrc.ca.

déterminées grâce à ces essais sur une *carte de contrôle* propre à chaque toxique et déterminer graphiquement si les résultats se situent à moins de ± 2 écarts-types des valeurs obtenues dans les essais antérieurs employant le même toxique de référence et le même mode opératoire. Il faut construire puis actualiser une carte de contrôle pour chaque toxique de référence utilisé avec la présente *méthode de référence*. La carte de contrôle devrait montrer le logarithme de la concentration, sur l'axe vertical, en fonction de la date de l'essai ou du numéro de l'essai, sur l'axe horizontal. Chaque nouvelle CI50 correspondant au toxique de référence doit être comparée aux limites établies de la carte ; la CI50 est acceptable si elle se situe dans la *zone de confiance*. Tous les calculs de la moyenne et de l'écart-type devraient employer le logarithme de la CI50 (*log CI50*).

Tous les calculs de la moyenne et de l'écart-type et tous les graphiques devraient employer le logarithme de la concentration (y compris de la CI50). On adhère ainsi simplement à l'hypothèse selon laquelle chaque CI50 a été estimée à partir de logarithmes de concentrations. On peut construire la carte de contrôle par report des valeurs logarithmiques de la moyenne (\bar{x}) ± 2 écarts-types (σ) sur papier arithmétique ou par conversion de ces valeurs en valeurs arithmétiques et report de ces dernières sur l'échelle logarithmique de papier semi-logarithmique. Si la distribution des CI50 se trouvait à ne pas être log-normale, la moyenne et l'écart-type arithmétiques pourraient se révéler plus convenables. On devrait recalculer la moyenne des *log (CI50)* obtenues ainsi que les limites supérieures et inférieures de la zone de confiance ($\pm 2 \sigma$) à chaque CI50 successive jusqu'à ce que les statistiques se

stabilisent (EC, 1995b ; 2002b).

Si une CI50 particulière tombe à l'extérieur de la zone de confiance, on devrait s'interroger sur la sensibilité des organismes ainsi que sur la réalisation et la précision de l'essai. Comme elle risque de survenir 5% du temps, du seul fait du hasard, une CI50 aberrante ne traduit pas nécessairement une sensibilité anormale du lot de *réactif bactérien* ou une précision insatisfaisante des données toxicologiques. Ce serait plutôt un avertissement qu'il pourrait y avoir un problème. On devrait vérifier en profondeur toutes les conditions et tous les modes opératoires de l'essai. Selon les conclusions auxquelles on arriverait, il pourrait être nécessaire de répéter l'essai de toxicité de référence ou d'obtenir un nouveau lot de *réactif bactérien* pour évaluer la toxicité des échantillons de la matière d'essai (en même temps qu'on effectuerait un nouvel essai de toxicité de référence avec le nouveau lot d'organismes).

Les résultats cantonnés à l'intérieur des limites de confiance ne signifieraient pas nécessairement que les résultats du laboratoire sont cohérents. La grande variabilité des données relatives à un toxique de référence se traduirait par l'élargissement de la zone de confiance ; une nouvelle donnée pourrait se trouver à l'intérieur de cette zone tout en représentant un écart indésirable. Environnement Canada (1995b) propose comme limite raisonnable un coefficient de variation de pas plus de 30%, de préférence de 20% ou moins. Pour la présente *méthode de référence*, le coefficient de variation des moyennes des résultats des essais de toxicité de référence effectués dans un laboratoire d'essai ne devrait pas excéder 30%.

Analyse et interprétation des données

6.1 Analyse des données

Il faut calculer la moyenne et l'écart-type des lectures de la bioluminescence des solutions témoins utilisés dans l'étude (v. § 4.6.4, 4.7 et 4.8). Ces valeurs servent à calculer le coefficient de variation de la moyenne des lectures faites sur les solutions témoins. Ce coefficient sert de critère à la présente méthode pour juger de la validité des résultats expérimentaux (§ 4.8).

Une étude effectuée selon la présente *méthode de référence* devrait englober au moins un échantillon du *sédiment d'essai* (effectivement ou potentiellement contaminé) ainsi qu'au moins un échantillon de *sédiment de référence*. En outre, on recommande l'inclusion d'au moins un échantillon de *sédiment témoin positif* (v. § 4.4 et section 5). Les essais employant au moins un échantillon de sédiment grossier (c'est-à-dire renfermant moins de 20% de fines) doivent aussi englober au moins un échantillon de *sédiment témoin négatif* (artificiel ou naturel) ou de *sédiment de référence non contaminé*, dont la teneur en fines ne diffère pas de plus de 30% de celle que l'on trouve dans ce sédiment grossier (v. § 6.2). Dans chaque cas, le paramètre statistique à calculer pour chacune de ces matières d'essai, est la *Clp*.

Sauf indication du contraire, dans le règlement ou à dessein, l'effet ou paramètre mesuré est, dans la présente *méthode de référence*, la concentration inhibant de moitié la bioluminescence, c'est-à-dire la CI50. Les calculs pour estimer cette CI50 et ses limites de confiance de 95% font partie des versions les plus récentes (à partir de 1999) des progiciels Omni^{MD} (version 1.18 ou l'équivalent) auparavant commercialisés par

AZUR Environmental Ltd., maintenant par Strategic Diagnostics Inc. (coordonnées dans le § 2.2)¹³. On trouve aussi des orientations pour estimer la CI50 (ainsi que ses limites de confiance à 95 %) dans Environnement Canada (1992). Il existe d'autres progiciels de statistique permettant ce calcul (EC, 1997b ; 1997c ; 2002b).

Si l'on ne possède ni ordinateur ni logiciel convenable, on peut calculer la CI 50 à l'aide de l'une des deux équations et approches suivantes.

Pour chaque solution fille, on calcule *gamma* (Γ) [ASTM, 1995], comme suit :

$$\Gamma = (I_t/I_e) - 1$$

où : I_t = la valeur moyenne des lectures des filtrats des solutions *témoins* ;

I_e = la lecture photométrique d'un filtrat d'une solution fille (*e* = *essai*) particulière.

Sur un graphique, on reporte à la main les valeurs *gamma* de chaque filtrat situées entre 0,02 et 200, et on relie ces points par une courbe ajustée à l'œil. On interprète la CI50 comme la concentration correspondant au

¹³ En 1999, AZUR a lancé un logiciel d'exploitation appelé «Microtox Omni», comprenant le calculateur «AutoCalc». Il faut prendre l'option «AutoCalc On» dans l'application du logiciel, sous peine d'obtenir des résultats erronés. *AutoCalc* ne choisit que les données entourant les CI50 possédant un Γ se situant dans l'intervalle de 0,02 à 200. Il examine, en employant ces données, toutes les séries contiguës, par analyse de régression par convergence itérative, afin de déterminer les limites de la zone la plus étroite de confiance.

gamma de 1,0. On devrait vérifier les points reportés à la main à l'aide des lectures observées, pour éliminer les erreurs de saisie ou les anomalies d'estimation de la CI50. On devrait aussi vérifier le graphique tracé à la main et la CI50 estimée graphiquement au moyen d'un graphique tracé par ordinateur et le calcul informatique de la CI50 (EC, 1992).

On peut aussi calculer la régression linéaire de $\log C$ (concentration, sur l'axe des ordonnées) en fonction de $\log \Gamma$ (sur l'axe des abscisses) conformément à la formule de l'ASTM (1995) :

$$\log \Gamma = b (\log C) + \log (a)$$

où b est la pente, tandis que $\log (a)$ est le point où la droite de régression coupe l'axe des ordonnées (axe des y) à $\log \Gamma = 0$, correspondant à $\Gamma = 1$. En conséquence, a correspondant à $10^{\log(a)}$ est la CI50.

La CI50 et ses limites de confiance doivent être converties et exprimées en milligrammes de sédiment sec par litre (mg/L). À cette fin, on utilise les données relatives au « poids sec » (v. § 4.6.2) [ASTM, 1995]. On multiplie la CI50 (et les limites supérieures et inférieures de confiance) du sédiment humide par la moyenne des rapports de la masse sèche à la masse humide des sous-échantillons :

$$CI50 = CI50_h \times [(S1_s/S1_h) + (S2_s/S2_h) + (S3_s/S3_h)]/3$$

où : $CI50_h$ est la CI50 calculée (ou ses limites de confiance à 95%) de l'échantillon de sédiment *humide* ;

$S1_s$ à $S3_s$ sont les poids *secs* des sous-échantillons de sédiment du § 4.6.2 ;

$S1_h$ à $S3_h$ sont les poids *humides* correspondants.

On peut accélérer ces calculs en saisissant les masses et les CI50 dans une feuille de calcul et en employant les formules nécessaires.

Pour obtenir des orientations détaillées sur les effets statistiques convenables à mesurer et leur calcul, on devrait consulter Environnement Canada (2002b). Les objectifs de l'analyse des données sont les suivants : quantifier les effets du contaminant sur les organismes exposés à divers échantillons de sédiment d'essai (effectivement ou potentiellement contaminé) ; déterminer si ces effets sont statistiquement différents de ceux qui se manifestent dans un *sédiment de référence* ; prendre une décision relativement à la toxicité de l'échantillon (§ 6.2). On calcul d'abord la *Clp* (normalement la CI50) pour chacun des échantillons (y compris ceux qui représentent le *sédiment de référence* prélevé sur le terrain).

Selon le plan d'expérience et les objectifs de l'étude, on devrait prélever et tester un nombre convenable (typiquement au moins cinq par station, à chaque profondeur à laquelle on s'intéresse) d'échantillons *réitérés* de sédiments *d'essai* et *de référence* prélevés sur le terrain (v. § 4.1). Chaque série d'essais de toxicité doit comprendre au moins trois répétitions de solutions témoins (v. § 4.6 et 4.8), et au moins un *sédiment d'essai*. Le sédiment d'essai pourrait être représenté par des échantillons *réitérés* de déblais de dragage provenant d'une profondeur ou d'une station donnée (station d'échantillonnage) à laquelle on s'intéresse, ou des échantillons *réitérés* de sédiment prélevés sur le terrain, dans une station donnée, située dans un lieu d'immersion en mer ou contiguë. Le sédiment d'essai pourrait aussi être représenté par au moins un sous-échantillon (c'est-à-dire

des répétitions de laboratoire) d'un échantillon unique (non réitéré) de sédiment provenant d'une station d'échantillonnage donnée ou d'une profondeur particulière d'un emplacement donné (v. § 4.1). On devrait utiliser le même nombre de répétitions pour chaque variante (chaque sédiment d'essai provenant d'une profondeur donnée dans une station particulière d'échantillonnage) et de chaque échantillon, dans l'essai, chaque fois que c'est possible, pour maximiser la puissance et la robustesse statistiques (EC, 2002b).

6.2 *Interprétation des résultats*

L'interprétation des résultats ne relève pas nécessairement du seul personnel du laboratoire entreprenant l'essai. Ce pourrait être une tâche partagée avec, notamment, un consultant en environnement ou d'autres personnes compétentes, chargées de l'examen et de l'interprétation des constatations.

Environnement Canada (1999b) donne des conseils utiles pour l'interprétation et l'application des résultats des essais de toxicité employant des échantillons prélevés dans l'environnement. C'est un document à consulter. Au départ, le chercheur devrait examiner les résultats et déterminer s'ils sont valides. Ils doivent satisfaire au critère de validité de l'essai (v. § 4.8). En outre, il est recommandé d'examiner la courbe de la relation entre la dose et la réponse de chaque échantillon du sédiment d'essai, afin de confirmer que la bioluminescence est à peu près directement proportionnelle à la dilution. Sinon (p. ex. si une ou plusieurs données semblent aberrantes par rapport aux autres), on devrait envisager de répéter l'essai pour cet échantillon.

On devrait tenir compte des constatations découlant de l'essai de toxicité de référence réalisé avec le même lot de *réactif bactérien*

que celui de l'essai de toxicité du sédiment (v. section 5) pour l'interprétation de l'étude. Ces résultats, lorsqu'on les compare aux résultats antérieurs du laboratoire avec le même toxique de référence et le même mode opératoire (c'est-à-dire à la carte de contrôle du laboratoire établie pour cet essai de toxicité de référence), donneront une idée de la sensibilité des organismes d'essai de même que de la précision et des performances du laboratoire dans la réalisation d'un essai de toxicité de référence avec *V. fischeri*.

On devrait prendre en considération toutes les données représentant les caractéristiques physicochimiques connues de chaque échantillon de la matière d'essai (y compris de tout échantillon de *sédiment de référence* ou de *sédiment témoin négatif* englobé dans l'étude) dans l'interprétation des résultats. On devrait comparer les données de l'analyse du sédiment entier et de l'eau de porosité (v. § 4.3) à l'influence connue de ces variables sur la production lumineuse de *V. fischeri*.

Dans les échantillons de déblais de dragage ou de sédiment prélevés sur le terrain, les concentrations d'ammoniaque et/ou de sulfure d'hydrogène dans l'eau de porosité peuvent être élevées. Ce pourrait être attribuable à un apport organique d'origine naturelle, anthropique ou les deux. On devrait tenir compte de l'effet inhibiteur connu de l'ammoniaque (v., par exemple, Tay *et al.*, 1998 et McLeay *et al.*, 2001) et du sulfure d'hydrogène (Brouwer et Murphy, 1995 ; Tay *et al.*, 1998) sur la bioluminescence de *V. fischeri*, de même que des concentrations mesurées de ces composés dans l'eau de porosité des échantillons d'essai, lorsque l'on examine et interprète les résultats obtenus sur des échantillons de sédiments d'essai et de référence prélevés sur le terrain.

Dans l'examen et l'interprétation des résultats des essais, on devrait prendre en

considération les observations de filtrats troubles ou fortement colorés que l'on aura analysés pour déterminer la bioluminescence *V. fischeri* (v. § 4.8).

Outre la toxicité, un certain nombre de variables peuvent gêner les résultats de la photométrie de la bioluminescence de *V. fischeri* survivant dans le filtrat de chaque solution fille et d'ainsi confondre l'interprétation des résultats. Les personnes employant cette *méthode de référence*, et celles qui en interprètent les résultats devraient être sensibles à ces facteurs de confusion et à leurs conséquences avant de décider si les matières d'essai sont toxiques ou non. Les variables qui peuvent gêner la luminescence de *V. fischeri* dans les filtrats sont notamment (ASTM, 1995 ; Ringwood *et al.*, 1997 ; Tay *et al.*, 1998) :

- la sorption de *V. fischeri* aux particules de sédiment (plus particulièrement aux particules fines) retenues par le filtre, qui réduit le passage de ces bactéries luminescentes dans le filtrat ;
- la sorption de *V. fischeri* sur le filtre, qui réduit de même le passage des bactéries dans le filtrat ;
- l'interférence optique du filtrat, en raison de sa couleur (absorption lumineuse) et/ou de sa turbidité (dispersion lumineuse) ;
- le ralentissement du métabolisme de *V. fischeri* passé et survivant dans le filtrat, en raison de la toxicité et/ou du stress dû aux manipulations et du stress mécanique.

La taille des grains des sédiments peut être un facteur de confusion important, puisqu'un pourcentage croissant d'argile dans la matière d'essai s'est révélé causer une diminution proportionnelle des CI50 pour *V. fischeri* récupéré dans des filtrats de sédiment non

contaminé. Dans un essai en phase solide employant *V. fischeri*, les échantillons de sédiment non contaminé, constitués principalement de sables, (p. ex. 0–5% de fines) ont donné de façon caractéristique une CI50 de 28 000, à moins de 100 000 mg/L (Cook et Wells, 1996 ; Ringwood *et al.*, 1997 ; Tay *et al.*, 1998). Les CI50 présentent une chute brusque (Benton *et al.*, 1995 ; Ringwood *et al.*, 1997) lorsque le pourcentage de fines dans le sédiment non contaminé passe de 5 à environ 20%, alors que la CI50 pourrait varier de, disons, 5000 à 15 000 mg/L, selon la nature des fines (p. ex. pourcentage d'argiles et de limons) [Ringwood *et al.*, 1997 ; Tay *et al.*, 1998 ; McLeay *et al.*, 2001]. Des taux supérieurs de fines dans le sédiment non contaminé se traduisent typiquement par une stabilisation de la baisse des CI50 associées à l'augmentation du taux de fines. Les essais en phase solide avec *V. fischeri* en présence de 100 % de kaolin se seraient traduits par des CI50 variant de 1373 à 2450 mg/L (Ringwood *et al.*, 1997 ; Tay *et al.*, 1998). Dans une étude interlaboratoires visant à valider cette *méthode de référence*, les CI50 obtenues par un échantillon de kaolin à 100% ont varié de 1765 à 2450 mg/L (McLeay *et al.*, 2001). Ensemble, ces conclusions appuient les nouvelles lignes directrices provisoires, exposées plus loin, pour décider si les échantillons sont toxiques ou non, conformément à l'essai en phase solide employant *V. fischeri*. Ces nouvelles lignes directrices tiennent compte : du taux de fines dans le sédiment d'essai ; de la brusque inflexion des valeurs lorsque la teneur en fines du sédiment d'essai atteint ou excède 20% (Ringwood *et al.*, 1997) ; de la capacité d'une prise d'essai constituée à 100% d'argile d'abaisser la CI50 à 1765 mg/L, à peine, d'après la présente *méthode de référence* (McLeay *et al.*, 2001).

Dans les alinéas qui suivent, il sera question de deux lignes directrices provisoires pour

décider de la toxicité des échantillons dans un sédiment d'essai, d'après la présente *méthode de référence*. La première, qui a été recommandée et appliquée par Environnement Canada (EC, 1996b ; Porebski et Osborne, 1998), se fonde sur la prémisse selon laquelle tous les échantillons sont toxiques selon la présente méthode d'essai biologique si leur CI50 est inférieure à 1000 mg/L, quelle que soit la granulométrie. La seconde se fonde sur la prémisse selon laquelle les échantillons dont le taux de fines est inférieur à 20% pourraient être toxiques à une CI50 d'au moins 1000 mg/L, vu que les facteurs de confusion de la granulométrie sont sensiblement diminués dans un sédiment grossier.

La première ligne directrice devrait s'appliquer à tous les échantillons de sédiment d'essai dont le taux de fines est d'au moins 20%, de même qu'à tout échantillon renfermant moins de 20% de fines et donnant une CI50 de moins de 1000 mg/L. La seconde devrait s'appliquer à tous les échantillons de sédiment d'essai ayant un taux de fines de moins de 20%, dont la CI50 est d'au moins 1000 mg/L. Si l'on applique cette seconde ligne directrice provisoire aux échantillons de sédiment ayant un taux de fines inférieur à 20% et une CI50 d'au moins 1000 mg/L, on peut reconnaître comme toxiques les sédiments grossiers lorsque leur CI50 est sensiblement supérieure à 1000 mg/L. Il est recommandé d'appliquer la seconde ligne directrice à chaque échantillon de sédiment d'essai dont le taux de fines est inférieur à 20%, sauf si la CI50 est inférieure à 1000 mg/L, auquel cas l'échantillon devrait être considéré comme toxique, et la seconde ligne directrice ne s'applique pas.

Ligne directrice 1

Le sédiment d'essai prélevé dans une station et à une profondeur données est considéré comme toxique si, quelle que

soit sa granulométrie, sa CI50 est inférieure à 1000 mg/L.

Ligne directrice 2

Le sédiment d'essai prélevé dans une station et à une profondeur données, dont le taux de fines est de moins de 20% et dont la CI50 est d'au moins 1000 mg/L, doit être comparé, quant à sa CI50, à un échantillon de sédiment de référence non contaminé ou de sédiment témoin négatif (artificiel ou naturel) dont le taux de fines ne diffère pas de plus de 30% du sien¹⁴. D'après cette comparaison, il est toxique si, et seulement si, il remplit les deux conditions suivantes :

- (1) *sa CI50 est inférieure à la moitié de celle de l'échantillon du sédiment de référence ou du sédiment témoin négatif¹⁵ ;*

¹⁴ Voici deux exemples pour montrer comment doit s'appliquer ce critère obligatoire lorsque l'on choisit un sédiment témoin négatif ou un sédiment de référence dont le taux de fines ne s'écarte pas de plus de 30 % de celui du sédiment d'essai : si le taux de fines du sédiment d'essai est de 10%, il doit, dans le sédiment de référence ou le sédiment témoin négatif, varier dans la fourchette de 7 à 13% ; de même, s'il est de 5% dans le sédiment d'essai, sa fourchette dans le sédiment de référence ou le sédiment témoin négatif doit varier entre 3,5 et 6,5%.

¹⁵ Ce critère découle des constatations faites à la faveur de deux séries d'études interlaboratoires effectuées pour valider la présente *méthode de référence* (McLeay *et al.*, 2001). Dans une série d'essais avec quatre sous-échantillons identiques d'un sédiment contaminé, testés au cours d'essais séparés par chacun des six laboratoires participants, la CI50 minimale d'un laboratoire était inférieure de 14 à 48% (écart moyen interlaboratoires, 31% ; $n = 6$) à la CI50 maximale. Vu la grande variabilité intralaboratoire des CI50 du même sédiment d'essai, on juge prudent de poser, comme un des critères de toxicité d'un échantillon de sédiment grossier, que sa CI50, si elle est d'au moins 1 000 mg/L, soit inférieure de plus de 50% à celle du sédiment témoin négatif ou du sédiment de référence de comparaison.

(2) sa CI50 et celle du sédiment de référence ou du sédiment témoin négatif diffèrent sensiblement.

Pour ce qui concerne la ligne directrice 2 et la présente *méthode de référence*, « fines » s'entend de particules (de sédiments) qui ont au plus 0,063 mm de diamètre, c'est-à-dire tous les limons (de 0,004 mm à 0,063 mm) et argiles (de moins de 0,004 mm).

On vérifie s'il est satisfait à la première condition de la ligne directrice 2 à l'aide des exemples suivants de calcul : si la CI50 de l'échantillon de sédiment de référence ou de sédiment témoin négatif utilisé pour juger de la toxicité du sédiment d'essai grossier est de 20 000 mg/L, celle du sédiment d'essai doit être inférieure à 10 000 mg/L. De même, respectivement, si elle est de 5 050 mg/L, la CI50 du sédiment d'essai doit être de moins de 2 025 mg/L.

Il faut éprouver la deuxième condition de la ligne directrice 2, afin de voir si elle est satisfaite par la comparaison, par paires, des valeurs de deux CI50 et de leurs limites de confiance à 95 %, décrite dans Sprague et Fogels (1977), comme moyen de comparer deux CL50¹⁶. Lorsque l'on cherche une différence significative, $p < 0,05$ doit servir comme seuil de distinction de l'effet.

¹⁶ Le test de comparaison par paires, exposé par Sprague et Fogels (1977), conviendrait aussi à la comparaison de deux CI50 (J. B. Sprague, communication privée, septembre 2001, Sprague Associates Ltd., Saltspring Island [C.-B.]). Une feuille de calcul électronique créée par le Centre des sciences de l'environnement du Pacifique d'Environnement Canada (CSEP, North Vancouver) facilite cette comparaison statistique. On peut obtenir copie de cette feuille de calcul, soit du CSEP, soit du Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique d'Environnement Canada (CSEA), à Moncton, en s'adressant soit à C. Buday, soit à K. Doe, dont les coordonnées sont fournies dans l'annexe D.

Renseignements à fournir dans les rapports

Le cas échéant, le procès-verbal de l'essai doit signaler et décrire dans le détail tout écart survenu par rapport à l'une des obligations exposées dans les sections 2 à 6 de la présente *méthode de référence*. La lecture du procès-verbal de l'essai doit permettre d'établir si les conditions et modes opératoires ayant précédé ou accompagné l'essai en ont rendu les résultats valides et acceptables pour l'usage auquel ils étaient destinés.

Le § 7.1 énumère les rubriques devant faire partie de chaque procès-verbal d'essai. Le § 7.2 énumère les rubriques devant soit figurer dans le procès-verbal, soit être présentées dans un rapport général, soit être archivées pendant au moins cinq ans. Des programmes de *surveillance* ou des règlements particuliers pourraient exiger l'inclusion, dans le procès-verbal de l'essai, de certains renseignements propres à l'essai et énumérées dans le § 7.2 (p. ex. des détails concernant la matière d'essai et/ou des modes opératoires et des conditions explicites au cours du prélèvement des échantillons, de leur manipulation, de leur transport et de leur entreposage) ou ils pourraient faire en sorte qu'ils fassent partie des *données à archiver*.

On peut renvoyer aux modes opératoires et aux conditions communs à une série d'essais permanents (p. ex. essais de toxicité effectués de façon systématique pour les besoins de la surveillance ou de la *conformité*) et compatibles avec les spécifications exposées dans la présente méthode, soit par référence, soit en joignant un rapport général exposant la pratique normale du laboratoire.

On devrait conserver pendant au moins cinq ans les détails concernant la conduite de

l'essai et ses constatations, qui ne sont pas présentés dans le procès-verbal de l'essai ni dans un rapport général, pour que l'information appropriée puisse être produite si un audit ou une vérification de l'essai est demandé. L'information archivée pourrait comprendre les éléments suivants :

- l'enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons prélevés sur le terrain ou des autres échantillons analysés pour les besoins d'un règlement ou de la surveillance ;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons ;
- les données d'analyse chimique de l'échantillon ou des échantillons qui ne font pas partie du procès-verbal de l'essai ;
- les fiches de laboratoire concernant les observations et les mesures enregistrées au cours de l'essai ;
- les fiches de laboratoire et les cartes de contrôle des essais de toxicité de référence ;
- les enregistrements détaillés de l'origine des organismes ayant servi à l'essai, de leur numéro de lot, de leur date de péremption, du ou des essais de toxicité de référence effectués à l'usine, la date de réception et la température d'entreposage ou d'entretien ;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des appareils.

L'original des feuilles de données doit être signé ou paraphé et daté par le personnel de laboratoire ayant effectué les essais.

7.1 Exigences minimales pour le procès-verbal de l'essai

On trouvera dans les paragraphes qui suivent l'énumération des rubriques qui doivent faire partie du procès-verbal de chaque essai.

7.1.1 Matériel d'essai

- Courte description du type d'échantillon (p. ex. déblais de dragage, *sédiment de référence*, sédiment effectivement ou potentiellement contaminé, prélevé sur le terrain, *sédiment témoin négatif* ou *sédiment témoin positif*) ou code de l'échantillon fourni au personnel du laboratoire.
- Renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon.
- Date du prélèvement et de réception de l'échantillon ou des échantillons au laboratoire.

7.1.2 Organismes d'essai

- Nom de l'espèce, de la souche, numéro du lot et date de péremption.

7.1.3 Installations et appareillage d'essai

- Nom et adresse du laboratoire d'essai.
- Nom de la personne ou des personnes effectuant l'essai.
- Nom et numéro de modèle du photomètre.

7.1.4 Solution de reconstitution et « diluant en phase solide »

- Type et source.

7.1.5 Méthode d'essai

- Mention de la méthode d'essai biologique utilisée (c'est-à-dire la présente méthode).

- Mention et nom du ou des programmes et méthodes de calcul de l'effet mesuré statistique.

7.1.6 Conditions de l'essai et modes opératoires

- Le cas échéant, préparation et description de toute non-application des modes opératoires et des conditions précisés dans le présent document et de tout écart par rapport à eux.
- Nombre d'échantillons discrets par variante ; nombre de répétitions (le cas échéant) pour chaque variante ; nombre et description des variantes faisant partie de chaque essai, y compris les solutions témoins, le ou les *sédiments témoins positifs* et le ou les *sédiments de référence* prélevés sur le terrain.
- Date de réalisation de l'essai.
- Pour chaque échantillon, le taux de sédiment très grossier (c'est-à-dire de particules de plus de 1,0 mm), de sables, de fines, le pourcentage d'eau, la teneur en carbone organique total ; la salinité, le pH et la teneur en ammoniacque de l'eau de porosité.
- Le cas échéant, mention que des échantillons du sédiment d'essai (y compris du sédiment de référence) ont subi un tamisage sous pression, pour les débarrasser des particules, détritiques ou organismes indigènes de grande taille, y compris le mode opératoire utilisé et la taille des ouvertures du tamis.
- Aspect (couleur, turbidité) des filtrats dans les cuvettes, à chaque concentration (variante).

7.1.7 Résultats des essais

- Résultats de la lecture de la bioluminescence (moyenne, écart-type, coefficient de variation) dans les multiples solutions témoins.
- Les CI50 et leurs limites de confiance à 95%, ainsi que la méthode de calcul et les unités (mg/L), avec trois chiffres significatifs¹⁷.
- Tous les résultats statistiques des comparaisons, par paires ou autrement, des valeurs de l'effet mesuré.
- Déclaration selon laquelle le sédiment d'essai est considéré ou non comme toxique, y compris la description des lignes directrices ayant permis cette conclusion.
- Les résultats pour chaque CI50 (y compris ses limites de confiance à 95%) du ou des toxiques de référence analysés avec le même lot de *réactif bactérien* que celui qui a été utilisé dans l'essai de toxicité du sédiment, à moins d'un mois de l'essai et lorsque le lot a été éprouvé pour la première fois ; la valeur de la *moyenne géométrique* ($\pm 2 \sigma$) pour le ou les toxiques de référence, calculée antérieurement au laboratoire.
- Toute circonstance inhabituelle au sujet de l'essai, tout écart par rapport aux modes opératoires et aux conditions décrits, toute difficulté observée, toute solution appliquée.

7.2 Rubriques supplémentaires à communiquer

Dans les paragraphes qui suivent, on énumère les rubriques devant faire partie soit du procès-verbal de l'essai, soit du rapport général, ou être archivées pendant au moins cinq ans.

7.2.1 Matériel d'essai

- Nom du ou des préleveurs et/ou des fournisseurs de l'échantillon ou des échantillons.
- Enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons et fiches d'inscription.
- Conditions (p. ex. température, obscurité ou non, récipient étanche) dans lesquelles le ou les échantillons ont été reçus et entreposés.

7.2.2 Organismes d'essai

- Source, numéro du lot, date de péremption, essai(s) de toxicité de référence en usine, date de réception, température au cours de l'entreposage ou de l'entretien.

7.2.3 Installations d'essai et appareillage

- Description de l'expérience que possède le laboratoire de cette *méthode de référence*.
- Description des systèmes d'éclairage et de régulation de la température au cours de l'incubation des solutions filles.
- Description des enceintes d'incubation (c'est-à-dire des tubes à essai) et de stabilisation puis de lecture photométrique (c'est-à-dire des cuvettes).

¹⁷ On doit signaler les CI50 inférieures à la concentration fille minimale (c'est-à-dire à 96,3 mg/L) comme suit : « < 96,3 mg/L » ; celles qui sont supérieures à la concentration maximale (c'est-à-dire à 197 000 mg/L) comme suit : « > 197 000 mg/L ».

- Description des pipettes et des cônes jetables utilisés pour préparer et transvaser les solutions filles.
- Description et compte rendu de l'étalonnage de la balance utilisée pour peser les sédiments.
- Température de l'étuve utilisée pour sécher les sous-échantillons de sédiments.
- Description des filtres jetables.
- Description des modes opératoires utilisés pour nettoyer et rincer l'appareillage d'essai.

7.2.4 Solution de reconstitution et « diluant en phase solide »

- Types et quantités de toute substance chimique ajoutée à la *solution de reconstitution* ou au *diluant*.
- Résultats des essais pour confirmer qu'aucune de ces solutions n'inhibe la bioluminescence de *V. fischeri*.
- Conditions d'entreposage et date de péremption (ou date de préparation).

7.2.5 Méthode d'essai

- Méthodes utilisées (avec références) pour les analyses chimiques de la matière d'essai (sédiment et eau de porosité) ; y compris des détails concernant le prélèvement, la préparation et la conservation des aliquotes avant analyse.

7.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La température, contrôlée dans le bain d'eau au cours de l'incubation des solutions filles.
- La température contrôlée dans le photomètre, au cours du maintien du *réactif reconstitué* et des filtrats.
- Mesure des concentrations de substances chimiques dans les matières d'essai et les solutions filles, autres que celles qui sont mentionnées dans le procès-verbal de l'essai.

7.2.7 Résultats de l'essai

- Enregistrements de la présence d'organismes indigènes dans chaque échantillon de sédiment de référence et d'essai prélevé sur le terrain, leur élimination manuelle ou par tamisage sous pression et leur description, notamment le type (famille, genre, espèce ?) et la taille approximative ainsi que le nombre par unité de volume d'échantillon, s'il est connu.
- Carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les résultats antérieurs d'essais de toxicité effectués avec un ou des toxiques de référence.
- Originaux des fiches de laboratoire (v. p. ex. l'annexe F) et de toute autre feuille de transmission de données, signés et datés par le personnel du laboratoire effectuant l'essai et les analyses connexes.

Références

- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation), « Toxicity », Part 8000, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19^e éd., APHA, AWWA et WEF, Washington, DC (1995).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Luminescent Bacteria », ébauche 8, ASTM, Philadelphie, PA (1995).
- AZUR, « Basic Solid-Phase Test », ébauche 6–11–96, 4 p., AZUR Environmental, Carlsbad, CA (1997).
- . « Basic Solid-Phase Test (Basic SPT) », 16 p., AZUR Environmental, Carlsbad, CA (1998a).
- . « Solid-Phase Test (SPT) », 19 p., AZUR Environmental, Carlsbad, CA (1998b).
- Benton, M.J., M.L. Malott, S.S. Knight, C.M. Cooper et W.H. Benson, « Influence of Sediment Composition on Apparent Toxicity in Solid-Phase Test Using Bioluminescent Bacteria », *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(3):411–414 (1995).
- Bombardier, M. et N. Bermingham, « The Sed-Tox Index: Toxicity-Directed Management Tool to Assess and Rank Sediments Based on Their Hazard—Concept and Application », *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(4):685–698 (1999).
- Bower, C.E. et J.P. Bidwell, « Ionization of Ammonia in Sea Water: Effects of Temperature, pH and Salinity », *J. Fish. Res. Board Can.*, 35(7):1012–1016 (1978).
- Brouwer, H. et T. Murphy, « Volatile Sulfides and their Toxicity in Freshwater Sediments », *Environ. Toxicol. Chem.*, 14(2):203–208 (1995).
- Brouwer, H., T. Murphy et L. McArdle, « A Sediment-Contact Bioassay with *Photobacterium phosphoreum* », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:1353–1358 (1990).
- Cook, N.H. et P.G. Wells, « Toxicity of Halifax Harbour Sediments: An Evaluation of the Microtox Solid-Phase Test », *Water Qual. Res. J. Canada*, 31(4):673–708 (1996).
- Corbin, T., K. Doe et D. McLeay, « 1996-1999 Studies at ECs Atlantic Regional Laboratory Related to the Development of Environment Canada's 14-Day *Survival-and-Growth* Test for Sediment Toxicity Using Cultured Spionid Polychaete Worms », rapport technique préparé par McLeay Environmental Ltd. (Victoria) pour la Section de l'élaboration et l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, mars 2000 (2000).
- 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.*, 2(2):192–206 (1995).

- EC (Environnement Canada), « Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence », Conservation et protection, Ottawa, rapport SPE 1/RM/12, 85 p. (1990).
- . « Essai de toxicité sur la bactérie luminescente *Photobacterium phosphoreum* », Conservation et protection, Ottawa, rapport SPE 1/RM/24, 61 p. (1992).
- . « Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques », Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/29, 144 p. (1994).
- . « Guide d'utilisation de la formule "Demande de permis (immersion en mer)" », Division du milieu marin, Ottawa, rapport SPE 1/MA/1 (1995a).
- . « Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence », Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/30, 56 p. (1995b).
- . « Procedure for Conducting a Microtox Solid Phase Test », Mode opératoire normalisé 43, 10 p., préparé, en janvier 1996 par G. Wohlgeschaffen. Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique, Moncton (1996a).
- . « 1996 National Compendium Monitoring at Ocean Disposal Sites », rapport inédit, programme d'immersion en mer, Division du milieu marin, Ottawa (1996b).
- . « 1996–97 Discussion Paper on Ocean Disposal and Cost Recovery », rapport inédit, programme d'immersion en mer, Division du milieu marin, Ottawa (1997a).
- . « Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (*Chironomus tentans* ou *Chironomus riparius*) dans les sédiments », Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/32, 133 p. (1997b).
- . « Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole *Hyaella azteca* dans les sédiments », Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/33, 123 p. (1997c).
- . « Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens », Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/35, 57 p. (1998).
- . « Standard Operating Procedure for the Solid-Phase Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (*Vibrio fischeri*) », mode opératoire normalisé n° IC50MS10.SOP, première ébauche, 18 p., préparé en octobre 1999 par C. Buday, Centre des sciences de l'environnement du Pacifique, North Vancouver (C.-B.) [1999a].
- . « Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats », Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/34 (1999b).

- . « A Guide to Canada's Disposal at Sea Permit System », Direction du milieu marin, Ottawa, rapport SPE 1/MA/2, en préparation (2002a).
- . « Guidance Document on Statistical Methods to Determine Endpoints of Toxicity Tests », Service de la protection de l'environnement, Ottawa, rapport SPE 1/RM/xx, en préparation (2002b).
- Gaudet, I.D., « Effect of Microtox Reagent Reconstitution Age on the Variability of Analytical Results from the Microtox Assay », rapport final au comité des utilisateurs du réactif Microtox de l'Ouest canadien par l'Alberta Research Council, Edmonton (1998).
- Gouvernement du Canada, « Règlement sur l'immersion en mer », DORS/2001-275 sous le régime de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (1999), *Gazette du Canada Partie II*, 135 (17):1655–1657, 1^{er} août 2001, Ottawa (2001).
- LCPE (*Loi canadienne sur la protection de l'environnement*), « Immersion », partie 7, section 3, articles 122 à 127 et annexes 5 et 6, Lois du Canada, chapitre 33 (1999).
- McLeay, D., K. Doe, P. Jackman, P. Ross, C. Buday, G. van Aggelen, G. Elliott, W. Antonioli, S. Trottier, J. Pickard, K. Kinnee, K. Lee et G. Wohlgeschaffen, « Interlaboratory Studies to Validate Environment Canada's New *Reference Method* for Determining the Toxicity of Sediment Using Luminescent Bacteria (*Vibrio fischeri*) in a Solid-Phase Test », rapport technique préparé par McLeay Environmental Ltd. (Victoria) et le Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique d'Environnement Canada (Moncton) pour la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada, Ottawa, décembre 2001 (2001).
- Microbics, « Detailed Solid-Phase Test Protocol », p. 153–178, dans : *Microtox Manual—A Toxicity Testing Handbook*, Microbics Corporation, Carlsbad, CA (1992).
- . « Microtox Acute Toxicity Solid-Phase Test », Microbics Corporation, Carlsbad, CA, 18 p. (1995a).
- . « Model 500 Analyzer », Microbics Corporation, Carlsbad, CA, 13 p. (1995b).
- NICMM (National Institute for Coastal and Marine Management/RIKZ), « Standard Operating Procedures, Marine: Microtox Solid-Phase (*Vibrio fischeri*) Sediment Toxicity Test », C.A. Schipper, R.M. Burgess, M.E. Schot, B.J. Kater, et J. Stronkhorst, projet SPECIE*BIO, RIKZ/AB-99.107x, version 1.1, juin 1999, NICMM, Middelburg, Pays-Bas, 23 p. (1999).
- 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 », *Chemistry and Ecology*, 14:197–214 (1998).
- Qureshi, A.A., K.W. Flood, S.R. Thompson, S.M. Janhurst, C.S. Innis et D.A. Rokosh, « Comparison of a Luminescent Bacterial Test with Other Bioassays for Determining Toxicity of Pure Compounds and Complex Effluents », p. 179–195, dans : J.G. Pearson, R.B. Foster et W.E. Bishop (dir.), *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766*, American

- Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (1982).
- Ringwood, A.H., M.E. DeLorenzo, P.E. Ross et A.F. Holland, « Interpretation of Microtox Solid-Phase Toxicity Tests: The Effects of Sediment Composition », *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (6):1135–1140 (1997).
- Ross, P., « Role of Microbiotests in Contaminated Sediment Assessment Batteries », p. 549-556, chapitre 38 dans : *Microscale Testing in Aquatic Toxicology—Advances, Techniques, and Practice*, P.G. Wells, K. Lee et C. Blaise (dir.), CRC Press, New York, NY (1998).
- Ross, P. et P.A. Leitman, « Solid Phase Testing of Aquatic Sediments Using *Vibrio fischeri*: Test Design and Data Interpretation », p. 65-76, chapitre 6 dans : *Environmental Toxicology Assessment*, M. Richardson (dir.), Taylor and Francis, Londres (1995).
- Ross, P., G.A. Burton, Jr., M. Greene, K. Ho, P. Meier, L. Sweet, A. Auwarter, A. Bispo, K. Doe, K. Erstfeld, S. Goudey, M. Goyvaerts, D. Henderson, M. Jourdain, M. Lenon, P. Pandard, A. Qureshi, C. Rowland, C. Schipper, W. Schreurs, S. Trottier et G. van Aggelen, « Interlaboratory Precision Study of a Whole Sediment Toxicity Test with the Bioluminescent Bacterium *Vibrio fischeri* », *Environ. Toxicol.*, 14:339–345 (1999).
- Sprague, J.B. et A. Fogels, « Watch the Y in Bioassay », p. 107–118, dans : *Proceedings of the 3rd Aquatic Toxicity Workshop*, Halifax, 2 et 3 novembre 1976, Environnement Canada, rapport technique SPE-5-AR-77-1 du Service de la protection de l'environnement (1977).
- Tay, K.L., K.G. Doe, A.J. MacDonald et K. Lee, « The Influence of Particle Size, Ammonia, and Sulfide on Toxicity of Dredged Materials for Ocean Disposal », chapitre 39, p. 559–574, dans : *Microscale Testing in Aquatic Toxicology—Advances, Techniques, and Practice*, P.G. Wells, K. Lee et C. Blaise (dir.), CRC Press, New York, NY (1998).
- Trussell, R.P., « The Percent Un-Ionized Ammonia in Aqueous Ammonia Solutions at Different pH Levels and Temperatures », *J. Fish. Res. Board Can.*, 29:1505–1507 (1972).

Méthodes d'essai biologique et guides à l'appui publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada¹

Titre de la méthode ou du guide	N° de publication	Date de publication	Modifications ultérieures
A. Méthodes génériques (universelles)			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996
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 sur le cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21	Février 1992	Novembre 1997
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22	Février 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente <i>Photobacterium phosphoreum</i>	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce <i>Selenastrum capricornutum</i>	SPE 1/RM/25	Novembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez les amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Méthode d'essai biologique : essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27	Décembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 1 ^{re} édition	Décembre 1992	Janvier 1995
Méthode d'essai biologique : essais toxicologiques sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2 ^e édition	Juillet 1998	—
Méthode d'essai biologique : 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	—
Méthode d'essai biologique : essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyalella azteca</i> dans les sédiments	SPE 1/RM/33	Décembre 1997	—
Méthode d'essai biologique : essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37	Mars 1999	—

1. On peut acheter ces documents des Publications de la protection de l'environnement, Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa, K1A 0H3 (Canada). Pour renseignements ou observations, prière de s'adresser au chef de la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa, K1A 0H3.

Titre de la méthode du guide	N° de publication	Date de publication	Modifications ultérieures
B. Méthodes de référence²			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 1 ^{re} édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
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	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 1 ^{re} édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
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 d'essai biologique : 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	—
C. Guides			
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 physico-chimique 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	—

2. Dans cette collection, on entend par *méthode de référence* une méthode biologique particulière d'essai de la toxicité, c'est-à-dire une méthode écrite, assortie d'un ensemble explicite de consignes et de conditions décrites avec précision. Contrairement aux méthodes universelles (polyvalentes ou génériques) publiées par Environnement Canada, la *méthode de référence* est souvent limitée, dans son emploi, aux essais exigés par un règlement particulier.

Composition du Groupe intergouvernemental de la toxicité aquatique (avril 2002)

Administration fédérale (Environnement Canada)

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal

M. Bombardier
Centre de technologie environnementale
Ottawa

U. Borgmann
Institut national de recherche sur les eaux
Burlington (Ontario)

J. Bruno
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver (Colombie-Britannique)

C. Buday
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver

K. Doe
Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique
Moncton

G. Elliott
Service de la protection de l'environnement
Edmonton

F. Gagné
Centre Saint-Laurent
Montréal

M. Harwood
Service de la protection de l'environnement
Montréal

D. Hughes
Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique
Moncton

P. Jackman
Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique
Moncton

N. Kruper
Service de la protection de l'environnement
Edmonton

M. Linssen
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver

D. MacGregor
Centre de technologie environnementale
Ottawa

D. Moul
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver

W.R. Parker
Service de la protection de l'environnement
Fredericton

L. Porebski
Direction du milieu marin
Hull

D. Rodrigue
Direction générale pour l'avancement des technologies
environnementales
Hull

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Ottawa

A. Steenkamer
Centre de technologie environnementale
Ottawa

T. Steeves
Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique
Moncton

G. van Aggelen (président)
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver

R. Watts
Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
North Vancouver

P. Wells
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)

***Administration fédérale (Pêches et Océans
Canada)***

R. Roy
Institut Maurice-Lamontagne
Mont-Joli (Québec)

Provinces

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Sainte-Foy

B. Bayer
Environnement Manitoba
Winnipeg

D. Bedard
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

M. Mueller
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

D. Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

J. Schroeder
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale

Adresses de l'administration centrale et des bureaux régionaux d'Environnement Canada

Administration centrale

351, boul. Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Hull (Québec)
K1A 0H3

Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin, 2^e étage
Downsview
M3H 5T4

Région de l'Atlantique

15^e étage, Queen Square
45 Alderney Drive
Dartmouth (Nouvelle-Écosse)
B2Y 2N6

Région de l'Ouest et du Nord

Pièce 210, Twin Atria n^o 2
4999 - 98^e Avenue
Edmonton
T6B 2X3

Région du Québec

105, rue McGill
8^e étage
Montréal
H2Y 2E7

Région du Pacifique et du Yukon

224, rue Esplanade Ouest
North Vancouver (Colombie-Britannique)
V7M 3H7

Membres du Groupe consultatif scientifique

Membres du Groupe

M. Craig Buday
 Environnement Canada
 Centre des sciences de l'environnement du Pacifique
 2645, route Dollarton
 North Vancouver (C.-B.) V7H 1B1
 Tél. : (604) 924-2514
 Téléc. : (604) 924-2554
 Courriel : craig.buday@ec.gc.ca

Dr Allen Burton, Jr.
 Institute for Environmental Quality
 Wright State University
 Dayton, OH 45435, USA
 Tél. : (937) 775-4995
 Téléc. : (937) 775-4997
 Courriel : aburton@wright.edu

M. Ken Doe
 Environnement Canada
 Laboratoire de toxicologie
 Section de la qualité de l'environnement, Direction des
 contaminants de l'environnement
 Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique
 C.P. 23 005
 Moncton (N.-B.) E1A 6S8
 Tél. : (506) 851-3486
 Téléc. : (506) 851-6608
 Courriel : Ken.Doe@ec.gc.ca

Dr Kay Ho
 Atlantic Ecology Division
 U.S. Environmental Protection Agency
 27 Tarzwell Drive
 Narragansett, RI 02882, USA
 Tél. : (401) 782-3196
 Téléc. : (401) 782-3030
 Courriel : ho.kay@epamail.epa.gov

Mme Paula Jackman
 Environnement Canada
 Laboratoire de toxicologie
 Section de la qualité de l'environnement, Direction des
 contaminants de l'environnement
 Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique
 C.P. 23005
 Moncton (N.-B.) E1A 6S8
 Tél. : (506) 851-2886
 Téléc. : (506) 851-2907
 Courriel : Paula.Jackman@ec.gc.ca

M. Jim Osborne
 Environnement Canada
 Direction du milieu marin
 Place Vincent-Massey, 12^e étage
 351, boul. Saint-Joseph
 Hull (Qc) K1A 0H3
 Tél. : (819) 953-2265
 Téléc. : (819) 953-0913
 Courriel : Jim.Osborne@ec.gc.ca

Mme Linda Porebski
 Environnement Canada
 Direction du milieu marin
 Place Vincent-Massey, 12^e étage
 351, boul. Saint-Joseph
 Hull (Qc) K1A 0H3
 Tél. : (819) 953-4341
 Téléc. : (819) 953-0913
 Courriel : Linda.Porebski@ec.gc.ca

Dr Philippe Ross
 Environmental Science and Engineering Division
 Colorado School of Mines
 Golden, CO 80401-1887, USA
 Tél. : (303) 273-3473
 Téléc. : (303) 273-3413
 Courriel : pross@mines.edu

M. Paul Topping
 Environnement Canada
 Direction du milieu marin
 Place Vincent-Massey, 12^e étage
 351, boul. Saint-Joseph
 Hull (Qc) K1A 0H3
 Tél. : (819) 953-0663
 Téléc. : (819) 953-0913
 Courriel : Paul.Topping@ec.gc.ca

M. Sylvain Trottier
 Environnement Canada
 Centre Saint-Laurent
 105, rue McGill
 Montréal (Qc) H2Y 2E7
 Tél. : (514) 496-7104
 Téléc. : (514) 496-7143
 Courriel : sylvain.trottier@ec.gc.ca

Autorité scientifique

M. Rick Scroggins
Environnement Canada
Section de l'élaboration et de l'application des
méthodes
Centre de technologie environnementale
3439, River Road South
Ottawa (Ont.) K1A 0H3
Tél. : (613) 990-8569
Télééc. : (613) 990-0173
Courriel : scroggins.richard@etc.ec.gc.ca

Consultants

Dr Don McLeay
McLeay Environmental Ltd.
2999, route Spring Bay
Victoria (C.-B.) V8N 5S4
Tél. : (250) 472-2608
Télééc. : (250) 472-2609
Courriel : mcleayenvir@islandnet.com

M. Gary Wohlgeschaffen
Sciences de l'environnement marin
Institut Bedford d'océanographie
C.P. 1006
Dartmouth (N.-É.) B2Y 4A2
Tél. : (902) 426-2479
Télééc. : (902) 426-6695
Courriel : WohlgeschaffenG@mar.dfo-mpo.gc.ca

Variantes du mode opératoire des essais de toxicité de sédiments en phase solide employant des bactéries luminescentes et décrites dans les méthodes canadiennes, états-uniennes et néerlandaises

(Énumération chronologique, mettant en vedette l'organisation plutôt que l'auteur ou les auteurs)

EC 1992: Environnement Canada, *Méthode d'essai biologique : essai de toxicité sur la bactérie luminescente Photobacterium phosphoreum*, Conservation et protection, Ottawa, rapport SPE 1/RM/24, 67 p. (1992).

MICROBICS 1992: Microbics, *Detailed Solid-Phase Test Protocol*, p. 153–178, dans : *Microtox Manual—A Toxicity Testing Handbook*, société Microbics, Carlsbad, CA (1992).

MICROBICS 1995a: Microbics, *Microtox Acute Toxicity Solid-Phase Test*, société Microbics, Carlsbad, CA, 18 p. (1995a).

ASTM 1995: ASTM (American Society for Testing and Materials), *Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Luminescent Bacteria*, ébauche 8, ASTM, Philadelphie, PA (1995).

EC 1996a : Environnement Canada, *Procedure for Conducting a Microtox Solid-Phase Test*, Section de toxicologie, Laboratoire de la qualité de l'environnement, Direction de la conservation de l'environnement, Moncton, mode opératoire normalisé 43, 10 p., janvier 1996, G. Wohlgeschaffen. Centre des sciences de l'environnement de l'Atlantique, Moncton (1996a).

AZUR 1997 : AZUR, *Basic Solid-Phase Test*, AZUR Environmental, Carlsbad, CA, ébauche du 1997/11/6, 4 p. (1997).

AZUR 1998a : AZUR, *Basic Solid-Phase Test (Basic SPT)*, AZUR Environmental, Carlsbad, CA, 16 p. (1998).

AZUR 1998b : AZUR, *Solid-Phase Test (SPT)*, AZUR Environmental, Carlsbad, CA, 19 p. (1998).

EC 1999a : Environnement Canada, *Standard Operating Procedure for the Solid-Phase Toxicity Test Using Luminescent Bacteria (Vibrio fischeri)*, mode opératoire normalisé IC50MS10.SOP, première ébauche, 18 p., octobre 1999, C. Buday. Centre des sciences de l'environnement du Pacifique, North Vancouver (1999a).

NICMM 1999 : NICMM (National Institute for Coastal and Marine Management/RIKZ), *Standard Operating Procedures, Marine: Microtox Solid-Phase (Vibrio fisheri) Sediment Toxicity Test*, C.A. Schipper, R.M. Burgess, M.E. Schot, B.J. Kater et J. Stronkhorst, projet SPECIE*BIO, RIKZ/AB-99.107x, version 1.1, juin 1999, 23 p, NICMM, Middelburg, Pays-Bas (1999).

1 Type d'échantillon, prélèvement et transport

Document source	Type d'échant.	Méthode de prélèvement	Temp. de transport (°C)	Récipient	Prélèvements réitérés ?
EC 1992	sol, sédiment, boue	suivre les orientations données dans ASTM (1991) et EC (1994)	1–7	On préfère les récipients de verre ou à revêtement de Téflon ^{MD} ; sont acceptables le polyéthylène et le polypropylène ; 500 mL à 1 L	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1992	sol, sédiment	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i>	capsules neuves en verre borosilicaté doublé de TFE	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1995a	sol, sédiment	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	capsules neuves en verre borosilicaté doublé de Téflon	<i>n. p.</i>
ASTM 1995	sédiment	suivre les guides sur les normes ASTM E 1367, E 1383, et E 1391	4 ± 2	capsules neuves ² borosilicaté doublé de TFE	oui ³
EC 1996a	sol, sédiment	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1997	sol, sédiment	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1998a	sol, sédiment	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1998b	sol, sédiment	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
EC 1999a	sol, sédiment	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	tube à centrifuger de 50 mL	<i>n. p.</i>
NICMM 1999	sédiment	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>

1. *n. p.* = non précisé.

2. Si on les réutilise, les nettoyer comme suit : savon non toxique, lavage à l'acide, double rinçage à l'eau distillée.

3. On devrait prélever des échantillons réitérés à chaque emplacement pour déterminer la variabilité des caractéristiques du sédiment.

2 Entreposage des échantillons

Document source	Espace libre ?	Température (°C)	Lumière ou obscurité	Durée maximale
EC 1992	non	4 ± 2	obscurité	6 semaines
MICROBICS 1992	non	2–8	<i>n. p.</i>	48 h, si possible
MICROBICS 1995a	non	réfrigérateur	<i>n. p.</i>	48 h, si possible
ASTM 1995	non	4 ± 2	obscurité	2–8 semaines
EC 1996a	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1997	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1998a	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1998b	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
EC 1999a	non	4 ± 2	obscurité	6 semaines
NICMM 1999	<i>n. p.</i>	4	obscurité	< 4 semaines

1. *n. p.* = non précisé.

3 Traitement préalable et caractérisation des échantillons

Document source	Tamisage ?	Suppression des gros organismes ?	Suppression des grosses particules ?	Homogénéisation de l'éch. ?	Caractérisation du sédiment
EC 1992	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	mélanger à fond	couleur
MICROBICS 1992	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	oui (≥ 1 mm)	oui	pH
MICROBICS 1995a	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	oui (1–3 min)	pH
ASTM 1995	non	oui	oui (> 5 mm)	oui	carbone organique ou matières volatiles totales, granulométrie, ammoniacque, pourcentage d'eau, pH
EC 1996a	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	oui	<i>n. p.</i>
AZUR 1997	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	oui (1–3 min)	<i>n. p.</i>
AZUR 1998a	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	mélanger à fond	<i>n. p.</i>
AZUR 1998b	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	mélanger à fond	<i>n. p.</i>
EC 1999a	non	oui	oui	mélanger à fond	<i>n. p.</i>
NICMM 1999	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	oui	dans le cas de l'eau de porosité ² : pH, salinité, sulfures, ammoniacque

1. *n. p.* = non précisé.

2. Sédiment centrifugé 20 min à 2500 g.

4 Dessiccation d'un sous-échantillon pour déterminer la teneur en eau

Document source	Quantité (g)	Nombre de répétitions	Précision de la pesée (g)	Température (°C)	Durée
EC 1992	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1992	5	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1995a	5 ± 0,2	3	± 0,01	100 ± 5	24 h
ASTM 1995	quelques grammes	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	~ 100	pendant la nuit
EC 1996a	3–5	3	± 0,01	60–100	48 h
AZUR 1997	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1998a	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1998b	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
EC 1999a	5 ± 0,2	3	± 0,01	100 ± 5	24 h
NICMM 1999	~ 5	3	<i>n. p.</i>	100	24 h

1. *n. p.* = non précisé.

5 Sous-échantillon de sédiment, diluant, récipients de la solution mère et des solutions filles

Document source	Masse du sous-éch. (g)	Séparation de l'eau de porosité ?	Type de diluant	Volume de diluant (mL)	Récipient de la solution mère	Récipient des solutions filles
EC 1992	0,4	oui (centrifug.)	« diluant en phase solide »	4,0	s. o. ⁴	tube d'EPS ⁶
MICROBICS 1992	0,3	oui (centrifug.)	« diluant en phase solide »	3,0	s. o. ⁴	tube d'EPS ^{6,7}
MICROBICS 1995a	7,00	facultatif	solution de NaCl ou de NaNO ₃	35	récipient neuf de verre ou de plastique de 50 mL	tube d'EPS ^{6,7}
ASTM 1995	7 ± 0,35 ¹	non	NaCl à 3,5 % ou NaNO ₃ à 3,02 % ³	35	récipient neuf de verre borosilicaté propre ⁵	tube de verre borosilicaté neuf, propre ⁵
EC 1996a	7 ± 0,05	<i>n. p.</i> ²	« diluant en phase solide »	35	récipient de polypropylène neuf, jetable, de 50 mL	tube d'EPS ^{6,7}
AZUR 1997	7,00	<i>n. p.</i>	diluant ou eau de mer de référence	35	becher d'env. 50 mL	cuvette ⁸
AZUR 1998a	7,00	<i>n. p.</i>	« diluant en phase solide »	35	becher d'env. 50 mL	cuvette ⁸
AZUR 1998b	7,00	<i>n. p.</i>	« diluant en phase solide »	35	becher d'env. 50 mL	tube d'EPS ^{6,7}
EC 1999a	0,3	oui (centrifug.)	NaCl à 3,5 %	3,0	s. o. ⁴	tube d'EPS ^{6,9}
NICMM 1999	7,0	<i>n. p.</i>	« diluant en phase solide »	35	tube à sérum	tube d'EPS ^{6,7}

1. La masse effectivement utilisée devrait être connue à ± 0,05 g et doit être connue à ± 0,35 g.

2. *n. p.* = non précisé.

3. Utiliser du NaCl (à 3,5 %) pour les sédiments marins ou estuariens et NaNO₃ (à 3,02 %) pour les sédiments d'eau douce.

4. s. o. = sans objet. La première dilution (solution fille à la concentration maximale) se fait dans le tube de styrène pour *essai en phase solide* (tube d'EPS).

5. Récipients de 16 mm de diamètre (15,6 mm, diamètre nominal), à fond hémisphérique de 15,3 mm de diamètre. On les porte à l'incubateur, à 15 °C, dans un portoir convenable.

6. EPS = *essai en phase solide*. Chaque tube, de polystyrène, mesure 15,5 mm sur 56 (capacité de 7,5 mL), possède un fond hémisphérique, adapté à la colonne de filtration (tableau 12, présente annexe). Fournisseur : Evergreen Scientific, pièce n° 208-3193-020, Los Angeles, Californie, tél. : (323) 583-1331.

7. Les tubes d'EPS sont déposés dans un râtelier ou portoir (bloc d'incubateur), mis à incuber à 15 °C (bain d'eau).

8. En verre borosilicaté, jetable, de 50 mm de longueur sur 12 de diamètre (11,75 mm, diamètre nominal) ; fond plat. Les cuvettes sont déposées dans les puits de l'incubateur.

9. Les tubes d'EPS reposent dans un portoir (bloc d'incubateur) à la température ambiante.

6 Mélange de la solution mère de sédiment

Document source	Ajustement du pH ?	Dispositif de mélange	Profondeur du tourbillon	Temps de mélange (min)
EC 1992	<i>n. p.</i> ¹	pipette (pour agitation et mesure)	s. o. ⁴	<i>n. p.</i> (bien mélanger)
MICROBICS 1992	<i>n. p.</i> ²	pipette (pour agitation et mesure)	s. o.	<i>n. p.</i> (complètement disperser l'échantillon et le mettre en suspension)
MICROBICS 1995a	<i>n. p.</i>	plaque magnétique et barreau magnétique enrobé de téflon	moitié de la hauteur du liquide	10
ASTM 1995	non ³	plaque magnétique et barreau magnétique enrobé de téflon	moitié de la hauteur du liquide	20 ⁵
EC 1996a	<i>n. p.</i>	agitateur magnétique	tiers de la hauteur du liquide	10
AZUR 1997	<i>n. p.</i>	plaque magnétique et barreau magnétique enrobé de téflon	moitié de la hauteur du liquide	10
AZUR 1998a	<i>n. p.</i>	plaque magnétique et barreau magnétique enrobé de téflon	moitié de la hauteur du liquide	10
AZUR 1998b	<i>n. p.</i>	plaque magnétique et barreau magnétique enrobé de téflon	moitié de la hauteur du liquide	10
EC 1999a	non	pipette (pour agitation et mesure)	s. o.	<i>n. p.</i> (complètement disperser l'échantillon et le mettre en suspension)
NICMM 1999	<i>n. p.</i>	plaque magnétique et barreau magnétique enrobé de téflon	moitié de la hauteur du liquide	10, ou jusqu'à homogénéisation de la suspension

1. *n. p.* = non précisé.

2. De 6 à 8, le pH a effet minime sur le *réactif reconstitué* (c'est-à-dire les bactéries lyophilisées reconstituées).

3. Le pH optimal est de 7,3 ; peu d'effet si le pH va de 6,6 à 7,8.

4. s. o. = sans objet.

5. Vérifier après cinq minutes, pour voir si les grosses particules, qui se déposent rapidement après agitation, sont exemptes d'argile.

7 Préparation des séries de dilutions (solutions filles)

Document source	Rapport de dilution	Nombre de solutions filles	Volume de solution mère transvasé dans le tube de la première solution fille (mL)	Nombre de pipetages pour remettre les particules en suspension	Volume successivement transvasé de la première solution fille à la dernière (mL)
EC 1992	1/2	9	s. o. ²	<i>n. p.</i> ⁷	2,0
MICROBICS 1992	1/2	12 ¹	s. o.	5 ou 6	1,5
MICROBICS 1995a	1/2	13 ¹	1,5 ³	<i>n. p.</i>	1,5
ASTM 1995	1/2 ¹	12 ¹	1,5 ⁴	plusieurs	1,5
EC 1996a	1/2	12	1,5 ^{3,4}	3 ou 4	1,5
AZUR 1997	1/2	9	2,0 ⁵	à fond	1,0
AZUR 1998a	1/2	9	2,0 ^{5,6}	mélanger	1,0
AZUR 1998b	1/2	13	1,5 ^{3,6}	mélanger	1,5
EC 1999a	1/2	10	1,5 ⁴	5 ou 6	1,5
NICMM 1999	1/2	13	1,5	10	1,5

1. Tableau des dilutions décrit, mais l'emploi d'autres combinaisons de milieux témoins, de rapports de dilution et de nombres de dilutions est également énuméré.

2. s. o. = sans objet.

3. Le tube à la concentration maximale renferme déjà 1,5 mL de *diluant*.

4. Utiliser une pipette à grande ouverture pour éviter son colmatage ; tenir à environ 5 mm de la paroi, à environ 15 mm de fond.

5. Transféré directement dans la cuvette du photomètre M500 *Analyzer*.

6. Utiliser une pipette à grande ouverture pour éviter son colmatage, en l'appuyant contre la paroi, à environ 2 cm de fond.

7. *n. p.* = non précisé.

8 Concentration maximale des solutions filles, solutions témoins, échantillons pour essai en double et récipients inoculés

Document source	Concentration maximale des solutions filles ¹	Nombre de solutions témoins ³	Dédoublage de chaque solution fille ?	Lectures de l'intensité lumineuse initiale (I ₀) ?	Récipients inoculés avec le <i>réactif</i> ⁶
EC 1992	10 %	1	facultatif	non	tubes d' <i>EPS</i>
MICROBICS 1992	98 684 mg/L ou 9,868 %	3	facultatif	non	tubes d' <i>EPS</i>
MICROBICS 1995a	19,737 %	4	oui	non	tubes d' <i>EPS</i>
ASTM 1995	10 %	3	non	non	tubes de verre
EC 1996a	197 368 mg/L	3	non	non	tubes d' <i>EPS</i>
AZUR 1997	9,9 % ou 99 000 mg/L	1	facultatif ⁴	oui ⁵	cuvettes ⁷
AZUR 1998a	99 000 mg/L	1	facultatif ⁴	oui ⁵	cuvettes ⁷
AZUR 1998b	9,9 % ou 99,01 mg/L ²	2	non	non	tubes d' <i>EPS</i>
EC 1999a	9,868 %	3	non	non	tubes d' <i>EPS</i>
NICMM 1999	19,737 %	4	oui	non	tubes d' <i>EPS</i>

1. Les pourcentages sont en poids par volume.

2. Ce chiffre semble erroné. Plus probablement 99 000 mg/L.

3. Elles sont constituées uniquement de diluant, auquel on ajoute l'inoculum bactérien.

4. Lorsqu'un essai en double est exigé, effectuer ce mode opératoire deux fois.

5. L'intensité lumineuse initiale, au temps zéro (I₀) est mesurée sur des aliquotes de 500 µL de *diluant plus réactif* seulement, dans 10 cuvettes (répétitions).

6. Par « *réactif* », on entend la bactérie reconstituée (v. tableau 11). Voir, dans le tableau 5, la description des récipients dans la colonne « Récipient des solutions filles ».

7. Les solutions filles ne sont pas inoculées avec le *réactif*. On transvase plutôt une aliquote de 500 µL de chaque solution fille dans les cuvettes initiales après qu'on a mesuré l'intensité lumineuse initiale. Voir la description des cuvettes dans le tableau 5.

9 Équilibrage des solutions filles avant l'inoculation des bactéries

Document source	Température d'équilibrage (°C)	Délai d'équilibrage (min)
EC 1992	15 ± 0,3	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1992	15	10
MICROBICS 1995a	15	10
ASTM 1995	15 ± 0,5	<i>n. p.</i>
EC 1996a	15	10
AZUR 1997	<i>n. p.</i> ¹	5
AZUR 1998a	<i>n. p.</i> ¹	5
AZUR 1998b	15	5
EC 1999a	température ambiante (~ 20)	5
NICMM 1999	15	10

1. *n. p.* = non précisé. On pose la température égale à 15 °C, puisque les solutions filles sont préparées dans les cuvettes, directement dans le photomètre (Microbics, 1995b).

10 Organismes d'essai, source et entreposage

Document source	Espèce	Souche	Source	Température d'entreposage (°C) ⁵
EC 1992	<i>P. phosphoreum</i> ¹	B-11177 du NRRL ³	Microbics	- 20
MICROBICS 1992	<i>P. phosphoreum</i> ¹	<i>n. p.</i>	Microbics	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1995a	<i>n. p.</i> ²	<i>n. p.</i>	Microbics	<i>n. p.</i>
ASTM 1995	<i>V. fischeri</i>	B-11177 du NRRL ³	<i>n. p.</i>	- 20
EC 1996a	<i>P. phosphoreum</i> ¹	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
AZUR 1997	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	AZUR ⁴	<i>n. p.</i>
AZUR 1998a	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	AZUR	<i>n. p.</i>
AZUR 1998b	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	AZUR	<i>n. p.</i>
EC 1999a	<i>V. fischeri</i>	B-11177 du NRRL ³	AZUR	- 20
NICMM 1999	<i>V. fischeri</i>	<i>n. p.</i>	AZUR	<i>n. p.</i>

1. Par la suite identifié comme *Vibrio fischeri*.

2. *n. p.* = non précisé.

3. Déposé au Northern Regional Research Laboratory (NRRL), à Preoria (Illinois), États-Unis.

4. Le 15 août 1996, la société Microbics est devenue AZUR Environmental.

5. Les organismes d'essai, achetés sous forme de bactéries lyophilisées en flacon (« réactif bactérien »), se conservent longtemps à -20 °C.

11 Reconstitution des bactéries lyophilisées

Document source	Source de la solution de reconstitution ¹	Temp. (°C)	Durée de vie utile	Tournoiement du flacon	Agitation des bactéries reconstituées
EC 1992	Microbics	3 ou 5	2 h	3 ou 4 fois	20 fois avec une pipette de 0,5 mL
MICROBICS 1992	Microbics	<i>n. p.</i> ²	2 h	3 ou 4 fois	20 fois avec une pipette de 0,5 mL
MICROBICS 1995a	Microbics	<i>n. p.</i> ²	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	10 fois avec une pipette de 0,5 mL
ASTM 1995	eau	5,5 ± 1	<i>n. p.</i>	quelques fois	20 fois avec une pipette de 0,5 mL
EC 1996a	AZUR	<i>n. p.</i> ²	<i>n. p.</i>	3 fois	10 fois avec une pipette de 0,5 mL
AZUR 1997	AZUR	<i>n. p.</i> ²	3 h	<i>n. p.</i>	10 fois avec une pipette de 0,5 mL
AZUR 1998a	AZUR	<i>n. p.</i> ²	3 h	3 ou 4 fois	≥ 10 fois avec une pipette de 0,5 mL
AZUR 1998b	AZUR	<i>n. p.</i> ²	3 h	3 ou 4 fois	≥ 10 fois avec une pipette de 0,5 mL
EC 1999a	eau distillée au laboratoire	<i>n. p.</i> ²	3 à 4 h	3 ou 4 fois	20 fois avec une pipette de 0,5 mL
NICMM 1999	AZUR	<i>n. p.</i> ²	4 h	non ³	20 fois avec une pipette de 1 mL

1. Eau distillée, non toxique, vérifiée par un essai de toxicité aiguë avec les bactéries luminescentes.

2. *n. p.* = non précisé. Température posée égale à 5 °C, puisqu'on utilise le photomètre M500 *Analyzer* (Microbics, 1995b).

3. À l'aide d'une pipette, on porte, dans le flacon, de la solution de reconstitution de la cuvette se trouvant dans le puits de réactif, on mélange 20 fois, puis on la porte, après pipettage, dans la cuvette se trouvant dans le puits de réactif et on laisse équilibrer 30 min.

12 Inoculation, incubation et filtration des solutions filles

Document source	Volume d'inoculum (μL)	Méthode de mélange	Nombre de brassages	Durée d'incubation (min)	Temp. d'incub. ($^{\circ}\text{C}$)	Colonnes de filtration ?
EC 1992	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>	20	15 \pm 0,3	oui
MICROBICS 1992	20	pipette de 1,5 mL	5 ou 6 fois	20	15	oui
MICROBICS 1995a	20	agitation, puis pipette de 1,5 mL	<i>n. p.</i>	20	15	oui
ASTM 1995	20	agitation ou tourbillon	<i>n. p.</i>	20	15 \pm 0,5	oui
EC 1996a	20	pipette de 1,5 mL	2 fois	20	15	oui
AZUR 1997	10 ²	agitation	<i>n. p.</i>	30 ²	<i>n. p.</i> ³	non ⁵
AZUR 1998a	10 ²	agitation	<i>n. p.</i>	30 ²	<i>n. p.</i> ³	non ⁵
AZUR 1998b	20	pipette de 1,5 mL	<i>n. p.</i>	20	15	oui
EC 1999a	20	pipette de 1,5 mL	5 ou 6 fois	20	temp. ambiante (~ 20)	oui
NICMM 1999	20	à la main	<i>n. p.</i>	20	15	oui

1. *n. p.* = non précisé.

2. On inocule les cuvettes initiales renfermant 0,5 mL de *diluant*, mais non les solutions filles, et on les laisse se stabiliser 15 min après mélange. On prend ensuite les lectures initiales. Commence une période d'incubation de 30 min, après transvasement de 500 μL de chaque solution fille dans les cuvettes initiales et mélange à la pipette.

3. Posée égale à 15 $^{\circ}\text{C}$, puisque les cuvettes sont dans le photomètre M500 *Analyzer* (Microbics, 1995b).

4. Colonnes de séparation de sérum en polyéthylène, 13 mm, diamètre extérieur ; 11 mm, diamètre intérieur ; 67 mm de hauteur, avec obturation flexible de 15 mm de diamètre à l'extrémité inférieure, où le filtre s'adapte au tube d'*EPS* (tableau 5). Le filtre lui-même, situé à l'extrémité inférieure, possède un diamètre de 6 mm et une épaisseur de 4 mm. La taille des pores est de 15 à 45 μm , selon le fournisseur, Evergreen Scientific, Los Angeles, CA, tél. : (323) 583-1331, n^o de la pièce : 208-3193-020.

5. Cette méthode d'essai n'emploie pas de filtration.

13 Mesure de la luminescence bactérienne

Document source	Analyseur (photomètre)	Volume transvasé (µL)	Type de cuvette	Conditions de stabilisation ⁷	Cuvette de lecture
EC 1992	Modèles 2055 et 500 de Microtox	500	en verre ⁵	5 min, 15 ± 0,3 °C	insertion manuelle
MICROBICS 1992	Modèle 500 de Microtox	500	en verre ⁵	5 min ⁸	insertion manuelle
MICROBICS 1995a	Modèle 500	500	en verre ⁵	10 min ⁸	insertion manuelle
ASTM 1995	photomètre	500	en verre ⁵	10 min, 15 ± 0,5°C	notice d'emploi du photomètre
EC 1996a	Modèle 500	500	en verre ⁵	<i>n. p.</i> ^{1,8,9}	insertion manuelle
AZUR 1997	<i>n. p.</i> ^{1,2}	5003	<i>n. p.</i> ^{1,6}	<i>n. p.</i> ^{1,8,10}	insertion manuelle
AZUR 1998a	Modèle 500	500 ^{3,4}	<i>n. p.</i> ^{1,6}	<i>n. p.</i> ^{1,8,10}	insertion manuelle
AZUR 1998b	Modèle 500	500	<i>n. p.</i> ^{1,6}	10 min ⁸	insertion manuelle
EC 1999a	Modèle 500 de Microtox	500	en verre ⁵	5 min ⁸	insertion manuelle
NICMM 1999	Modèle 500 de Microtox	500	en verre ⁵	<i>n. p.</i> ⁸	insertion manuelle

1. *n. p.* = non précisé.

2. Par hypothèse, le photomètre Model M500 *Analyzer*.

3. Transvasement dans les cuvettes initiales, à partir de quoi commence la période d'incubation de 30 min. On agite les cuvettes après 15 min. Inutile de secouer les cuvettes avant la lecture de la luminescence, parce que, secouement ou non, la CE50 tend à être semblable.

4. Prendre les lectures des cuvettes, sans secouement, quand les 30 min sont écoulées, puis, de nouveau, après secouement, après 31 min écoulées, puis comparer les résultats de la CI50.

5. Verre borosilicaté jetable, 50 mm de longueur sur 12 mm de diamètre (11,75 mm nominaux) ; fond plat.

6. Posé être le type habituel de verrerie, comme dans toutes les autres méthodes connexes.

7. Après que la solution bactérienne filtrée a été transvasée, du tube mis à incuber vers la cuvette du *photomètre*, on la laisse s'équilibrer à la température précisée pendant la période précisée.

8. On pose la température égale à 15 ± 0,5 °C, si on utilise le photomètre Model M500 *Analyzer* (Microbics, 1995b).

9. Posés égales à 10 min (le programme de saisie des données du logiciel attend 10 min avant de demander une lecture).

10. La durée de stabilisation fait partie de la période d'incubation de 30 min (v. tableau 12).

14 Emploi d'un sédiment de référence

Document source	Utilisation et propriétés du sédiment de référence	Emploi pour corriger les valeurs de l'échantillon ?
EC 1992	utilisation obligatoire ¹ ; essai parallèle ; la granulométrie ainsi que la teneur en matière organique et inorganique devraient être semblables.	<i>n. p.</i> ³
MICROBICS 1992	facultatif ou souhaitable ; des échantillons « témoins » prélevés dans le même secteur sont utiles pour distinguer la toxicité.	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1995a	souhaitable ; apparier avec la matière d'essai pour ce qui concerne la granulométrie, la teneur en matière organique et l'humidité.	facultatif ; données d'analyse « réduites » par rapport à la référence.
ASTM 1995	recommandé ; important d'apparier la granulométrie avec celle de la matière d'essai.	facultatif ⁴ ; données d'analyse « réduites » par rapport à la référence.
EC 1996a	facultatif	<i>n. p.</i>
AZUR 1997	recommandé ; apparier la granulométrie, la teneur en matière organique et l'humidité avec celles de la matière d'essai.	non ⁵
AZUR 1998a	recommandé ; apparier la granulométrie, la teneur en matière organique et l'humidité avec celles de la matière d'essai.	non ⁵
AZUR 1998b	recommandé ; apparier la granulométrie, la teneur en matière organique et l'humidité avec celles de la matière d'essai.	<i>n. p.</i>
EC 1999a	recommandé ; des échantillons « témoins » prélevés dans le même secteur et possédant une granulométrie semblable sont utiles pour distinguer la toxicité.	non
NICMM 1999	correction effectuée pour tenir compte de la fraction mesurée de limons et d'argiles dans l'échantillon à l'aide d'une équation obtenue à partir de ses propres données et de celles de Ringwood <i>et al.</i> (1997).	employer l'équation pour corriger la CE 50.

1. L'essai exige au moins un échantillon de référence ou un sédiment témoin (« non contaminé »).
2. Les valeurs corrigées de l'extinction lumineuse (γ_{T}) dans chaque solution fille sont calculées automatiquement par le logiciel, qui applique les valeurs du sédiment de référence (Microbics, 1995) ou calculées par l'application des équations 1 à 3 du § 6.1.
3. *n. p.* = non précisé.
4. La correction effectuée par rapport à un échantillon de référence peut être importante pour les échantillons dont la CI50 est supérieure à environ 0,25 % ; la correction est rarement justifiée pour les échantillons très toxiques possédant une CI50 inférieure à environ 0,1 %. La décision d'utiliser cette correction est laissée à la discrétion du chercheur.
5. Choisir un échantillon de référence possédant des caractéristiques semblables (p. ex. granulométrie, teneur en matière organique, humidité) à celle de la matière d'essai ; comparer les résultats de chacune lorsque l'on juge de la toxicité ou non de la matière d'essai (v. tableau 15).

15 Analyse des données et lignes directrices pour juger de la toxicité de l'échantillon

Document source	Saisie des données	Méthode d'analyse	Effet ou paramètre mesuré ⁴ (unités)	Lignes directrices pour juger de la toxicité ? ⁵
EC 1992	par le logiciel	manuelle ou par établissement d'un graphique par le logiciel ³	CI 50 (% poids/vol.)	non
MICROBICS 1992	par le logiciel	manuelle ou par établissement d'un graphique par le logiciel	CExx (mg/L)	non
MICROBICS 1995a	par le logiciel	manuelle ou par établissement d'un graphique par le logiciel	CExx (% poids/vol.)	non
ASTM 1995	à la main	calculs et graphiques établis à la main	CIxx (% poids/vol.)	oui ⁶
EC 1996a	par le logiciel	graphique établi par le logiciel	CIxx (mg/L)	non
AZUR 1997	par le logiciel	graphique établi par le logiciel	CE 50 (% poids/vol.) ou CE 50 (mg/L)	oui ⁷
AZUR 1998a	<i>n. p.</i> ^{1,2}	graphique établi par le logiciel	CI 50 (mg/L)	oui ⁸
AZUR 1998b	<i>n. p.</i> ^{1,2}	<i>n. p.</i> ^{1,3}	<i>n. p.</i>	non
EC 1999a	par le logiciel	graphique établi par le logiciel	CI 50 (% poids/vol.)	oui ⁹
NICMM 1999	par le logiciel	manuelle ou par établissement d'un graphique par le logiciel	CExx (% poids/vol.)	non

1. *n. p.* = non précisé.

2. On pose que la saisie des données est faite par le logiciel.

3. On pose que le graphique est construit par le logiciel.

4. CE = concentration efficace ; CI = concentration inhibitrice.

5. Lignes directrices particulières, pour juger, d'après l'effet mesuré, si la matière visée par l'essai est toxique ou non.

6. Une CI50 de 0,7% peut représenter un échantillon non toxique renfermant un fort pourcentage d'argiles. Dans ce cas, une CI50 supérieure à 0,1% traduirait une faible toxicité de ce sédiment. Une CI 50 apparente d'au moins 10% est fréquente dans les échantillons non toxiques renfermant moins de particules très fines, de sorte qu'une faible toxicité serait une CI supérieure à 5%.

7. La matière d'essai est toxique lorsque sa CE50 est inférieure à celle de l'échantillon de référence.

8. La matière d'essai est toxique lorsque sa CI50 est inférieure à celle de l'échantillon de référence.

9. La matière d'essai est pratiquement non toxique lorsque sa CI50, corrigée pour tenir compte de l'humidité, est supérieure à 0,5%, légèrement toxique lorsque le même paramètre, également corrigé, se trouve dans l'intervalle de 0,1 à 0,5% et toxique lorsque sa CI50, corrigée pour tenir compte de l'humidité, est inférieure à 0,1%.

16 Normalisation et correction des données pour tenir compte de l'humidité, de la couleur et de la turbidité

Document source	Normalisation pour tenir compte de l'humidité ?	Correction pour tenir compte de la couleur ?	Correction pour tenir compte de la turbidité ?
EC 1992	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>
MICROBICS 1992	non	oui ³	oui ³
MICROBICS 1995a	oui ²	oui ⁴	oui ⁴
ASTM 1995	facultatif	facultatif ^{4,5}	<i>n. p.</i>
EC 1996a	oui	oui	oui
AZUR 1997	<i>n. p.</i>	non ⁶	non ⁷
AZUR 1998a	<i>n. p.</i>	non ⁶	non ⁷
AZUR 1998b	<i>n. p.</i>	non ⁶	non ⁷
EC 1999a	oui ²	non	non
NICMM 1999	oui ²	<i>n. p.</i>	<i>n. p.</i>

1. *n. p.* = non précisé.

2. Utiliser le logiciel Microtox^{MD} pour saisir les données relatives aux sédiments humides ou secs, les corriger et créer automatiquement un nouveau fichier des données corrigées, du poids humide au poids sec.

3. Vérifier la concentration de l'échantillon à la valeur de la CE50 correspondant à la teinte visible ou à la turbidité visible ; si elle correspond à une coloration ou à une turbidité évidente(s), effectuer le protocole de correction de l'effet de la couleur (*Colour Correction Protocol*).

4. Effectuer la correction en employant la valeur correspondante d'un échantillon de référence, conformément à la note 2 du tableau 14 de la présente annexe.

5. Cette correction n'est pas recommandée lorsque l'on possède les résultats d'essais effectués sur un échantillon de référence convenable.

6. Comme la couleur de l'échantillon de référence et celle de l'échantillon ou des échantillons d'essai devraient être semblables, l'effet net de la couleur serait négligeable.

7. Comme la turbidité de l'échantillon de référence et celle de l'échantillon ou des échantillons d'essai devraient être semblables, l'effet net de la turbidité serait négligeable.

17 Maîtrise de la qualité

Document source	Toxique de référence	Sédiment témoin ?	Critère de validité de l'essai de toxicité du sédiment
EC 1992	phénol, zinc, bichromate de potassium, laurylsulfate de sodium	oui ²	Estimation numérique valide de la CIp, d'après les concentrations présentant une inhibition de la luminescence inférieure et supérieure à l'inhibition correspondant à la CIp.
MICROBICS 1992	phénol, zinc	<i>n. p.</i> ^{1,3}	<i>n. p.</i> ¹
MICROBICS 1995a	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ¹	Si la valeur gamma de chaque solution fille est supérieure à 1, il faut reprendre l'essai en utilisant moins de 7 g dans la solution mère.
ASTM 1995	phénol, zinc	oui (ce peut être le sédiment de référence)	Si l'écart-type de la lecture de la luminescence dans trois solutions témoins s'écarte d'environ 12 % de la moyenne, on devrait considérer l'essai comme inacceptable ⁴ .
EC 1996a	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ¹
AZUR 1997	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ^{1,5}
AZUR 1998a	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ^{1,5}
AZUR 1998b	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ¹	<i>n. p.</i> ¹
EC 1999a	sédiment étalon HS-6	sédiment « non contaminé » du banc Roberts	Les CI 50 correspondant à un sédiment « non contaminé » et au sédiment HS-6 se trouvent à l'intérieur de la zone de confiance ($\pm 2 \sigma$) des cartes de contrôle établies respectivement pour ces deux sédiments.
NICMM 1999	zinc	oui ²	Sulfures de l'eau de porosité : < 16,5 mg/L ; pH de l'eau de porosité : 6,5-7,5 ($\pm 0,5$) ; salinité de l'eau de porosité : > 8 ‰ ; CE 50 du toxique de référence (ZnSO ₄) à l'intérieur de la zone délimitée par $\pm 3 \sigma$ de la carte de contrôle ; CE 50 du sédiment témoin : < 1 000 unités de toxicité.

1. *n. p.* = non précisé.

2. L'essai exige l'emploi d'au moins un échantillon de sédiment témoin ou de sédiment de référence (« non contaminé »).

3. Ce mode opératoire fait allusion à des « échantillons témoins » ; cependant, ceux-ci sont décrits comme des « échantillons provenant des parages », qui pourraient présenter une toxicité « naturellement très élevée » (cette description correspond donc à la notion d'*échantillon de référence*).

4. Il est recommandé d'utiliser un toxique de référence pour valider les données obtenues avec différents lots de *réactif* (c'est-à-dire différents lots de bactéries lyophilisées) ou pour les lots utilisés pendant une longue période.

5. Si la valeur de gamma correspondant à chaque solution fille est supérieure à 1,0, on pourrait devoir répéter l'essai en utilisant moins de 7 g dans la solution mère (voir le tableau 5 de la présente annexe). Inversement, si la valeur gamma correspondant à chaque concentration de solution fille est inférieure à 1,0, on pourrait devoir répéter l'essai en utilisant plus de 7 g dans la solution mère.

