PROGRAMME D'ACCRÉDITATION DES LABORATOIRES D'ANALYSE

LIGNES DIRECTRICES CONCERNANT LES TRAVAUX ANALYTIQUES EN TOXICOLOGIE (DR-12-SCA-03)

Mise à jour 20 mars 2018

ENSEMBLE on fait avancer le Québec

Québec

Coordination et rédaction

Cette publication a été réalisée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec du ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC).

Renseignements

Pour tout renseignement complémentaire **:**

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
Ministère du Développement durable, de l'Environnement
et de la Lutte contre les changements climatiques
Complexe scientifique
2700, rue Einstein, bureau E-2-220
Québec (Québec) G1P 3W8

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

Pour vous procurer nos documents, veuillez consulter notre site Web au **www.mddelcc.gouv.qc.ca**, section « CEAEQ » ou au **www.ceaeq.gouv.qc.ca**.

Référence à citer

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie*, DR-12-SCA-03, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2018, 37 p.

Dépôt légal – 2018
Bibliothèque et Archives nationales du Québec
ISBN 978-2-550-80749-0 (PDF)
ISBN 978-2-550-67725-3 (PDF), Édition précédente

Tous droits réservés pour tous les pays.

© Gouvernement du Québec - 2018

AVANT-PROPOS

Ce document s'adresse à tous les laboratoires accrédités en toxicologie par le ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC). Il précise les lignes directrices s'adressant aux laboratoires de toxicologie, lesquelles sont passées en revue lors de l'évaluation des procédures d'assurance et de contrôle de qualité effectuée dans le cadre du *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse* (PALA)[1] basé sur la norme internationale ISO/CEI 17025.

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

La correspondance entre les sections présentées dans ce document et celles apparaissant au chapitre III du PALA est indiquée entre parenthèses au début de chacune des sections.

Les domaines visés par ces lignes directrices sont mentionnés dans le document intitulé *Champs et domaines d'accréditation en vigueur* (DR-12-CDA)[2] .

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS **3**

DÉFINITIONS **6**

1 LOCAUX ET ENVIRONNEMENT (section 5.3) **7**

1.1 Aménagement 7

1.2 Propreté 8

1.3 Conditions ambiantes et système de traitement de l'eau 8

2 MATÉRIEL ET RÉACTIFS (sections 4.6 et 5.9) **9**

2.1 Eau déminéralisée ou ultrapure 9

2.2 Eau pour la détention, l'élevage et les essais de toxicité 9

2.3 Préparation des solutions 12

2.4 Identification et conservation des solutions 12

2.5 Toxiques de référence et autres solutions préparées (section 5.6) 12

2.6 Registre d'inventaire des produits chimiques 13

2.7 Verrerie 13

3 ÉQUIPEMENT (sections 5.5 et 5.6) **14**

3.1 Système d'inventaire de l'équipement 14

3.2 Oxymètre 14

3.3 pH-mètre 14

3.4 Conductimètre 15

3.5 Balances 15

3.6 Thermomètres 15

3.7 Micropipettes 16

3.8 Luxmètre 16

3.9 Réfrigérateurs 17

3.10 Équipement pour l'essai truite avec stabilisation du pH (méthode Env.Can. SPE 1/RM/50) 17

3.11 Autres équipements 17

4 MÉTHODES D'ANALYSE (section 5.4) 18

4.1 Validation des méthodes 18

4.2 Gamme de dilutions et calcul des paramètres d'effet (CI_{50}, CI_{25}, CL_{50}, etc.) 21

4.3 Organismes vivants 22

4.4 Conditions d'essai 28

4.5 Système informationnel (section 5.4.7) 28

5 TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (sections 4.13, 5.8 et 5.10) 29

5.1 Échantillonnage et conservation des échantillons (sections 5.7 et 5.8) 29

5.2 Demande d'analyse et enregistrement des échantillons au laboratoire 30

5.3 Feuilles de travail 30

5.4 Rapport d'essai 31

5.5 Transcription et suivi des données pour les échantillons 32

6 ASSURANCE ET CONTRÔLE DE LA QUALITÉ (sections 5.6 et 5.9) 32

6.1 Essais avec toxique de référence ou échantillon de référence 32

6.2 Diagramme de contrôle 33

6.3 Groupes de contrôle 34

6.4 Critères d'acceptabilité 34

RÉFÉRENCES 35

BIBLIOGRAPHIE 36

DÉFINITIONS

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

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

Paramètre d'effet : Mode d'expression mesurable d'un effet biologique pour une durée d'exposition déterminée (ex. : CI_{25} 7 jours inhibition de la croissance).

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

1 LOCAUX ET ENVIRONNEMENT (section 5.3)

1.1 Aménagement

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

Une surveillance efficace qui limite l'accès aux aires du laboratoire doit être mise en place.

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

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

Les élevages de têtes-de-boule, aussi appelés « ménés à grosse tête », de daphnies, de cériodaphnies et de truites arc-en-ciel sont préférablement maintenus dans des salles séparées. Toutefois, il peut être acceptable de regrouper dans une même salle plus d'une espèce si l'aménagement est approprié, permet un confinement efficace dans des espaces clos et que la circulation d'air est adéquate. Il ne doit pas y avoir de surcharge. Les risques de contamination (bactérienne, virale ou fongique) doivent être réduits et les conditions environnementales spécifiques à chacune des espèces doivent être respectées en tout temps.

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

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

- hotte d'évacuation;
- source adéquate d'approvisionnement en eau pour la détention, l'élevage et les essais de toxicité (voir la section 2.2);
- système de traitement et de conditionnement d'eau (si nécessaire selon la nature de la source d'eau) pour la détention et l'élevage des organismes et pour les essais de toxicité. L'équipement de traitement de l'eau doit être en mesure de respecter les exigences requises (voir tableau section 2.2);
- système de conditionnement de la température pour les salles à température contrôlée;
- système d'air comprimé exempt d'huile ou d'autres contaminants;
- système de ventilation;
- système d'éclairage adéquat, avec photopériode lorsque cela est requis.

1.2 Propreté

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

Elle doit également prendre les dispositions pour favoriser l'ordre et le rangement à l'intérieur des locaux, la libre circulation dans les allées et les corridors et l'accès aux postes de travail.

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

1.3 Conditions ambiantes et système de traitement de l'eau

Les espaces destinés aux élevages, aux cultures et aux essais doivent être sans bruit excessif et sans vibration. Les conditions environnementales (température, photopériode, etc.) spécifiées dans les protocoles analytiques pour les besoins de détention, d'élevage ou de culture des organismes vivants ainsi que pour les essais doivent être respectées en tout temps afin d'assurer l'obtention de résultats fiables. L'équipement de maintien des conditions ambiantes, lorsqu'il est essentiel au respect des conditions de détention, d'élevage, de culture ou d'essai, doit être inventorié, et les entretiens et réparations réalisés doivent être enregistrés. Une température adéquate doit également être maintenue dans les espaces utilisés pour les travaux analytiques. La température des locaux doit aussi convenir au bon fonctionnement de l'équipement.

L'équipement et les systèmes servant au traitement et au conditionnement de la température de l'eau pour la détention et l'élevage des organismes vivants et pour les

essais de toxicité doivent être adéquats et permettre de satisfaire en tout temps aux exigences spécifiées dans les protocoles.

Le mode de fonctionnement du système de traitement de l'eau doit être documenté par écrit et connu du personnel du laboratoire. Le laboratoire doit établir une procédure documentée d'entretien du système précisant la nature et la fréquence de l'entretien et tenir un registre de suivi à cet égard. Les systèmes utilisant un filtre biologique et les systèmes de type « recirculation » ne sont pas acceptés.

2 MATÉRIEL ET RÉACTIFS (sections 4.6 et 5.9)

2.1 Eau déminéralisée ou ultrapure

L'eau déminéralisée ou ultrapure utilisée pour la préparation d'eau de dilution reconstituée ou pour la préparation des solutions de travail doit être vérifiée régulièrement, selon les critères prévus au tableau 1, et des mesures correctives doivent être appliquées, le cas échéant.

Tableau 1 : Paramètres vérifiés et enregistrés selon les fréquences indiquées

Paramètre	Fréquence	Résultat attendu
Conductivité	1/semaine	< 2 µmhos/cm à 25 °C (µS/cm) ou > 0,5 MΩ·cm
Chlore résiduel total	1/mois	< 0,1 mg/l
Métaux (1)	1/année	< 1 µg/l individuel
BHAA	1/4 mois	< 1000 UFC/ml

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

Si les analyses des métaux sont réalisées à l'interne, le laboratoire ne peut utiliser de l'eau provenant du même système d'eau déminéralisée ou ultrapure à titre de blanc d'analyse. Les analyses de métaux doivent être réalisées dans un laboratoire accrédité pour ces analyses.

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

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

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

Elle doit satisfaire aux conditions spécifiées dans les méthodes pour chacune des espèces. Toutefois, dans le but de maintenir la cohérence entre les résultats obtenus par

les différents laboratoires, le pH de l’eau utilisée comme eau de dilution et pour les groupes contrôles lors des essais doit se situer entre 6,8 et 8,2. Cette plage de pH est exigée même si la plupart des méthodes tolèrent des plages plus étendues.

Les paramètres identifiés dans le tableau 2 doivent être vérifiés pour l'eau d'approvisionnement utilisée et enregistrés aux fréquences établies. Pour l'eau reconstituée, se référer à la section 2.1. La qualité de l'eau doit être constante dans le temps. Une fréquence de vérification plus élevée peut être exigée dans les cas où la qualité n’est pas constante.

À noter que la température, l'oxygène dissous et le pH doivent également être mesurés directement dans les bassins de détention et les récipients d'élevage à une fréquence plus élevée. Il en est de même pour l'azote ammoniacal et les nitrites ainsi que pour la dureté selon le cas (voir la section 4.3).

Tableau 2 : Paramètres de vérification de l'eau d'approvisionnement

Paramètre	Fréquence	Critère de qualité[1]
Alcalinité (mg $CaCO_3$/l)	1/6 mois	20-200
Aluminium (mg/l)	1/6 mois	< 0,09
Argent (mg/l)	1/6 mois	< 0,0001
Arsenic (mg/l)	1/6 mois	< 0,005
Azote ammoniacal (mg N/l)	1/6 mois	< 0,5[2]
BHAA (UFC/ml)	1/6 mois	< 2 000
Cadmium (mg/l)	1/6 mois	< 0,0002
Carbone organique total (mg C/l)	1/6 mois	< 30
Chlore résiduel total[3] (mg Cl/l)	1/semaine	< 0,01
Chlorures (mg Cl/l)	1/6 mois	< 120
Chrome (mg/l)	1/6 mois	< 0,002
Cobalt (mg/l)	1/6 mois	< 0,1
Conductivité (µhmos/cm à 25 °C)	1/6 mois	100-400
Cuivre (mg/l)	1/6 mois	< 0,002
Cyanures (mg CN/l)	1/6 mois	< 0,005
Dureté (mg $CaCO_3$/l)	1/6 mois	50-200
Fer (mg/l)	1/6 mois	< 0,3
Fluorures (mg F/l)	1/6 mois	< 0,12
Mercure (mg/l)	1/6 mois	< 0,0001
Nickel (mg/l)	1/6 mois	< 0,03
Nitrates (mg N/l)	1/6 mois	< 2,9
Nitrites (mg N/l)	1/6 mois	< 0,02
Phosphore total (mg P/l)	1/6 mois	< 0,2
Plomb (mg/l)	1/6 mois	< 0,001
Potassium (mg/l)	1/6 mois	< 10
Sodium (mg/l)	1/6 mois	< 25
Sulfates (mg SO_4/l)	1/6 mois	< 500
Zinc (mg/l)	1/6 mois	< 0,03

(1) Critère de qualité ou valeur basée sur les critères de qualité pour la toxicité chronique ou concentration maximale généralement mesurée dans les eaux de surface de l'est du Canada (MDDEFP, 2013; CCME, éd. courante). La limite de détection de l'analyse doit permettre de quantifier au moins le critère ou la valeur minimum spécifiée.

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

(3) Le chlore résiduel total se compose du chlore libre et du chlore combiné.

2.3 Préparation des solutions

Le laboratoire doit disposer d'un cahier ou d'un registre de préparation pour toutes les solutions qui y sont préparées, ce qui inclut les toxiques de référence. Le cahier ou le registre doivent être disponibles au laboratoire.

Les éléments suivants doivent minimalement être indiqués dans le registre :

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

2.4 Identification et conservation des solutions

Les éléments suivants doivent être inscrits sur le contenant de toutes les solutions préparées :

- identification retraçable dans le registre de préparation;
- date de préparation;
- date de péremption ou durée de vie.

2.5 Toxiques de référence et autres solutions préparées (section 5.6)

Les objectifs principaux liés à l'usage des toxiques de référence sont de déterminer la précision des méthodes utilisées, d'effectuer un suivi dans le temps de façon à détecter les séquences d'analyses non conformes et de faire un suivi des variations de sensibilité des organismes vivants. Le toxique de référence agit, d'une part, comme un élément de validation de la méthode en permettant de déterminer la répétabilité et, d'autre part, comme un élément de contrôle de qualité. Il est souhaitable que les toxiques de référence utilisés soient le plus représentatif possible des échantillons réels. L'application des contrôles de la qualité avec les toxiques de référence a démontré que les coefficients de variation mesurés peuvent varier du simple au triple en fonction de la substance utilisée.

Une série de seize essais réalisés avec un mélange de contaminants représentatifs d'un effluent de pâtes et papiers a démontré que le coefficient de variation typique pour ce type d'échantillon se situe autour de 18 % pour l'essai de létalité avec la truite arc-en-ciel. Par ailleurs, le coefficient de variation pour des échantillons de nature inorganique (industries des mines et métaux) est sans doute plus élevé que 20 %, particulièrement avec la truite arc-en-ciel.

La concentration des solutions mères préparées des toxiques de référence doit être vérifiée par analyse chimique. Dans le cas où des solutions mères seraient conservées sur une longue période, le laboratoire doit s'assurer que la concentration demeure stable dans le temps en réalisant des analyses chimiques à intervalle approprié.

2.6 Registre d'inventaire des produits chimiques

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

- nom du fabricant;
- nom du produit;
- numéro de lot;
- date de réception;
- date de péremption (si applicable).

2.7 Verrerie

La verrerie utilisée au laboratoire doit être en bon état et répondre aux besoins des analyses à réaliser. Le nettoyage de la verrerie doit être effectué selon une procédure documentée et adéquate pour les usages en toxicologie environnementale.

La procédure suivante est recommandée :

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

3 ÉQUIPEMENT (sections 5.5 et 5.6)

L'équipement de laboratoire doit être en bon état et conforme aux méthodes d'analyse utilisées. Chaque équipement doit être identifié de façon unique, être relié à un registre d'entretien et de réparation et faire l'objet d'un programme de vérification périodique de la performance. Lorsque cela est possible, le statut d'étalonnage doit être indiqué sur l'équipement. Toutes les activités d'entretien et de réparation doivent être consignées par écrit. L'équipement défectueux ou hors contrôle doit être retiré des opérations et clairement identifié jusqu'à la résolution du problème.

Les instructions du fabricant, si elles sont disponibles, doivent être rendues accessibles dans le laboratoire. De façon générale, tous les instruments doivent être conformes aux spécifications du fabricant et du laboratoire et doivent être vérifiés avant leur mise en service. Des instructions concernant l'utilisation et l'entretien de l'équipement doivent être disponibles et le personnel doit être formé pour l'utilisation de l'équipement.

3.1 Système d'inventaire de l'équipement

Le registre d'inventaire de l'équipement doit contenir, sans s'y limiter, les renseignements suivants :

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

3.2 Oxymètre

Cet instrument doit être étalonné à chaque jour d'utilisation selon la procédure qui convient au type d'instrument utilisé. Cet appareil doit être capable de détecter entre 0 et 100 % de saturation en oxygène.

3.3 pH-mètre

Le pH-mètre doit détecter des variations de 0,1 unité de pH ou moins. Les électrodes doivent être entretenues selon les recommandations du fabricant.

À chaque utilisation, l'appareil doit être étalonné à l'aide d'au moins deux solutions tampons différentes dont les pH se situent de part et d'autre du pH de la solution à mesurer. La valeur de la pente doit être vérifiée afin de s'assurer qu'elle est conforme pour le type d'électrode utilisé et le résultat de la vérification doit être enregistré.

3.4 Conductimètre

À chaque jour d'utilisation, le conductimètre doit être étalonné avec une solution de référence de chlorure de potassium (KCl).

3.5 Balances

Le calibrage de toutes les balances du laboratoire doit être vérifié à l'aide d'un assortiment de poids certifiés, au minimum à une fréquence annuelle et selon une procédure et des critères d'acceptabilité établis. Cette vérification doit être enregistrée. Si la vérification du calibrage est effectuée par une firme externe, celle-ci doit être accréditée par un organisme reconnu. Les poids certifiés doivent être étalonnés au minimum une fois tous les trois ans par un organisme reconnu. L'organisme doit pouvoir fournir un certificat d'étalonnage. Même si la vérification des balances est effectuée par une firme externe, le laboratoire doit avoir en sa possession un assortiment de poids certifiés.

À chaque jour d'utilisation d'une balance, on doit s'assurer qu'elle est au niveau et qu'elle est exempte de poussière. Les balances doivent être placées à l'abri de courants d'air, dans un endroit peu fréquenté du laboratoire et sur une table à l'épreuve des vibrations. On doit s'assurer de la bonne opération de la balance minimalement une fois par semaine d'utilisation à l'aide de poids de référence. Le résultat de cette vérification doit être enregistré, et des actions entreprises lors de dépassement des critères établis.

Note : Cette vérification hebdomadaire ne peut pas être effectuée avec l'assortiment de poids certifiés utilisé pour la vérification annuelle de la balance.

La précision des balances doit être adéquate pour les usages requis. Pour le test d'inhibition de la croissance avec le tête-de-boule, une balance avec une précision de 0,00001 g est requise pour la détermination du poids sec des larves.

3.6 Thermomètres

La graduation des thermomètres utilisés dans les enceintes d'élevage et d'essai doit être égale ou inférieure à 0,5 °C. Toutefois, celle des thermomètres utilisés ne doit pas excéder 0,1 °C pour la mesure de température des échantillons (avant, pendant et après les essais). Tous les thermomètres doivent présenter une identification unique. L'étalonnage est vérifié et enregistré annuellement, à chacune des températures d'utilisation, avec un thermomètre certifié (graduation égale ou inférieure à 0,1 °C). Ce thermomètre doit être étalonné de façon à couvrir la plage des températures utilisées au laboratoire au minimum une fois tous les trois ans par un laboratoire d'étalonnage accrédité par un organisme reconnu. L'organisme doit pouvoir fournir un certificat d'étalonnage. Une instruction d'étalonnage décrivant la marche à suivre doit être disponible au laboratoire. Le laboratoire doit également définir des critères d'acceptabilité qui respectent les exigences des méthodes d'analyse. Une inscription doit figurer sur les thermomètres pour certifier qu'ils ont été vérifiés.

3.6.1 Système d'enregistrement de la température en continu

Un système d'enregistrement de la température en continu peut être utilisé afin d'automatiser la prise des différentes températures. Le laboratoire doit établir une instruction qui définit l'utilisation, l'entretien et la calibration du système, de même que la gestion des critères d'acceptabilité de température. Les sondes devraient être immergées dans un liquide adéquat lorsqu'il est possible de le faire.

Toutes les sondes et tous les lecteurs d'un système d'enregistrement des températures en continu doivent être identifiés. L'inventaire de l'équipement doit indiquer ces éléments et permettre l'association entre le lecteur et la sonde, le cas échéant.

3.6.2 Enregistrement des températures

L'enregistrement des températures doit être effectué à une fréquence minimale d'une fois toutes les heures. Le laboratoire doit définir un critère d'acceptabilité qui respecte les exigences des méthodes d'analyse. Tout dépassement de critère pour une période consécutive de quatre heures ou plus dans le cadre d'une utilisation régulière devra être documenté, et des actions devront être entreprises lorsque requises. Les dépassements enregistrés lors des activités de maintenance doivent être documentés, mais une fois par événement.

La vérification annuelle des sondes avec le thermomètre certifié doit tenir compte de l'association entre la sonde et le lecteur qui y est relié, le cas échéant. La vérification peut être effectuée par une firme externe et les données qui en découlent doivent être disponibles.

3.7 Micropipettes

Les micropipettes utilisées pour les analyses doivent être étalonnées annuellement. Si l'étalonnage est effectué par un organisme externe, celui-ci doit être reconnu et doit fournir un certificat d'étalonnage. Une instruction d'étalonnage décrivant la procédure à suivre et les critères d'acceptabilité pour la vérification doit être disponible. Une inscription doit figurer sur les micropipettes pour certifier qu'elles ont été vérifiées.

3.8 Luxmètre

Cet appareil doit être capable de détecter l'intensité de la lumière ambiante en fonction des exigences des méthodes. Un certificat d'étalonnage valide doit être disponible pour cet appareil.

3.9 Réfrigérateurs

Les réfrigérateurs doivent être propres et tout le matériel à l'intérieur doit être identifié et bien disposé, de façon à éviter les risques de contamination croisée. Les solutions de travail et les échantillons devraient être dans des réfrigérateurs séparés. Il faut s'assurer que le contrôle de la température est bien calibré et qu'il maintient la température à 4 ± 2 °C. La température doit être enregistrée au moins une fois par semaine en utilisant des thermomètres placés à l'intérieur des réfrigérateurs et plongés dans un contenant d'eau ou de glycérol.

3.10 Équipement pour l'essai truite avec stabilisation du pH (méthode Env.Can. SPE 1/RM/50)

L'équipement requis par la méthode SPE 1/RM/50 doit être disponible selon l'option méthodologique choisie.

Entre autres, il faut prévoir pour la technique avec injection de CO_2 :

- une bouteille certifiée de gaz comprimé d'un fournisseur homologué (mélange de 15 % CO_2, 21 % O_2 et 64 % N_2) avec raccord de sortie CGA 590;
- un détendeur CGA 590 en laiton chromé à double détente;
- six débitmètres 150 mm (0-137 ml/min);
- six débitmètres 150 mm (0-300 ml/min).

Pour la technique avec pH-mètre régulateur il faut prévoir, entre autres :

- une bouteille certifiée de gaz comprimé d'un fournisseur homologué (100 % CO_2 ou un mélange de 15 % CO_2, 21 % O_2 et 64 % N_2);
- un bloc détendeur;
- six solénoïdes (un pour chaque concentration d'exposition);
- six pH-mètres régulateurs.

La technique par recyclage de l'air n'est pas recommandée.

3.11 Autres équipements

Tous les autres équipements requis à l'application des protocoles analytiques doivent être disponibles au laboratoire. Plus particulièrement, les chambres environnementales ou les espaces à environnement contrôlé pour les cultures, les élevages et les essais doivent être adéquats pour respecter en tout temps les conditions environnementales exigées (température, photopériode, etc.). Les débitmètres pour l'air et l'eau doivent être étalonnés.

4 MÉTHODES D'ANALYSE (section 5.4)

Le laboratoire doit utiliser les éditions courantes des méthodes d'analyse identifiées dans la demande d'accréditation. Ces méthodes doivent être disponibles dans le laboratoire. Les utilisateurs doivent documenter les méthodes et les appliquer intégralement. Les exigences supplémentaires des présentes lignes directrices doivent également être appliquées. Les méthodes d'analyse employées doivent être documentées et validées, et les utilisateurs doivent les connaître en détail.

4.1 Validation des méthodes

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

4.1.1 Interférence

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

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

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

4.1.2 Variabilité des groupes de contrôle

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

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

4.1.3 Détermination du seuil d'effet de la méthode

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

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

Le *seuil d'effet analytique* est le niveau d'inhibition le plus faible décelable en laboratoire à l'aide d'une méthode spécifique et standardisée et qui est significativement différent des groupes de contrôle pour un niveau de confiance donné. Il varie selon l'espèce utilisée, la réponse biologique mesurée et le schéma expérimental (nombre de réplicats, durée d'exposition, etc.) et correspond à la limite de détection (statistique) de la méthode.

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

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

où

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

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

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

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

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

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

4.1.4 Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité se définit comme suit : pour un niveau donné, l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins un des éléments suivants est différent : l'analyste, le jour ou le système d'essai.

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

Également, la variabilité d'un paramètre d'effet donné (CI_{25} 96 h; CI_{50} 96 h; CI_{90} 96 h; etc.) présentera une ampleur différente selon sa position sur la relation concentration-réponse. L'intervalle de confiance de la mesure de la CI_{50} située au milieu de la courbe concentration-réponse sera plus réduit que celui de la mesure de la CI_{25} située au début de la relation. Dans un contexte de validation de méthode, la répétabilité doit être déterminée pour le paramètre d'effet principal de l'essai.

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

La *reproductibilité* se définit comme suit : pour un niveau donné, l'étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus pour le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes : analyste différent, système d'essai différent, jour différent ou même jour. La reproductibilité est déterminée en participant à des études interlaboratoires ou des études de performance avec des tiers. Les laboratoires n'ont pas l'obligation de déterminer la reproductibilité. Les évaluations de la performance analytique effectuées à l'intérieur du programme d'accréditation peuvent, entre autres, être utilisées à cet effet.

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

Cet intervalle est défini comme suit :

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

où

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

4.1.5 Critères d'acceptabilité

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

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

4.2 Gamme de dilutions et calcul des paramètres d'effet (CI_{50}, CI_{25}, CL_{50}, etc.)

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

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

Les méthodes de calcul généralement utilisées pour les essais avec des données binaires sont la méthode des probits, celle de Spearman-Kärber, la méthode binomiale

ou la moyenne mobile. Chacune de ces méthodes requiert un certain nombre de prérequis et il est important pour un laboratoire de documenter chacune de ces méthodes et de déterminer clairement les limites à l'intérieur desquelles elles peuvent être appliquées.

La détermination des paramètres d'effets sous-létaux à partir des données quantitatives nécessite, quant à elle, l'utilisation de méthodes de régression. Il n'existe pas de modèle unique pouvant s'ajuster à toutes les courbes concentrations-effets. Par contre, la plupart des cas observés peuvent s'ajuster à un des quatre modèles de régression non linéaire suivants : logistique, exponentiel, de Gompertz ou hormétique. La méthode d'interpolation linéaire ne devrait être utilisée que dans les cas où aucun modèle de régression ne convient aux données. Par ailleurs, le calcul des CSEO et CMEO n'est pas recommandé.

Différents logiciels de statistiques peuvent convenir pour les applications en toxicologie. CETIS, *Comprehensive Environmental Toxicity Information System,* est particulièrement bien adapté pour réaliser cette tâche.

4.3 Organismes vivants

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

Les truites arc-en-ciel utilisées pour les essais doivent provenir d'une pisciculture fiable et être exemptes de maladies. À cet égard, la pisciculture doit être en mesure de démontrer l'état de santé (certificat de vétérinaire, registre de suivi, etc.) du lot d'organismes.

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

- provenance et identification taxinomique;
- quantité achetée et âge des poissons;
- date de réception;
- numéro de lot, longueur et poids à l'arrivée;
- nombre de truites mortes/jour;
- suivi du nombre de truites;
- suivi du poids frais moyen individuel dans l'élevage;
- type, quantité et fréquence d'alimentation;
- calcul de la charge en g/l/j;
- comportements ou apparence anormaux;
- observations visuelles pertinentes;
- volume et débit d'eau.

Les bassins de détention doivent être entretenus correctement et désinfectés entre chaque lot de poissons.

Le laboratoire doit également effectuer un suivi chimique de base de l'eau dans les bassins de détention pour les paramètres figurant au tableau 3.

Tableau 3 : Suivi chimique de l'eau des bassins de détention

Paramètre	Fréquence	Critère de qualité
Température	1/jour	13,0 - 17,0 °C
Oxygène dissous	3/semaine	80 à 100 % de saturation
pH	2/semaine	6,0 - 8,5
Azote ammoniacal	1/semaine(2)	< 1,0 mg N/l
Nitrites	1/semaine(2)	< 0,02 mg N/l
Intensité lumineuse (1) avec photopériode 16 h : 8 h	1/2 semaines	100-500 lux

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

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

4.3.2 Daphnie (*Daphnia magna*)

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

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

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

Les données relatives à la mortalité chez les adultes et à la productivité de l'élevage (nombre moyen de néonates par femelle) doivent être compilées et disponibles pour le dernier trimestre précédant la réalisation des essais.

Le laboratoire doit également effectuer un suivi physico-chimique de l'eau dans les élevages pour les paramètres indiqués dans le tableau 4.

Tableau 4 : Suivi de la qualité de l'eau d'élevage - *Daphnia magna*

Paramètre	Fréquence	Critère de qualité
Température	1/jour	18,0 - 22,0 °C
Oxygène dissous	2/semaine	80 - 100 % de saturation
pH	2/semaine	6,5 - 8,5
Dureté (1)	1/semaine	160 - 180 mg $CaCO_3$/l
Intensité lumineuse (2) avec photopériode 16 h : 8 h	1/2 semaines	400 - 1000 lux

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

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

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

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

- date d'achat et de réception;
- fournisseur;
- état du matériel biologique à la réception;
- âge et stade de développement des organismes de chaque envoi;
- nombre d'œufs ou de larves reçus;
- dénombrement des larves écloses (si œufs reçus);
- pourcentage de mortalité des larves;
- température de l'eau au départ du fournisseur et à la réception;
- oxygène dissous de l'eau au départ du fournisseur et à la réception;
- confirmation de l'identification taxinomique de chaque envoi.

Dans le cas d'organismes achetés pour des essais de toxicité immédiats, il est important de respecter l'exigence d'acclimatation qui demande un changement d'au plus 3 °C par jour. Par ailleurs, le pourcentage de mortalité à la réception et dans les 24 h qui précèdent l'essai ne doit pas dépasser 10 %, et il faut s'assurer que les organismes ne sont pas porteurs de maladie. De plus, un essai avec un toxique de référence doit être réalisé pour chaque lot d'organismes provenant d'un fournisseur externe.

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

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

Un suivi de la qualité de l'eau d'élevage doit également être effectué pour les paramètres suivants et selon les fréquences présentées au tableau 5.

Tableau 5 : Suivi de la qualité de l'eau d'élevage - *Pimephales promelas*

Paramètre	Fréquence	Critère de qualité
Température	1/jour	22,0 - 26,0 °C
Oxygène dissous	3/semaine	80 - 100 % de saturation
pH	2/semaine	6,8 - 8,5
Azote ammoniacal	1/semaine(2)	< 0,5 mg N /l
Nitrites	1/semaine(2)	< 0,02 mg N /l
Intensité lumineuse (1) avec photopériode 16 h : 8 h	1/2 semaines	100 - 500 lux

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

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

4.3.4 Algue verte (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

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

- Un certificat d'identification taxinomique de l'espèce délivré par le fournisseur est requis. Si la même souche de *P. subcapitata* est repiquée et conservée au laboratoire depuis une longue période de temps, il est nécessaire d'avoir le certificat original de confirmation ou de faire certifier la souche. Il est possible d'acheter ou de faire certifier une souche d'algue par la *Canadian Phycological Culture Collection* (CPCC).

- La culture d'algues active doit être observée périodiquement (une fois par mois) pour s'assurer de sa monospécificité ainsi que de l'état de santé général de la population. L'observation microscopique permet de détecter la présence d'autres espèces d'algues qui auraient pu contaminer la culture ainsi que des anomalies indicatrices de problèmes potentiels (cellules moribondes, anomalies structurales, manque de coloration, etc.).

- La souche de départ peut être préservée en milieu liquide ou sur gélose à 4 °C pendant une longue période de temps, ce qui s'avère utile lorsque le laboratoire n'effectue pas d'essai pendant de longues périodes. Lorsque le laboratoire effectue des analyses sur une base régulière, les algues doivent être repiquées de façon aseptique environ une fois par semaine dans un milieu frais de façon à toujours disposer de cellules en phase logarithmique de croissance pour le départ des essais.

- Des dénombrements des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA) doivent être effectués régulièrement pour s'assurer que les cultures ne sont pas contaminées. La performance de la population algale dans les conditions de laboratoire doit également être connue. Une fois aux trois mois, la courbe de croissance de la population doit être établie en traçant le graphique de la densité cellulaire (cellules $\times$ 10^6/ml) en fonction du temps en jours.

4.3.5 Cériodaphnie (*Ceriodaphnia dubia*)

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

- confirmation de l'identification taxinomique;
- provenance des organismes;
- densité d'organismes dans les élevages;
- fréquence des renouvellements d'eau dans les élevages en nombre et dans les élevages individuels;
- type d'alimentation, quantité et fréquence;
- âge des génitrices dans les élevages;
- nombre de néonates par ponte par génitrice dans les élevages individuels et moyenne des trois premières couvées;
- pourcentage de mortalité chez les femelles dans les élevages individuels;
- présence d'éphippies.

Un suivi sur la qualité de l'eau d'élevage doit également être effectué pour les paramètres suivants et selon les fréquences présentées au tableau 6.

Tableau 6 : Suivi de la qualité de l'eau d'élevage - *Ceriodaphnia dubia*

Paramètre	Fréquence (1)	Critère de qualité
Température	1/jour	24,0-26,0 °C
Oxygène dissous	2/semaine	90-100 % de saturation
pH	2/semaine	6,0-8,5
Intensité lumineuse (2) avec photopériode 16 h : 8 h	1/2 semaines	100-600 lux

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

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

4.4 Conditions d'essai

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

Dans le cas des demandes d'essai de létalité de la truite arc-en-ciel avec stabilisation du pH, il est de la responsabilité du client du laboratoire de s'assurer que les trois conditions prescrites dans le document de référence SPE 1/RM/50 d'Environnement Canada[3] sont respectées. Ces conditions sont les suivantes : 1) l'ammoniac total doit avoir été mesuré dans l'échantillon antérieur; 2) l'essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel (SPE1/RM/13) avec l'échantillon antérieur a échoué; 3) l'échantillon reçu contient < 1,25 mg/l d'ammoniac non ionisé avant le début de l'essai.

4.5 Système informationnel (section 5.4.7)

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

Les programmes informatiques utilisés pour le calcul des paramètres d'effet doivent provenir de fournisseurs reconnus. S'il y a lieu, les programmes et les méthodes de calcul automatisés qui sont développés à l'interne doivent être validés et vérifiés.

5 TRAÇABILITÉ DE L'INFORMATION (sections 4.13, 5.8 et 5.10)

Le mode d'enregistrement des données constitue un facteur important pour l'obtention de résultats fiables. Tous les renseignements concernant les analyses doivent être enregistrés et disponibles de façon que la direction du laboratoire puisse démontrer que ses activités sont contrôlées. Le laboratoire doit avoir un système défini par écrit permettant d'identifier de façon unique les échantillons à analyser, afin d'assurer qu'en aucun moment il ne puisse y avoir de confusion sur l'identité de ces échantillons. Si un système électronique est utilisé, le laboratoire doit enregistrer la même information que celle exigée dans la présente section. Tous les enregistrements manuscrits doivent être à l'encre.

5.1 Échantillonnage et conservation des échantillons (sections 5.7 et 5.8)

L'échantillonnage, le mode de conservation et le délai de conservation peuvent influencer directement le niveau de toxicité d'un échantillon. Le préleveur doit tenir compte de certaines considérations techniques pour le prélèvement des échantillons. Le laboratoire doit avoir une instruction précisant les exigences de prélèvement et la rendre disponible à la clientèle.

Les échantillons doivent parvenir au laboratoire le plus rapidement possible après le prélèvement. Le démarrage des essais dans les meilleurs délais est considéré comme une bonne pratique de laboratoire susceptible de donner les résultats les plus représentatifs des échantillons. Les délais maximaux de conservation sont précisés dans les protocoles d'analyse; ils sont de trois jours pour les essais chroniques (essais de croissance avec l'algue verte, le tête-de-boule et essai de reproduction avec la cériodaphnie) et de cinq jours pour les essais aiguës (létalité avec la truite arc-en-ciel, la daphnie et le tête-de-boule).

Aucun agent de conservation ne doit être ajouté aux échantillons. Ils doivent être conservés à l'obscurité et, pendant leur transport, les échantillons doivent être refroidis au moyen d'agents réfrigérants tout en étant maintenus au-dessus du point de congélation. Les échantillons reçus entièrement ou partiellement congelés doivent être rejetés. Au laboratoire, les échantillons doivent être conservés au réfrigérateur à 4 ± 2 °C, si on ne procède pas immédiatement à l'analyse.

Si un échantillon est rejeté, il doit y avoir un enregistrement précisant les raisons du rejet.

5.2 Demande d'analyse et enregistrement des échantillons au laboratoire

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

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

* Ne s'applique pas aux laboratoires n'offrant pas de service à la clientèle externe.

5.3 Feuilles de travail

Les feuilles de travail doivent contenir au moins les renseignements suivants :

- numéro de laboratoire;
- date d'analyse;
- mode de conservation de l'échantillon;
- température, pH, oxygène dissous, conductivité et apparence de l'échantillon avant le début de l'essai et dureté s'il y a lieu;
- traitement de l'échantillon;
- âge des organismes, période d'acclimatation et identification du lot, s'il y a lieu;
- données permettant de calculer la charge au début de l'essai avec la truite arc-en-ciel;
- pour les essais avec l'algue : comptes cellulaires de la culture et de départ de l'essai après introduction de l'inoculum, et, compte de l'isoton;
- alimentation (fréquence, quantité et nature) s'il y a lieu;
- renouvellement des solutions (fréquence, volume, nombre d'échantillons et physico-chimie au début et à la fin de chaque période de 24 h) s'il y a lieu;
- série de dilutions (% V/V);
- pH, oxygène dissous et température dans le contrôle et les concentrations d'essai;
- température et intensité lumineuse des chambres environnementales selon le cas;

- mesure de l'effet biologique rapporté, selon le cas, en nombre d'organismes morts et/ou immobiles, en poids sec, en densité cellulaire, nombre de néonates vivantes, etc.;
- résultats exprimés en pourcentage d'effet dans chacune des concentrations et dans le contrôle si applicable;
- toutes autres informations importantes relatives à une modification à la méthode, à l'application d'une procédure optionnelle ou autres précisions et adaptations méthodologiques;
- l'imprimé des calculs produits à l'aide de programmes informatiques doit accompagner les feuilles de travail s'il y a lieu;
- pour l'essai truite avec stabilisation du pH, il faut rapporter en plus les informations prévues à la section 3 de la méthode SPE 1/RM/50, selon la méthode de stabilisation appliquée.

5.4 Rapport d'essai

Le rapport d'essai contient les renseignements suivants :

- un titre;
- le nom et l'adresse du laboratoire, ainsi que le lieu où l'analyse a été effectuée, s'il diffère de l'adresse du laboratoire;
- l'identification unique du rapport d'essai (telle que le numéro de série) et, sur chaque page, une indication permettant d'assurer que la page est reconnue comme faisant partie du rapport, avec une indication claire de la fin du rapport;
- le numéro de laboratoire ou une description non ambiguë de l'échantillon;
- le nom et l'adresse du client s'il y a lieu;
- le nom du projet;
- les dates de prélèvement, de réception et d'analyse;
- le nom du préleveur;
- l'endroit du prélèvement;
- le mode de conservation;
- l'identification de l'échantillon;
- la nature de l'échantillon;
- l'apparence de l'échantillon;
- les caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon avant le début de l'essai : pH, oxygène dissous, conductivité, température, dureté, etc.;
- l'identification de la méthode employée;
- toute divergence, ajout ou suppression par rapport à la méthode d'analyse utilisée;
- la signature du superviseur ou du signataire autorisé du laboratoire et la date d'émission;
- les résultats exprimés dans l'unité appropriée et accompagnés de l'intervalle de confiance à 95 % si applicable;
- un tableau contenant la gamme de dilutions et le pourcentage d'effet de chacune des mesures biologiques à chacune des concentrations et dans le contrôle;

- le type d'essai;
- l'espèce utilisée et sa provenance;
- l'état des organismes (âge, taille, etc.);
- le nombre d'organismes par concentration et le nombre de réplicats;
- l'environnement d'essai;
- les principales conditions d'essai (physico-chimie en cours d'essai, alimentation s'il y a lieu, eau de dilution, volume d'essai, etc.);
- le toxique de référence ou l'échantillon de référence utilisé;
- le résultat le plus récent de contrôle de qualité;
- la moyenne et les limites de ± 2s du diagramme de contrôle;
- la méthode de calcul utilisée si le résultat est calculable.
- pour l'essai truite avec stabilisation du pH, il faut rapporter en plus les informations prévues à la section 3 de la méthode SPE 1/RM/50, selon la méthode de stabilisation appliquée.

5.5 Transcription et suivi des données pour les échantillons

Les évaluateurs retraceront une série d'échantillons par domaine d'accréditation pendant l'évaluation sur site et vérifieront les éléments suivants :

- numéro de l'échantillon dans le registre d'entrée;
- nom du client;
- date de prélèvement;
- date de réception;
- date d'analyse;
- paramètres demandés;
- données brutes de la feuille de travail;
- calcul des résultats d'analyse;
- contrôles de qualité;
- rapport d'essai.

6 ASSURANCE ET CONTRÔLE DE LA QUALITÉ (sections 5.6 et 5.9)

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

6.1 Essais avec toxique de référence ou échantillon de référence

Comme mentionné à la section 2.3, l'usage d'un toxique de référence permet de déterminer la précision des analyses, de faire un suivi de la sensibilité des organismes vivants et de détecter les séquences d'analyse non conformes.

Le laboratoire doit effectuer sur une base régulière des essais avec des toxiques de référence. Ces essais doivent être effectués au moins aux fréquences suivantes :

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

  Minimum d'une fois par mois ou 1/10 essais, jusqu'à concurrence d'une fois par semaine si le laboratoire effectue plus de 10 essais par mois. Un essai par série d'essais si le laboratoire effectue moins d'un essai par mois. Un essai par nouveau lot d'organismes, incluant les organismes achetés d'un fournisseur externe pour des essais de toxicité immédiats (c'est-à-dire : œufs de tête-de-boule).

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

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

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

  Minimum d'une fois par mois ou 1/5 essais, jusqu'à concurrence de deux fois par mois si le laboratoire effectue plus de 10 essais par mois. Un essai par série d'essais si le laboratoire effectue moins d'un essai par mois. Un essai par nouveau lot d'organismes, incluant les organismes achetés d'un fournisseur externe pour des essais de toxicité immédiats (c'est-à-dire : œufs de tête-de-boule).

Des essais supplémentaires avec des toxiques de référence peuvent être nécessaires s'il y a des anomalies telles qu'une hausse anormale du taux de mortalité dans les contrôles, une modification de la qualité de l'eau, des anomalies ou tendances liées au diagramme de contrôle (voir section 6.2), etc.

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

6.2 Diagramme de contrôle

Les résultats obtenus avec les toxiques de référence doivent être présentés sous forme de diagramme de contrôle (moyenne et limites ± 2*s* et ± 3*s*) en utilisant les paramètres d'effet de l'essai.

La méthodologie, les considérations statistiques pour l'établissement de ces diagrammes et leur usage sont explicités dans les documents USEPA (2002) et Environnement Canada (1990; 2005).

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

Une recherche des causes et des mesures de correction doit être effectuée et documentée si le diagramme de contrôle présente des tendances systématiquement à la hausse ou à la baisse, ou si le coefficient de variation demeure élevé (>30 %).

6.3 Groupes de contrôle

Les exigences quant au suivi des groupes de contrôle pour la validation de la méthode d'analyse sont précisées aux sections 4.1.2 et 4.1.3.

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

6.4 Critères d'acceptabilité

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

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

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

RÉFÉRENCES

1. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse : Normes et exigences*, DR-12-PALA, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2012, 77 p.

2. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Champs et domaines d'accréditation en vigueur*, DR-12-CDA, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2017, 39 p.

3. ENVIRONNEMENT CANADA. *Procédure de stabilisation du pH pendant un essai de létalité aiguë d'un effluent d'eau usée chez la truite arc-en-ciel,* Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa, Publication SPE 1/RM/50, 2008, 22 p.

BIBLIOGRAPHIE

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Détermination de la toxicité létale CL_{50} 48h Daphnia magna, MA. 500 - D. mag. 1.1*, Rév. 2, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2016, 18 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue Pseudokirchneriella subcapitata, MA. 500 - S. cap. 1.0*, Rév. 3, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2015, 21 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse : Normes et exigences,* DR-12-PALA, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2012, 77 p.

CONSEIL CANADIEN DES MINISTRES DE L'ENVIRONNEMENT (CCME). *Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*, Winnipeg, Le Conseil, Site web : http://ceqg-rcqe.ccme.ca/?lang=fr.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence,* Série de la protection de l'environnement, Ottawa, Publication SPE 1/RM/12, 1990, 82 p.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule,* Unité de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa, Publication SPE 1/RM/22, 2011, 80 p.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie du cladocère Ceriodaphnia dubia,* Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, 2e éd., Ottawa, Publication SPE 1/RM/21, 2007, 75 p.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Méthode d'essai biologique : essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce,* Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, 2e éd., Ottawa, Publication SPE 1/RM/25, 2007, 56 p.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Méthode d'essai biologique : méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel,* Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, 2e éd., Ottawa, Publication SPE 1/RM/13, décembre 2000 avec modifications**,** mai 2007, 23 p.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité*. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa, Publication SPE1/RM/46, 2005, 263 p.

ENVIRONNEMENT CANADA. *Procédure recommandée pour l'importation d'organismes destinés à des essais de toxicité sublétale*. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa, 1999, 23 p.

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT, DE LA FAUNE ET DES PARCS. *Critères de qualité de l'eau de surface*, 3e éd., Québec, Direction du suivi de l'état de l'environnement, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs, 2013, 508 p. et 16 annexes.

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

Développement durable,
Environnement et Lutte
contre les changements
climatiques

Québec