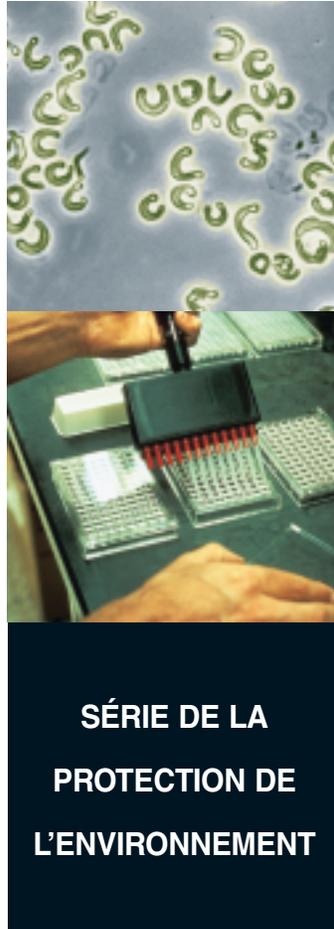


SPE 1/RM/25 – Deuxième édition, mars 2007

Centre des sciences et technologies environnementales
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement Canada



Méthode d'essai biologique : Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce



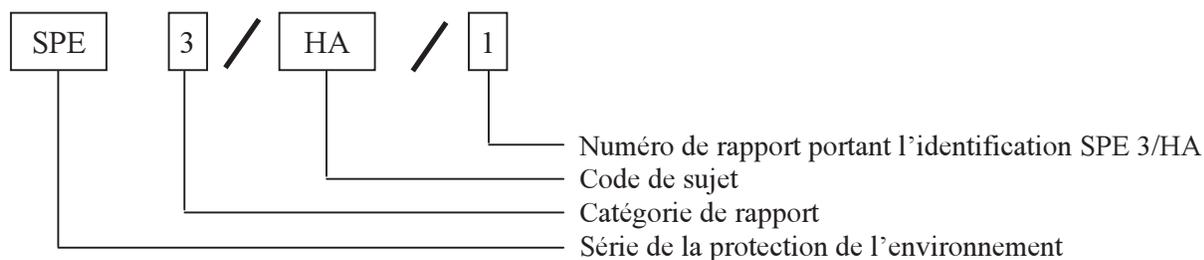
Environnement
Canada

Environment
Canada

Canada

SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

Exemple de numérotation



Catégories

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

Sujets

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

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



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
Centre des sciences et technologies environnementales
Direction générale des sciences et de la technologie
Environnement Canada
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/25
Deuxième édition
Mars 2007

Catalogage avant publication de Bibliothèque et Archives 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, Centre des sciences et technologies environnementales, Environnement Canada. -- 2^e éd.

(Rapport ; SPE 1/RM/25)

Publ. aussi en anglais sous le titre : Biological test method. Growth inhibition test using a freshwater alga

Comprend des réf. bibliogr.

ISBN 978-0-662-73858-9

N^o de cat. : En49-7/1-25F

1. *Pseudokirchneriella subcapitata* – Toxicité.
2. Algues d'eau douce – Toxicologie.
3. Hydrobiologie – Aspect de l'environnement.
 - I. Centre des sciences et technologies environnementales (Canada). Section de l'élaboration et de l'application des méthodes.
 - II. Canada. Environnement Canada.
 - III. Titre: Méthode d'essai biologique. Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce.
 - IV. Coll. : Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/25.

QK569.P98B5614 2007

589.3

C2007-980073-4

Commentaires

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins, chef
Division des méthodes biologiques
Centre des sciences
et technologies environnementales
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

Lisa Taylor, gestionnaire
Section de l'élaboration
et de l'application des méthodes
Centre des sciences
et technologies environnementales
Environnement Canada
335, River Road
Ottawa (Ontario)
K1A 0H3

This report is also available in English from:
Communications Services
Environnement 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'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation quant à l'emploi de ces produits de la part d'Environnement Canada. Il existe d'autres produits de valeur similaire.

Résumé

*Le présent document expose les méthodes recommandées par Environnement Canada pour déterminer la toxicité chronique d'effluents, d'élutriats, de lixiviats, d'eaux réceptrices ou de substances chimiques chez l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*, au moyen de la microtitration sur plaque. Cette deuxième édition du document SPE 1/RM/25, publiée en 2007, remplace la première édition, parue en 1992 (et modifiée en 1997). Elle comporte de nombreuses modifications procédurales, de même que des indications et des instructions à jour qui faciliteront l'exécution de la méthode d'essai biologique.*

Les conditions et méthodes générales ou universelles décrites ici permettent de réaliser des essais d'inhibition chronique de la croissance avec diverses matières ou substances d'essai. Le document précise d'autres conditions et procédures propres à l'évaluation d'échantillons de substances chimiques, d'effluents, d'élutriats, de lixiviats ou d'eaux réceptrices. Il renferme aussi des instructions sur les conditions et règles de culture de l'espèce d'essai, la manipulation et l'entreposage des échantillons, les exigences en matière d'installations d'essai, les procédures entourant la préparation des solutions expérimentales et la mise en route des essais, les conditions prescrites pour les essais, les observations et les mesures pertinentes, les paramètres, les méthodes de calcul et l'utilisation de toxiques de référence.

Abstract

*Methods recommended by Environment Canada for determining the chronic toxicity of effluents, elutriates, leachates, receiving waters, or chemicals to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, using the microplate technique, are described in this report. This second edition of EPS 1/RM/25, published in 2007, supersedes the first edition that was published in 1992 (amended in 1997). It includes numerous procedural modifications as well as updated guidance and instructions to assist in performing the biological test method.*

General or universal conditions and procedures are outlined for conducting a chronic growth inhibition test using a variety of test materials or substances. Additional conditions and procedures are stipulated that are specific for assessing samples of chemicals, effluents, elutriates, leachates, or receiving waters. Included are instructions on culturing conditions and requirements for the test species, sample handling and storage, test facility requirements, procedures for preparing test solutions and test initiation, specified test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, and the use of reference toxicants.

Avant-propos

*Le présent document fait partie d'une collection de **méthodes recommandées** pour la mesure et l'évaluation de l'effet ou des effets toxiques de l'exposition d'une seule espèce d'organisme aquatique ou terrestre à des échantillons de substances ou de matières toxiques ou susceptibles d'être toxiques dans des conditions de laboratoire contrôlées et définies. Environnement Canada a évalué les méthodes recommandées et en préconise l'emploi :*

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

Les différents types d'essais faisant partie de la collection ont été choisis parce qu'ils répondent aux besoins des programmes de protection et de gestion de l'environnement que mène le ministère. Les documents de la collection ont pour objet d'orienter les utilisateurs et de faciliter la mise en œuvre de procédures cohérentes, pertinentes et intégrées en vue d'obtenir des données sur la toxicité, pour les organismes aquatiques ou terrestres, d'échantillons de substances ou de matières d'essai destinées à être dispersées dans l'environnement ou présents dans l'environnement. Selon la ou les méthodes choisies et le milieu naturel visé, les substances ou matières dont la toxicité doit être mesurée pourraient comprendre des échantillons de substances ou de produits chimiques, d'un effluent, d'un lixiviat, d'un éluviat, d'une eau réceptrice, d'un sédiment ou d'une matière particulaire semblable, ou encore d'un sol ou d'une matière particulaire semblable. On trouvera à l'annexe A du présent document la liste des méthodes d'essai biologique et des documents à l'appui publiés jusqu'à maintenant par Environnement Canada dans le cadre de cette collection.

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

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Avant-propos	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xii
Abréviations, symboles et formules chimiques	xiii
Terminologie	xv
Remerciements	xxii

Section 1

Introduction	1
1.1 Principes de la méthode d'essai	1
1.2 Résumé de la technique de microtitration sur plaque	1
1.3 Application, avantages et limites de la technique	2

Section 2

Organismes d'essai	4
2.1 Espèce	4
2.2 Source	4
2.3 Culture.....	5
2.3.1 Milieu de croissance liquide de la culture mère d'algues	5
2.3.2 Milieu de croissance solide de la culture mère d'algues.....	7
2.4 Qualité des organismes d'essai	7

Section 3

Système d'essai	10
3.1 Installations	10
3.2 Équipement	10
3.3 Éclairage	10
3.4 Eau témoin/de dilution.....	10
3.5 Lavage de la verrerie.....	11

Section 4

Procédures d'essai universelles	15
4.1 Configuration de la microplaque	15
4.2 Préparation du milieu d'enrichissement et des solutions d'essai.....	15
4.3 Mise en route de l'essai.....	19
4.3.1 Préparation de l'inoculum algal	19
4.3.2 Préparation des solutions d'essai	20
4.3.3 Distribution des solutions d'essai, de l'inoculum algal et du supplément de nutriments dans la microplaque	21
4.3.4 Incubation et mesure de la concentration cellulaire initiale.....	22
4.3.5 Microplaques de contrôle de la qualité	22
4.4 Conditions expérimentales.....	22
4.5 Observations et mesures	23

4.6	Paramètres et calculs.....	24
4.6.1	Validité de l'essai.....	26
4.6.2	Essais à concentrations multiples.....	26
4.6.3	Effet stimulant.....	28
4.6.4	Autres plans d'expérience.....	29
4.7	Toxique de référence.....	29

Section 5

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité de substances chimiques		31
5.1	Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons.....	31
5.2	Eau témoin/de dilution et récipients d'essai.....	31
5.3	Préparation des solutions d'essai.....	31

Section 6

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat		33
6.1	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons.....	33
6.2	Eau témoin/de dilution.....	33
6.3	Préparation des solutions d'essai.....	34
6.4	Interprétation des résultats.....	34

Section 7

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'eau réceptrice		35
7.1	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons, et préparation des solutions d'essai.....	35
7.2	Eau témoin/de dilution.....	35
7.3	Interprétation des résultats.....	35

Section 8

Rapports à produire		36
8.1	Exigences minimales pour le rapport d'essai.....	36
8.1.1	Substance ou matière d'essai.....	37
8.1.2	Organismes d'essai.....	37
8.1.3	Installations d'essai et appareils.....	37
8.1.4	Eau témoin/de dilution.....	37
8.1.5	Méthode d'essai.....	37
8.1.6	Conditions expérimentales et modes opératoires.....	37
8.1.7	Résultats.....	38
8.2	Exigences supplémentaires.....	38
8.2.1	Substance ou matière d'essai.....	38
8.2.2	Organismes d'essai.....	38
8.2.3	Installations et appareillage.....	39
8.2.4	Eau témoin/de dilution.....	39
8.2.5	Méthode d'essai.....	39
8.2.6	Conditions expérimentales et modes opératoires.....	39
8.2.7	Résultats de l'essai.....	40

Références	41
<i>Annexe A</i>	
Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada.....	44
<i>Annexe B</i>	
Membres du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité	47
<i>Annexe C</i>	
Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada	49
<i>Annexe D</i>	
Procédures générales de maintien de conditions stériles.....	50
<i>Annexe E</i>	
Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques.....	56

Liste des tableaux

1.	Solutions mères nutritives pour le milieu de croissance de la culture mère d'algues	6
2.	Concentration finale de nutriments dans le milieu de croissance liquide de la culture mère d'algues	6
3.	Équipement requis pour l'exécution de l'essai	12
4.	Équipement jetable requis pour l'exécution de l'essai	13
5.	Réactifs requis pour l'exécution de l'essai	14
6.	Eau témoin/de dilution recommandée pour l'exécution de l'essai avec les divers types d'échantillons aqueux	14
7.	Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés pour les essais de toxicité sur microplaque avec l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	16
8.	Concentration finale de nutriments dans le milieu d'essai	19

Liste des figures

1.	Courbes de croissance de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	9
2.	Carte de contrôle d'un toxique de référence	9
3.	Configurations normalisées des microplaques	18
4.	Régression de la concentration de cellules algales sur l'absorbance	25

Abréviations, symboles et formules chimiques

CaCl ₂	chlorure de calcium
CE ₅₀	concentration efficace médiane
CI _p	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet donné
CL ₅₀	concentration létale médiane
cm	centimètre
CMEO	concentration minimale avec effet observé
CoCl ₂	chlorure de cobalt
CSEO	concentration sans effet observé
CuCl ₂	chlorure cuivrique
CuSO ₄	sulfate de cuivre
CV	coefficient de variation
EDTA	acide éthylènediamine-tétracétique (C ₁₀ H ₁₄ O ₈ N ₂)
ET	écart-type
FeCl ₃	chlorure ferrique
g	gramme
g/kg	grammes par kilogramme
h	heure
H ₃ BO ₃	acide borique
HCl	acide chlorhydrique
K ₂ HPO ₄	phosphate de potassium
KCl	chlorure de potassium
kPa	kilopascal
L	litre
MC	marque de commerce
mg	milligramme
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MgSO ₄	sulfate de magnésium
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
MnCl ₂	chlorure de manganèse
mol/L	moles par litre
mS/m	millisiemens par mètre
N	normal
Na ₂ EDTA	acide éthylènediamine-tétracétate disodique
Na ₂ MoO ₄	molybdate de sodium
NaCl	chlorure de sodium
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
NaNO ₃	nitrate de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
nm	nanomètre
nmol	nanomole
p	seuil de probabilité (utilisé en statistique)
t	temps
tr/min	tours par minute
UTCC	Collection de cultures de l'Université de Toronto
v/v	rapport de volume à volume
ZnCl ₂	chlorure de zinc
ZnSO ₄	sulfate de zinc

°C	degré Celsius
µg	microgramme
µL	microlitre
µmhos/cm	micromhos par centimètre
µmol/(m ² · s)	micromoles par mètre carré et par seconde
±	plus ou moins
>	plus de
<	moins de
≥	plus de ou égal à
≤	moins de ou égal à
~	environ
≅	approximativement égal à
≫	beaucoup plus grand que
%	pourcentage ou pour cent
‰	parties par millier

Terminologie

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

Verbes auxiliaires

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

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

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

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

Termes techniques généraux

Absorbance – Quantité de lumière absorbée par les cellules algales. Lorsqu'elle est mesurée à une longueur d'onde particulière, l'absorbance permet d'évaluer indirectement la biomasse algale.

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

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

Culture – Stock d'organismes cultivés dans des conditions définies et contrôlées pour obtenir des sujets d'expérience en bonne santé. Ce terme désigne également l'activité visant à produire de tels sujets.

Culture axénique – Culture d'une espèce totalement exempte de cellules ou d'organismes vivants appartenant à une autre espèce.

Densité cellulaire initiale (des algues) – Concentration de cellules algales dans les alvéoles de la microplaque au début de l'essai; dans le contexte de la présente méthode, la densité cellulaire initiale est de $10\,000 \pm 1\,000$ cellules par millilitre. Syn. : *concentration cellulaire initiale*.

Dureté – Concentration de cations dans l'eau, réagissant avec un savon de sodium pour entraîner la précipitation d'un résidu insoluble. En règle générale, la dureté correspond à la concentration d'ions calcium et magnésium dans l'eau et s'exprime en milligrammes par litre (mg/L) de carbonate de calcium ou l'équivalent.

Émulsifiant – Substance chimique facilitant le mélange fin (sous forme de minuscules gouttelettes), dans l'eau, d'une matière par ailleurs hydrophobe.

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

Fluorescence – Réémission de la lumière absorbée par les pigments de chlorophylle *a* de cellules algales. Lorsqu'elle est quantifiée, la fluorescence peut être utilisée comme mesure indirecte de la biomasse algale.

Inoculum algal – Cellules prélevées dans une culture mère algale liquide, âgée de 3–7 jours, en phase de croissance exponentielle; l'inoculum algal utilisé pour la mise en route de l'essai consiste en une suspension de 220 000 cellules par millilitre.

Lux – Unité d'éclairement mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,092 9 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 lux. Pour convertir des lux en flux quantique [$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$], il faut connaître la qualité spectrale de la source lumineuse. Les conditions de luminosité ou l'irradiance sont exprimées sous forme de flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'onde photosynthétiquement efficaces d'environ 400 à 700 nm. Le lien entre flux quantique et lux (ou pied-bougie) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles. Néanmoins, le facteur de conversion entre flux quantique et lux pour une lumière fluorescente « blanc froid » est approximativement donné par la relation $1 \text{ lux} \cong 0,014 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ (Deitzer, 1994; Sager et McFarlane, 1997).

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

Photopériode – Durée de l'éclairement (et de l'obscurité) sur 24 h.

Pourcentage (%) – Concentration exprimée en parties par centaine. Un pour cent (1 %) d'une matière représente une unité ou partie de celle-ci (p. ex. effluent, éluviat, lixiviat ou eau réceptrice) diluée dans l'eau pour constituer en tout 100 parties. Les concentrations peuvent être préparées selon un rapport de volume à volume, de masse à masse ou encore, ce qui est moins précis, de masse à volume, et sont exprimées sous forme de pourcentage de la matière ou de la substance d'essai dans la solution finale.

Précipitation – Formation d'un solide (le précipité) à partir d'une solution.

Prétraitement – Traitement ou dilution d'un échantillon avant d'y exposer des algues.

Surfactif – Substance chimique tensioactive (p. ex. un détergent) qui, lorsqu'on l'ajoute à un liquide non aqueux, abaisse la tension superficielle et facilite la dispersion de la substance dans l'eau.

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

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

Termes relatifs aux matières ou substances d'essais

- Eau d'amont* – Eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau ou d'un lac) ne subissant pas l'influence de la matière ou de la substance d'essai parce qu'elle en est éloignée en direction opposée au courant ou qu'elle s'en trouve suffisamment loin perpendiculairement au courant.
- Eau de dilution* – Eau servant à diluer une matière ou une substance d'essai à différentes concentrations aux fins d'un essai toxicologique comportant divers traitements.
- Eau déchlorée* – Eau chlorée (généralement, eau potable municipale) que l'on a traitée afin d'en éliminer le chlore et ses composés.
- Eau désionisée* – Eau que l'on a purifiée en la faisant circuler dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.
- Eau distillée* – Eau ayant été traitée dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre matériau pour la débarrasser de ses impuretés.
- Eau réactive* – Eau Millipore Super Q^{MC} ou eau équivalente, exempte de particules, d'ions, de molécules organiques et de micro-organismes d'un diamètre supérieur à 0,45 µm. Syn. : eau de qualité réactif.
- Eau réceptrice* – Eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau ou d'un lac) dans laquelle ont été rejetées ou sont sur le point d'être rejetées des matières résiduelles (p. ex. cette eau pourrait être en amont du point de rejet). Il faut en donner une description étoffée pour préciser ce dont il s'agit.
- Eau reconstituée* – Eau désionisée ou distillée sous verre à laquelle des produits chimiques réactifs ont été ajoutés. L'eau douce synthétique qui en résulte est exempte de contaminants et possède le pH et la dureté souhaités.
- Eau témoin/de dilution* – Eau utilisée pour le témoin de l'échantillon et pour diluer la substance d'essai aux fins de la préparation des différentes concentrations qui serviront aux divers traitements compris dans l'essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Il peut s'agir d'eau réactive, d'eau réceptrice non contaminée, d'eau d'amont, d'eau souterraine non contaminée, d'eau de surface (provenant d'un cours d'eau ou d'un lac), d'eau municipale déchlorée ou d'eau reconstituée.
- Eau usée* – Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les éluviats.
- Échantillon pour essai* – Échantillon aqueux devant faire l'objet d'un essai. Il peut provenir de solutions mères de substances chimiques ou avoir été prélevé dans des effluents, des éluviats, des lixiviats ou des eaux réceptrices.
- Effluent* – Tout déchet liquide (p. ex. industriel, urbain) rejeté dans le milieu aquatique.
- Éluviat* – Solution aqueuse obtenue après addition d'eau à une matière solide (p. ex. sédiments, stériles, boues de forage, matières draguées), par brassage du mélange, par centrifugation ou filtration de celui-ci ou par décantation du surnageant.

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

Microplaque de contrôle de la qualité – Microplaque dont chaque alvéole ne contient que 200 µL d'eau réactive, 10 µL de milieu d'enrichissement et 10 µL d'inoculum algal. Elle représente les conditions optimales de croissance des algues pour un ensemble donné de conditions expérimentales et pour une période d'exposition préétablie.

Produit chimique – V. substance chimique.

Solution d'essai – Solution aqueuse d'un échantillon préparé pour l'essai, auquel on a ajouté ou non un milieu d'enrichissement et un inoculum algal.

Solution mère – Solution aqueuse concentrée de la matière d'essai. On ajoute des quantités mesurées d'une solution mère à l'eau de dilution pour préparer les concentrations voulues des solutions d'essai.

Substance chimique – Tout élément, composé, préparation ou mélange de substances qui pourraient pénétrer dans le milieu aquatique par le biais d'un déversement, d'un épandage, d'une pulvérisation ou d'un rejet. Les insecticides, les herbicides, les fongicides, les larvicides employés dans la lutte contre la lamproie marine, de même que les agents de traitement des déversements d'hydrocarbure, constituent des exemples de telles substances.

Témoin de l'échantillon – Dans une enquête ou une étude, traitement reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Le témoin de l'échantillon doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de matière ou de substance d'essai. Dans la présente méthode d'essai biologique, ce terme désigne le groupe d'alvéoles d'une microplaque contenant 200 µL d'eau témoin/de dilution, 10 µL de milieu d'enrichissement et 10 µL d'inoculum algal. V. *témoin normalisé*.

Témoin normalisé – Traitement témoin utilisé pour démontrer l'absence de toxicité mesurable attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex. qualité de l'eau témoin/de dilution, santé ou manipulation des organismes d'essai). Dans la présente méthode d'essai biologique, ce terme désigne le groupe d'alvéoles d'une microplaque contenant 200 µL d'eau réactive, 10 µL de milieu d'enrichissement et 10 µL d'inoculum algal. Aussi appelé *témoin normalisé préparé avec de l'eau réactive*. V. également *témoin de l'échantillon*.

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

Termes relatifs aux statistiques et à la toxicologie

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

CE₅₀ ou *concentration efficace médiane* – Concentration d'une matière dans l'eau (exprimée en mg/L, p. ex.), qui est censée avoir un effet toxique subléthal défini chez 50 % des organismes d'essai. Dans la plupart des cas, la *CE₅₀* et ses limites de confiance à 95 % sont dérivées de l'analyse statistique d'un effet observé à diverses concentrations, après une période fixe d'exposition. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex. *CE₅₀ 72 h*). Bien que ce terme soit fréquemment utilisé pour désigner l'estimation de la toxicité dans les essais avec des algues, cet usage n'est pas approprié.

CI₅₀ ou *concentration inhibitrice médiane* – Concentration censée causer une réduction de 50 % de la croissance des organismes exposés par comparaison avec les organismes témoins. La durée d'exposition doit être précisée : par exemple, la *CI₅₀* du taux de croissance au cours d'un essai de 72 h sera appelée « *CI₅₀ 72 h* ».

CI_p ou *concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet donné* – Estimation ponctuelle de la concentration d'une matière ou d'une substance d'essai qui provoque un pourcentage donné d'atteinte à une fonction biologique quantitative, comme le rendement cellulaire algal.

CMEO ou *concentration minimale avec effet observé* – Concentration la plus faible d'une matière ou d'une substance d'essai à laquelle des organismes sont exposés, qui provoque chez ces organismes des effets nocifs observables et statistiquement significatifs par comparaison avec les organismes témoins.

Coefficient de variation (CV) – Écart-type (ET) divisé par la moyenne, habituellement exprimé sous forme de pourcentage.

CSEO ou *concentration sans effet observé* – Concentration la plus élevée d'une matière ou d'une substance d'essai à laquelle des organismes sont exposés et qui ne provoque aucun changement significatif observable de la croissance des algues par comparaison avec les organismes témoins.

Effet stimulant – Désigne le rendement amélioré (c.-à-d. la « stimulation ») observé à une ou plusieurs concentrations expérimentales par rapport au rendement du traitement témoin. Dans le présent document, désigne spécifiquement l'amélioration du rendement : a) à une ou plusieurs des concentrations expérimentales les plus élevées ou b) à toutes les concentrations expérimentales. L'*hormèse* est un sous-ensemble spécifique d'un effet stimulant. (V. aussi *hormèse*.)

Essai sans renouvellement des solutions – Essai toxicologique au cours duquel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées.

Essai toxicologique ou *essai de toxicité* – Méthode servant à déterminer l'effet d'une matière sur un groupe d'organismes choisis, dans des conditions définies. Un essai toxicologique en milieu aquatique permet généralement de mesurer : a) la proportion des organismes atteints (*essai quantique*) ou b) l'intensité de l'effet observé (*gradué* ou *quantitatif*), après exposition à des concentrations données d'une substance chimique, d'un effluent, d'un éluat, d'un lixiviat ou d'une eau réceptrice.

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

Hormèse – Phénomène par lequel de faibles concentrations de la matière ou de la substance d’essai stimulent le rendement des organismes d’essai, par comparaison avec les organismes témoins (autrement dit, il y a amélioration du rendement à une ou plusieurs faibles concentrations par comparaison avec le traitement témoin). Pour qu’il y ait hormèse, cette stimulation doit s’accompagner d’une inhibition à des concentrations expérimentales plus élevées. L’hormèse est un sous-ensemble spécifique d’un *effet stimulant*. (V. aussi *effet stimulant*.)

Limite d’action – Limite, calculée logarithmiquement, située à plus ou moins trois écarts-types (± 3 ET), de part et d’autre de la moyenne géométrique historique des paramètres de mesure d’essais toxicologiques effectués avec un toxique de référence.

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

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

Paramètre – Variable (p. ex. délai, réaction des organismes d’essai) indiquant la fin d’un essai; mesure ou valeur (il peut y en avoir plus d’une) dérivées caractérisant les résultats de l’essai (p. ex. CSEO, CI_p).

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

Rendement cellulaire – Modification de la concentration algale à la fin de la période d’exposition, par rapport à la densité cellulaire initiale.

Subléta – Qui a un effet néfaste sur l’organisme, mais en deçà de la concentration ou du niveau de contamination causant directement la mort au cours de l’essai.

Test de Mann-Kendall – Test statistique servant à déceler les tendances des données (sur la croissance algale dans les alvéoles du témoin normalisé, p. ex.). Comme il s’agit d’un test non paramétrique, il n’est pas nécessaire que les données suivent une distribution normale. Le test fait appel uniquement à des ordres de grandeur relatifs des données plutôt qu’à des valeurs mesurées (Gilbert, 1987).

Test de Mann-Whitney – Test statistique servant à déterminer si deux échantillons diffèrent l’un de l’autre (et plus particulièrement s’il existe des écarts de dispersion entre deux échantillons indépendants). Comme il s’agit d’un test non paramétrique, il n’est pas nécessaire que les données suivent une distribution normale. Les données brutes sont converties en rangs avant le début du test. On considère que ce dernier est un équivalent non paramétrique du test t. Aussi appelé test de Wilcoxon-Mann-Whitney, test de Wilcoxon ou, tout simplement, test U (Zar, 1999; EC, 2005).

Toxicité – Capacité propre d’une matière de provoquer des effets nocifs chez des organismes vivants.

Toxicité chronique – Effets à long terme liés à des changements de métabolisme, de croissance, de reproduction ou d’aptitude à la survie. Dans l’essai dont il est question ici, la toxicité chronique est un effet nocif (léthal ou subléthal) observable chez les organismes d’essai exposés pendant 72 h à une substance ou matière d’essai.

Remerciements

La première édition du présent document a été rédigée en collaboration par D. St-Laurent [Centre Saint-Laurent, Longueuil (Qué.)], G.L. Stephenson [Ecological Services for Planning Ltd., Guelph (Ont.)] et K.E. Day [Institut national de recherche sur les eaux, Burlington (Ont.)]. G. Sergy et R. Scroggins (Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Environnement Canada), en leur qualité d'autorité scientifique, ont orienté les travaux.

Nous souhaitons remercier les membres du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (v. l'annexe B), qui ont participé activement à l'élaboration et à l'examen du document. Nous tenons à souligner l'appui du personnel de laboratoire du Centre Saint-Laurent, d'Environnement Canada (annexe C). Nous remercions en particulier C. Blaise, M. Harwood, G. Costan, R. Legault et J. Warner de leur apport technique.

Les personnes suivantes, qui ont examiné les versions initiale et définitive de la première édition, ont formulé de nombreuses observations et suggestions judicieuses : J.-F. Féraud (Centre des sciences de l'environnement, Metz, France), E.T. Howell [Direction des ressources en eau, Ministère de l'Environnement de l'Ontario, Toronto (Ont.)], H. Peterson [Saskatchewan Research Council, Saskatoon (Sask.)], C. Boutin [Service canadien de la faune, Gatineau (Qué.)], D. McLeay [McLeay Associates Ltd., West Vancouver (C.-B.)], C. Bastien et G. Joubert [Ministère de l'Environnement du Québec, Sainte-Foy (Qué.)], J. Greene [Oregon State University, Corvallis (OR)], P. Couture [Université du Québec à Rimouski, Rimouski (Qué.)], Y. Roy [Analex Inc., Laval (Qué.)], B. Dutka et A. Kwan [Institut national de recherche sur les eaux, Environnement Canada, Burlington (Ont.)], J. Warner [Eco-North Laboratories, Parry Sound (Ont.)], J. Sprague [Sprague Associates Ltd., Guelph (Ont.)] et G.F. Atkinson [Division de la statistique appliquée, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)].

Nous tenons à remercier M. Harwood (Environnement Canada) et D. Rodrigue (Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Environnement Canada) pour leur apport technique lors de la préparation des modifications apportées à cette méthode en 1997.

La présente édition (la deuxième) a été préparée par L. Van der Vliet (Division des méthodes biologiques, Environnement Canada), avec l'aide et les conseils de L. Taylor (gestionnaire, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes) et de R. Scroggins (chef, Division des méthodes biologiques), du Centre des sciences et technologies environnementales, Environnement Canada, Ottawa (Ont.), de même que de M. Harwood [Environnement Canada, Montréal (Qué.)], sans compter le soutien de J. Michaud [Environnement Canada, Montréal (Qué.)] et de J. Acreman [UTCC, Université de Toronto, Toronto (Ont.)]. Cette édition comprend de nombreuses mises à jour, comme la modification des milieux d'essai et l'utilisation d'analyses de régression des données relatives aux paramètres quantitatifs. Le personnel des laboratoires canadiens mettant en œuvre la méthode d'essai décrite ici a fait parvenir à la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes un grand nombre d'observations et de suggestions ayant trait aux modifications à apporter à la première édition. Ces observations et suggestions ont été prises en compte pendant la préparation de cette deuxième édition du rapport SPE 1/RM/25.

Photographies de la page couverture : Christian Blaise, Direction de l'écotoxicologie et des écosystèmes, Centre Saint-Laurent, Environnement Canada.

Section 1

Introduction

On ne peut s'attendre à ce qu'une seule méthode d'essai ou un seul organisme d'essai réponde aux besoins d'une démarche globale visant la conservation et la protection de l'environnement. L'application des mesures préventives et correctives nécessaires pour gérer l'environnement exige l'utilisation efficace d'une batterie choisie d'*essais toxicologiques* en milieu aquatique bien définis. En collaboration avec le Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité (v. l'annexe B), Sergy (1987) a proposé un ensemble d'essais qui serait d'un emploi généralement acceptable et qui permettrait de mesurer différents types d'effets toxiques chez divers organismes. L'essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*¹, au moyen de la technique de microtitration sur plaque, comptait parmi les essais toxicologiques en milieu aquatique que l'on a choisi de normaliser suffisamment pour satisfaire aux exigences d'Environnement Canada en matière d'essais.

Dans le passé, on évaluait la phytotoxicité des substances à l'aide d'essais normalisés en bouteille, avec des algues (OCDE, 1984; CEE, 1988; ISO, 1989; USEPA, 2002). Le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec a publié récemment une méthode d'essai avec des algues, fondée sur un mode opératoire de l'USEPA (2002); cette méthode modifiée exige de moins grands volumes d'essai et ne comporte pas l'ajout d'EDTA au milieu d'essai (CEAEQ, 2005). Cependant, la technique de microtitration sur plaque (Blaise, 1984, 1986; Blaise et coll., 1986, 1988), qui présente plusieurs avantages par rapport à l'essai en bouteille (Blanck, 1987; Blaise et coll., 1988; Blaise, 1991), a été utilisée pour évaluer la *toxicité* de substances individuelles et d'*effluents*

industriels chez des algues (Thellen et coll., 1989; Warner, 1990; Blaise et Harwood, 1991; St-Laurent et coll., 1992; Scroggins et coll., 2002). Le présent document expose en détail les modes opératoires normalisés pour l'exécution d'essais d'inhibition de la croissance d'algues à l'aide de cette technique.

1.1 Principes de la méthode d'essai

Une *culture* de *P. subcapitata* en croissance exponentielle est exposée, dans un système de microtitration *sans renouvellement des solutions*, à différentes concentrations d'une substance d'essai ou à une série de dilutions d'un effluent ou d'un mélange, pendant plusieurs générations, dans des conditions définies. On compare la croissance des algues exposées à celle d'algues témoins durant une période déterminée. Une substance d'essai est considérée comme toxique lorsqu'on observe une inhibition statistiquement significative de la croissance des algues en fonction de la concentration.

1.2 Résumé de la technique de microtitration sur plaque

La technique de microtitration sur plaque est une version simplifiée de l'essai en bouteille normalisé par l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA) (Miller et coll., 1978; USEPA, 2002). Elle comporte l'utilisation de volumes de *solution d'essai* mesurés en microlitres dans des microplaques à 96 alvéoles, plutôt que de volumes mesurés en millilitres dans des fioles individuelles. Les solutions d'essai sont préparées et réparties dans les alvéoles selon un schéma prédéterminé. On verse dans chaque alvéole 200 µL de solution d'essai, 10 µL de supplément de nutriment et 10 µL d'*inoculum algal*. Après incubation de la microplaque à une température constante et sous éclairage continu

¹ Autrefois appelée *Selenastrum capricornutum*.

pendant 72 h, on mesure la concentration d'algues (c.-à-d. le nombre de cellules par millilitre) à l'aide d'un compteur électronique de particules ou d'un hématimètre. Le *rendement cellulaire* sert de substitut à la biomasse algale. On compare ensuite le nombre de cellules algales dans les concentrations d'essai au nombre relevé dans les solutions témoins.

L'*absorbance* et la *fluorescence* constituent deux techniques de numération de rechange. Toutefois, avant d'y recourir, on doit avoir démontré que la technique choisie donne un rapport constant, quantifiable et fiable en regard du rendement cellulaire. En outre, les mesures de l'absorbance ou de la fluorescence dans les échantillons peuvent servir à la condition que les solutions d'essai contenant l'inoculum algal, versées dans les alvéoles des microplaques, aient été centrifugées au moyen d'une centrifugeuse munie d'une tête spéciale pour microplaques et que les cellules algales soient remises en suspension dans une solution limpide avant de procéder aux calculs des *paramètres* (v. 4.5 pour les modalités d'application).

1.3 Application, avantages et limites de la technique

L'essai d'inhibition de la croissance d'algues au moyen de la microtitration sur plaque est un essai d'évaluation préalable de la phytotoxicité, qui permet d'accroître l'efficacité du traitement des échantillons, comparativement à l'essai classique en bouteille. Les avantages de cette technique ont été examinés en détail dans d'autres publications (Blaise, 1986, 1991; Thellen et coll., 1989) et peuvent se résumer comme suit :

- L'essai requiert un faible volume d'échantillon et d'algues et nécessite moins d'espace pour l'incubation que les essais en bouteille.
- Les microplaques et les pointes de pipette sont jetables, ce qui supprime les possibilités de contamination liées à la réutilisation de la

verrerie et réduit le temps requis pour le lavage de la verrerie après les essais².

- On peut facilement traiter plusieurs répétitions de chaque concentration d'essai, de même qu'un plus grand nombre d'échantillons pendant une période donnée.
- Il est possible d'automatiser l'essai.

Des efforts concertés ont été déployés en vue de réduire au minimum les inconvénients et les limites de la microtitration sur plaque; toutefois, comme pour tout essai toxicologique normalisé, la technique comporte des limites intrinsèques qui peuvent ou non lui être propres. Ces limites sont les suivantes :

- Des substances volatiles pourraient inhiber la croissance des algues dans d'autres alvéoles de la microplaque. Lorsque la volatilité entre en compte, on doit isoler les concentrations d'essai les unes des autres en employant des microplaques distinctes ou des pellicules d'étanchéité en polyester.
- La filtration de l'échantillon avant l'essai peut réduire de façon significative la toxicité de l'effluent ou du mélange.
- Des concentrations élevées de matières organiques dissoutes pourraient fausser les résultats de l'essai.
- Les changements du *pH* des solutions d'essai dans les alvéoles pourraient dépendre de la concentration et influencer sur la toxicité de la substance d'essai.
- Une croissance des algues supérieure à celle observée chez les témoins pourrait se produire s'il se trouvait un excès de nutriments dans l'*échantillon pour essai*.

² Il convient de souligner que, pour les essais sur des substances chimiques seulement, il faut utiliser des microplaques en verre (à moins que le laboratoire n'ait mené des essais parallèles confirmant que des microplaques en polystyrène peuvent être utilisées; v. 3.2).

- L'adsorption de la substance d'essai sur la microplaque pourrait masquer la toxicité en réduisant la biodisponibilité de cette substance pour les algues.
- Il est crucial que la culture soit saine, qu'elle ne soit pas contaminée par d'autres espèces d'algues ou de micro-organismes et qu'elle soit en phase de croissance exponentielle.
- L'essai doit durer 72 h.
- Les compteurs électroniques de particules ne font pas la distinction entre les cellules algales vivantes et celles qui sont mortes.

Malgré ces inconvénients ou limites intrinsèques, l'essai d'inhibition de la croissance d'algues effectué au moyen de la microtitration sur plaque a été utilisé efficacement pour l'évaluation préalable de la toxicité de substances et de mélanges chimiques (Thellen et coll., 1989; St-Laurent et coll., 1992). Dans la mesure du possible, le texte renferme des suggestions et des recommandations visant à réduire au minimum les effets des limites intrinsèques.

Section 2

Organismes d'essai

2.1 Espèce

Pseudokirchneriella subcapitata est une algue verte (Chlorophyceae) unicellulaire non motile, en forme de croissant (de 40 à 60 μm^3), qui est présente dans la plupart des eaux douces de l'Amérique du Nord. Elle peut être aisément cultivée en laboratoire et l'on peut se la procurer facilement auprès de fournisseurs fiables. Sa morphologie uniforme la rend idéale pour les numérations au compteur électronique de particules. *P. subcapitata* s'agglutine rarement, car elle ne possède pas de structures complexes et ne forme pas de chaînes. Sa croissance est suffisamment rapide pour que l'on puisse mesurer avec précision le rendement cellulaire après 72 h, et l'espèce est modérément sensible aux substances toxiques.

On recommande d'utiliser pour l'essai décrit ici les souches UTCC 37, ATCC 22662 ou UTEX 1648 de *P. subcapitata*. Certaines algues possèdent des structures très complexes destinées à former des colonies ou des chaînes, mais ce n'est pas le cas de cette espèce. Bien que la présente méthode d'essai ait été mise au point spécifiquement pour *P. subcapitata*, on peut également utiliser d'autres espèces d'algues (Blanck et Björnsäter, 1989; Warner, 1990; Day, communication personnelle; Peterson, données inédites); cependant, il faudra procéder à d'autres recherches sur les conditions expérimentales (p. ex. intensité lumineuse, durée de l'essai) avant de pouvoir normaliser l'essai avec d'autres espèces.

2.2 Source

Fournisseur canadien fiable de *P. subcapitata* :

Collection de cultures de l'Université de Toronto (UTCC)
 Département d'écologie et de biologie évolutionniste
 Université de Toronto
 Toronto (Ont.)
 Canada M5S 3B2
 Téléphone : (416) 978-3641
 Télécopieur : (416) 978-5878
 Courriel : jacreman@botany.utoronto.ca
 Site Web : <http://www.botany.utoronto.ca/utcc>
Pseudokirchneriella subcapitata : UTCC 37

Fournisseurs étatsuniens fiables de
P. subcapitata :

- a) American Type Culture Collection (ATCC)
 P.O. Box 1549
 Manassas, VA
 U.S.A. 20108
 Téléphone : 1-800-638-6597
 Télécopieur : (703) 365-2750
 Courriel : Bouton « Contact Us » du site Web
 Site Web : <http://www.atcc.org/>
Pseudokirchneriella subcapitata : ATCC 22662
- b) Culture Collection of Algae (UTEX)
 The University of Texas at Austin
 1 University Station A6700
 Austin, TX
 U.S.A. 78712-0183
 Téléphone : (512) 471-4019
 Télécopieur : (512) 471-0354
 Courriel : utalgae@uts.cc.utexas.edu
 Site Web : <http://www.bio.utexas.edu/research/utex/>
Pseudokirchneriella subcapitata (listée sous le nom de *Selenastrum capricornutum*) : UTEX 1648

L'UTCC fournit les algues sous forme de cultures liquides axéniques ou sur gélose inclinée. L'ATCC livre, dans de la glace carbonique, des ampoules de cultures liquides cryopréservées qu'il faut remettre en suspension dans un milieu de croissance. La culture fournie par l'UTEX est disponible sur gélose inclinée de 10 mL.

L'origine de l'espèce d'algue disponible auprès des fournisseurs mentionnés ci-dessus est l'Institut norvégien de recherches sur l'eau.

L'algue a été isolée en 1948 par Olav Skulberg et son nom a été remplacé par celui de *Raphidocelis subcapitata* (Nygaard et coll., 1986).

Ankistrodesmus bibraianus, *Monoraphidium capricornutum* et *Selenastrum minutum* en sont des écophènes étroitement apparentés. Dans la documentation, cette espèce est couramment désignée sous le nom de *P. subcapitata*.

2.3 Culture

Les algues devraient être cultivées et gardées dans un laboratoire où l'on peut contrôler la température et l'éclairage. On devrait isoler la culture de l'enceinte où les essais de toxicité ont lieu, afin de réduire au minimum le risque de contamination par des substances volatiles provenant des solutions d'essai.

La culture « de départ » de *P. subcapitata* pourrait se trouver sur une gélose inclinée, être sous forme liquide ou avoir été cryopréservée dans une ampoule sous forme de granule sèche. Elle peut être entreposée à 4 °C et demeurer viable pour au moins 6 mois. Il faut se procurer une nouvelle culture tous les 12 mois. On doit transférer la culture « de départ » en asepsie³ dans un milieu de croissance défini et l'y remettre en suspension afin de constituer une culture mère d'où proviendront les organismes utilisés pour les essais. Tous les 2 mois, on doit démarrer à partir de la culture de « départ » une nouvelle culture algale aux fins des essais toxicologiques.

2.3.1 Milieu de croissance liquide de la culture mère d'algues

Le milieu de croissance de la culture mère d'algues se compose de 5 solutions mères nutritives et d'eau réactive. On prépare ces 5 solutions dans des fioles jaugées en utilisant des substances chimiques et de l'eau réactive (v. le tableau 1). Ces préparations sont 1 000 fois plus concentrées que le milieu de croissance des algues.

Pour préparer le milieu de croissance liquide des cultures mères d'algues, ajouter 1 mL de chaque solution mère nutritive, dans l'ordre (1, 2, 3, 4 et 5), à environ 900 mL d'eau réactive, puis porter le volume à 1 L avec de l'eau réactive, dans une fiole jaugée de 1 000 mL. Bien mélanger entre chaque addition. Rajuster le pH final à $7,5 \pm 0,1$ avec de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 1 N. Les concentrations finales de nutriments dans le milieu de croissance liquide des cultures mères d'algues sont données au tableau 2. Le milieu réduit au minimum les changements de pH durant 72 h.

Le milieu de croissance devrait être stérilisé par filtration sous un vide d'au plus 50,7 kPa (380 mm Hg), à l'aide d'un dispositif stérile et d'une membrane prélavée à pores de 0,2 µm. Il n'est pas recommandé de le stériliser à l'autoclave, car ce procédé réduit la croissance des algues.

Placer le milieu stérilisé par filtration dans des fioles Erlenmeyer stériles munies de bouchons stériles. On peut entreposer ce milieu dans l'obscurité, à 4 °C, jusqu'à six mois. Son volume est déterminé par la quantité totale de cellules algales requise pour un essai de toxicité; consulter la sous-section 4.3 pour le calcul de ce volume. On recommande un rapport volume/fiole de 20 % afin d'éviter une inhibition de la croissance causée par une limitation du monoxyde de carbone (p. ex. 25 mL de milieu dans une fiole de 125 mL, 50 mL dans une fiole de 250 mL, 100 mL dans une fiole de 500 mL).

Transférer en asepsie, dans la fiole Erlenmeyer contenant le milieu de croissance liquide, 1 mL de la culture algale « de départ », à l'aide d'une pipette stérile jetable, ou encore un groupe de cellules, à l'aide d'une anse stérile. Incuber les cultures mères d'algues à 24 ± 2 °C sous une lampe fluorescente « blanc froid » assurant un éclairage en spectre continu de 4 000 lux à la surface de la fiole [le flux quantique lumineux devrait être d'environ $56 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$].

³ V. l'annexe D pour des indications générales concernant le maintien de conditions stériles.

Tableau 1. Solutions mères nutritives pour le milieu de croissance de la culture mère d'algues

Solution mère nutritive	Composé	Quantité par 500 mL d'eau réactive
1	NaNO ₃	12,75 g
2	MgCl ₂ · 6H ₂ O	5,0 g
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,21 g
	H ₃ BO ₃	92,76 mg
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	207,81 mg
	ZnCl ₂	1,64 mg ^a
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,714 ^b
	CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,006 mg ^c
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3,63 mg ^d
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	80,0 mg
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	150,0 mg ^e
3	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,35 g
4	K ₂ HPO ₄	0,522 g
5	NaHCO ₃	7,5 g

^a ZnCl₂ – Peser 164 mg et porter le volume à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 2.

^b CoCl₂ · 6H₂O – Peser 71,4 mg et porter le volume à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 2.

^c CuCl₂ · 2H₂O – Peser 60,0 mg et porter le volume à 1 000 mL. Prendre 1 mL de cette solution et porter le volume à 10 mL. Ajouter 1 mL de cette seconde solution à la solution mère n° 2.

^d Na₂MoO₄ · 2H₂O – Peser 363 mg et porter le volume à 100 mL. Ajouter 1 mL de cette solution à la solution mère n° 2.

^e Si l'on utilise cette solution mère pour les essais sur des substances métalliques en milieu aqueux ou des effluents de mines de métaux, il faut préparer et employer une solution mère distincte qui donnera une concentration finale correspondant à 25 % du volume total de Na₂EDTA · 2H₂O. Si la solution est préparée conformément au tableau ci-dessus aux fins des essais, ce volume serait de 37,5 mg/500 mL. Le volume originel (150,0 mg) est toujours utilisé pour les cultures.

Tableau 2. Concentration finale de nutriments dans le milieu de croissance liquide de la culture mère d'algues

Macronutriment	Concentration (mg/L)	Élément	Concentration (mg/L)
NaNO ₃	25,5	N	4,20
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10,0	Mg	2,65
CaCl ₂ · 2H ₂ O	4,42	Ca	1,20
MgSO ₄ · 7H ₂ O	14,7	S	1,91
K ₂ HPO ₄	1,04	P	0,186
		K	0,469
NaHCO ₃	15,0	Na	11,0
		C	2,14
Micronutriment	Concentration (µg/L)	Élément	Concentration (µg/L)
H ₃ BO ₃	185,52	B	32,44
MnCl ₂ · 4H ₂ O	415,62	Mn	115,38
ZnCl ₂	3,28	Zn	1,57
CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,43	Co	0,35
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,012	Cu	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	7,26	Mo	2,88
FeCl ₃ · 6H ₂ O	160	Fe	33,1
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	300	-	-

On devrait placer la fiole sur un agitateur en continu réglé à 100 tr/min ou l'agiter à la main deux fois par jour. La culture d'algues peut prendre de 7 à 14 jours pour atteindre la phase de croissance exponentielle; elle est alors d'un vert soutenu et la concentration cellulaire atteint entre 2×10^6 et 3×10^6 cellules par millilitre.

On devrait renouveler la culture chaque semaine afin de disposer d'un approvisionnement régulier de cellules en croissance exponentielle. À cette fin, transférer en aseptie, dans une fiole contenant un milieu de croissance liquide frais, 1,0 mL d'une culture mère inoculée depuis 3 à 7 jours en moyenne. On doit vérifier la pureté de la culture mère à chaque transfert : on en examine un sous-échantillon au microscope pour détecter toute contamination par des micro-organismes, et l'on en transfère 1 mL dans des boîtes de Petri contenant un milieu nutritif bactérien solide (p. ex. gélose de comptage sur plaque), que l'on incube à 24 °C durant 48 h. Cette procédure devrait révéler la présence de bactéries contaminantes qui ne peuvent être détectées au microscope, même à fort grossissement.

2.3.2 *Milieu de croissance solide de la culture mère d'algues*

Pour assurer la pureté de la culture, on transfère périodiquement des cellules provenant d'une culture liquide sur un milieu de culture solide stérile, selon la méthode de l'ensemencement en stries. Le milieu solide peut ensuite servir à isoler des colonies de *P. subcapitata* pour produire des cultures mères pures en milieu liquide.

Pour obtenir le milieu de culture solide, préparer le milieu de culture liquide décrit en 2.3.1, puis ajouter 1 % de gélose et chauffer pour dissoudre. Stériliser à l'autoclave à 98 kPa ($1,1 \text{ kg/cm}^2$) et à 121 °C durant 30 min ou à raison de 10 min par litre, la durée la plus longue étant retenue. Verser en aseptie dans des boîtes de Petri, couvrir et laisser refroidir. Les boîtes de Petri contenant le milieu de culture solide peuvent être entreposées à l'envers, dans l'obscurité et à 4 °C, pendant 3 mois au plus.

Dans des conditions d'asepsie et en appliquant la méthode de l'ensemencement en stries, transférer les cellules algales d'une culture liquide sur le milieu de culture solide stérile, et incuber les boîtes à l'envers dans les mêmes conditions que celles appliquées aux cultures (c.-à-d. 24 ± 2 °C, éclairage fluorescent « blanc froid » en spectre continu, intensité lumineuse de 4 000 lux; aucune agitation n'est nécessaire) jusqu'à ce que les colonies soient visibles (environ 2 semaines). Tous les 2 mois, il faudrait démarrer une culture mère liquide à partir d'une colonie isolée du milieu de croissance solide. Les cellules demeureront viables jusqu'à 3 mois si les boîtes de Petri colonisées sont entreposées à 4 °C dans l'obscurité. Les cellules algales utilisées pour les essais ne devraient pas provenir de la première culture mère préparée à partir d'une culture « de départ » en phase solide (gélose inclinée).

2.4 *Qualité des organismes d'essai*

L'espèce d'algue utilisée pour les essais doit être identifiée par examen microscopique et confirmée par un taxinomiste spécialiste des algues. Un examen microscopique régulier de la culture mère d'algues permet en outre d'évaluer l'état de santé de la culture sous le rapport de la morphologie et de la couleur des cellules, de leur agglutination et de la contamination par des micro-organismes. On doit évaluer l'état de santé et le rendement de la culture en mesurant régulièrement le taux de croissance (v. la figure 1a) et la sensibilité relative de la culture algale à un *toxique de référence* (v. la figure 2 et la sous-section 4.7).

Il est important d'évaluer régulièrement le rendement et l'état de santé de l'espèce d'algue utilisée dans la méthode d'essai biologique décrite ici. Il faut tracer à cette fin une courbe de croissance des algues à partir d'un inoculum de la culture mère, sur 8–10 jours, en utilisant une fiole Erlenmeyer (figure 1a). On recommande d'établir une courbe de croissance au moins 4 fois par année, obligatoirement au moins 2 fois par année. Si le laboratoire procède à des essais avec des algues pendant toute l'année, il devrait établir les

courbes de croissance tous les 5–6 mois; si les essais sont saisonniers (p. ex. pendant les mois d'été), les courbes devraient être établies au début et à la fin de la période d'essai de l'année en cause⁴.

À partir d'une culture mère d'algues, soit en moyenne dans les 3–7 jours suivant l'inoculation, on transfère un inoculum de cellules algales en asepsie dans une fiole Erlenmeyer contenant un milieu de culture frais, puis on l'incube en suivant les recommandations données en 2.3.1. À $t = \text{jour } 0$ et chaque jour qui suit, on prélève en asepsie une aliquote de la fiole Erlenmeyer et l'on dénombre les cellules. On met fin à cette procédure lorsque la phase plateau est atteinte, habituellement entre les jours 8 et 10 (la phase de croissance exponentielle est normalement observée entre les jours 3 et 7). Les conditions de culture devraient être examinées si la phase de croissance exponentielle n'est pas atteinte dans les 3–7 jours et/ou si la phase plateau n'est pas atteinte dans les 8–10 jours.

Bien que l'utilisation de *microplaques de contrôle de la qualité* soit facultative, on peut y avoir recours pour évaluer la croissance algale et surveiller toute dérive du pH dans les conditions d'essai. Ainsi, trois microplaques distinctes contenant chacune 220 μL d'eau réactive dans les alvéoles périphériques et 200 μL d'eau réactive plus 10 μL d'*inoculum algal* et 10 μL de milieu d'enrichissement dans les alvéoles intérieures sont scellées et incubées dans les mêmes conditions que les microplaques

servant aux essais. À $t = 0$ h, dénombrer les cellules dans au moins 6 alvéoles (exclure les alvéoles périphériques) choisies au hasard dans la première microplaque, et mesurer le pH dans 6 autres alvéoles. De l'eau réactive (220 μL) est ajoutée dans chacune des alvéoles ayant servi à ces mesures et la microplaque est replacée dans l'incubateur. La même microplaque est utilisée pour dénombrer les cellules et mesurer le pH à $t = 24$ h, mais dans d'autres alvéoles. À $t = 48$ h, dénombrer les cellules et mesurer le pH dans au moins 6 alvéoles (exclure les alvéoles périphériques) choisies au hasard dans la deuxième microplaque. Les mêmes opérations sont effectuées à $t = 72$ h avec la troisième microplaque. Le pH (entre $t = 0$ h et $t = 72$ h) ne devrait pas varier de plus de 1,5 unité. Si l'écart est plus grand, il y aurait lieu d'examiner les conditions de culture.

Les résultats permettent d'établir une courbe de croissance sur 72 h (figure 1b). La croissance algale moyenne à $t = 72$ h donne une valeur de référence à laquelle on peut comparer le rendement des alvéoles témoins d'une microplaque servant aux essais. Ce type de courbe de croissance sert à d'autres fins que celle établie à l'aide d'une fiole Erlenmeyer selon la procédure décrite pour la figure 1a. L'utilisation des microplaques de contrôle de la qualité pour établir une courbe de croissance renseigne l'utilisateur sur l'état de santé des algues dans des conditions d'essai normales sur 72 h.

⁴ Dans les deux cas, on suppose que les courbes de croissance sont établies 2 fois par année. Si leur établissement est plus fréquent, il faudrait s'assurer d'englober la période d'essai.

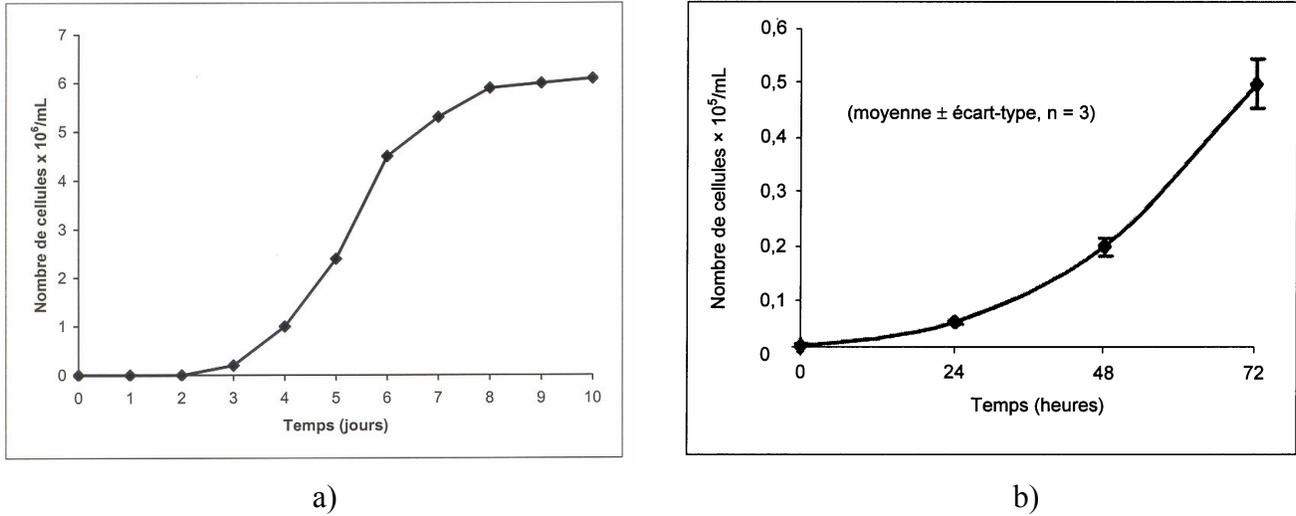


Figure 1. Courbes de croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*

a) courbe de croissance sur 8–10 jours, établie à l'aide d'une fiole Erlenmeyer; b) courbe de croissance sur 72 h, établie à l'aide de microplaques de contrôle de la qualité.

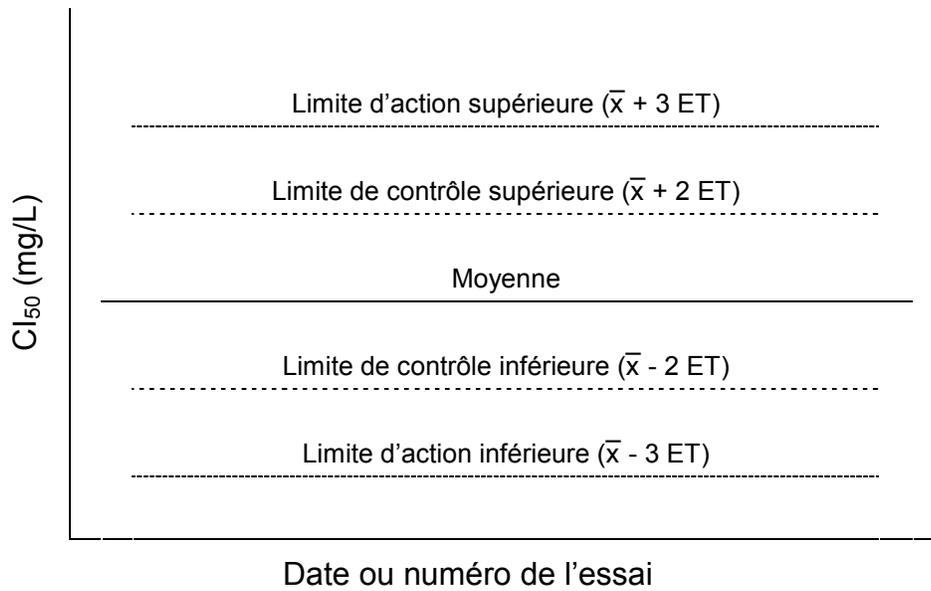


Figure 2. Carte de contrôle d'un toxique de référence

Adapté de EC (1990). Les procédures d'utilisation de cette carte sont décrites en 4.7.

Systeme d'essai

3.1 Installations

L'essai d'inhibition de la croissance d'algues sur microplaque devrait être réalisé dans une installation où la température et l'éclairage peuvent être réglés et surveillés de façon continue. Il est recommandé d'utiliser une enceinte environnementale ou un incubateur isolé de l'installation consacrée à la culture des algues. L'enceinte doit posséder les caractéristiques recommandées concernant le type d'essai, la température ainsi que la qualité et l'intensité de l'éclairage (v. 3.3). Elle devrait être bien ventilée, exempte de poussières et de vapeurs toxiques et protégée des perturbations externes excessives. Les conditions expérimentales devraient être uniformes dans toute l'enceinte et identiques à celles de l'installation de culture.

3.2 Équipement

Tous les instruments nécessaires aux mesures courantes des variables chimiques, physiques et biologiques de base doivent être maintenus en bon état et étalonnés régulièrement. Tout l'équipement qui vient en contact avec les organismes d'essai, l'eau réactive, les solutions nutritives, les milieux de croissance, le milieu d'enrichissement ou les solutions d'essai doit être fait de matériaux chimiquement inertes (p. ex. verre, acier inoxydable, plastique, porcelaine), être propre et être exempt de substances pouvant influencer sur l'essai (v. 3.4). L'équipement ne doit pas être fait de cuivre, de zinc, de laiton, de métal galvanisé, de plomb ou de caoutchouc naturel. Avant d'être utilisé, l'équipement n'ayant pas servi antérieurement dans des essais doit être lavé dans l'eau de dilution et subir des essais destinés à démontrer qu'il n'est pas cytotoxique.

Les tableaux 3, 4 et 5 donnent la liste de l'équipement et des réactifs dont on a besoin pour l'essai. Les microplaques à utiliser comptent

96 alvéoles, sont constituées de polystyrène rigide et sont stériles et jetables. Il est recommandé d'employer des microplaques non traitées. Si l'on a recours à un compteur électronique de particules ou à une technique de numération manuelle, il faut utiliser des microplaques aux alvéoles à fond en U; on se servira de plaques aux alvéoles à fond plat dans le cas de la méthode photométrique. Pour les essais sur des substances chimiques, il faut utiliser des microplaques en verre pour limiter la sorption. Si le laboratoire peut démontrer, par des comparaisons parallèles, que la sorption de la substance d'essai sur le polystyrène n'excède pas celle sur le verre, il peut utiliser des microplaques en polystyrène.

3.3 Éclairage

Les conditions d'éclairage auxquelles sont soumises les algues devraient être conformes à celles décrites en 2.3.1. Il faut utiliser un éclairage fluorescent « blanc froid »; l'intensité lumineuse à la surface des récipients d'essai doit être de $4\,000 \pm 400$ lux [flux quantique d'environ $56 \pm 6 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$].

3.4 Eau témoin/de dilution

Dans un essai donné, la même eau doit servir à préparer les dilutions des échantillons et les témoins. Le choix de l'eau témoin/de dilution dépend des objectifs de l'étude et de la matière ou de la substance d'essai, de même que de la logistique, des considérations pratiques et des coûts du prélèvement, de la manipulation et du transport des échantillons. Ces facteurs pourraient donc mener au choix du type précis d'eau témoin/de dilution qui convient le mieux à la situation : eau réactive, eau réceptrice non contaminée, eau d'« amont », eau souterraine non contaminée, eau de surface (provenant d'un cours d'eau ou d'un lac, ou eau municipale déchlorée)

ou *eau reconstituée*. À l'exception des cas où l'eau réactive sert d'eau témoin/de dilution, on doit inclure dans l'essai des *témoins normalisés* préparés avec de l'eau réactive, de même que des *témoins de l'échantillon*. L'intégration systématique d'un témoin normalisé préparé avec de l'eau réactive permet d'évaluer la toxicité de l'eau de dilution choisie.

Le tableau 6 indique l'eau témoin/de dilution recommandée pour les divers types d'échantillons aqueux. Toute eau témoin/de dilution prélevée sur le terrain doit être passée sur un filtre de 0,45 µm avant son emploi, afin de réduire la possibilité d'une contamination par des algues indigènes.

3.5 *Lavage de la verrerie*

Toute la verrerie réutilisable (fioles Erlenmeyer et fioles jaugées, éprouvettes graduées, béchers, etc.) doit être nettoyée et traitée de façon à éliminer tous les métaux et composés organiques à l'état de traces. Il est recommandé d'avoir recours à la méthode suivante :

- laver la verrerie avec une solution détergente non phosphatée;
- au moyen d'une brosse à soies dures, détacher toute matière adhérant à la paroi intérieure de la verrerie;

- rincer trois fois à l'eau du robinet;
- rincer avec une solution de nettoyage (mélange sulfochromique ou l'équivalent);
- dans le cas des grands contenants, remplir partiellement et faire tourner de façon à rincer toute la paroi intérieure;
- rincer trois fois à l'eau du robinet;
- rincer avec une solution de HCl à 50 % (v/v) (dans le cas des grands contenants, remplir partiellement et faire tourner de façon à rincer toute la paroi intérieure);
- rincer trois fois à l'*eau désionisée*;
- placer dans une étuve à 105 °C jusqu'à siccité;
- couvrir l'ouverture de chaque contenant avec un papier d'aluminium ou un autre type de fermeture convenable et entreposer.

L'équipement réutilisable qui est fait d'un matériau autre que le verre et qui peut résister au traitement recommandé doit être lavé selon cette méthode.

Tableau 3. Équipement requis pour l'exécution de l'essai

-
- Hématimètre ou compteur électronique de particules pour la numération des cellules algales
 - Enceinte environnementale ou incubateur
 - Système de purification d'eau Millipore Super Q^{MC} (ou l'équivalent)
 - Réfrigérateur

 - Microscope à contraste de phase donnant un grossissement de 100 à 400
 - Centrifugeuse : capacité de 4×15 mL; force centrifuge relative de $2000 \times g$ [$1,33 \times 10^{-7} \text{ m}^3/(\text{kg} \cdot \text{s}^2)$]; godets ou supports basculants pour tubes à centrifuger et/ou pour microplaques
 - Calculatrice
 - Miroir de lecture

 - Brûleur et source de gaz
 - Micropipettes multicanaux numériques ajustables : une d'une capacité de 10 à 100 μL ; une d'une capacité de 100 à 1 000 μL
 - Porte-tubes : un pour tubes de 20 mm; un pour tubes de 40 mm
 - Anse à inoculation et support

 - Balance analytique et spatule de pesée
 - Flaon laveur
 - Fioles jaugées d'une capacité de 100, 500 et 1 000 mL
 - pH-mètre ou papier indicateur de pH
 - Microplaques en verre (pour les essais sur des substances chimiques seulement)

 - Appareillage de filtration : porte-filtre en acier inoxydable de 47 mm; fiole à filtration de 1 L; pompe à vide avec tubulure
 - Agitateur magnétique et barreaux d'agitation
 - Fioles Erlenmeyer en verre allant de 125 mL à 4 L, suivant le nombre d'organismes en phase de croissance exponentielle requis pour l'inoculation (v. 2.3)

 - Éprouvettes graduées en verre de 25, 50, 100, 500 et 1 000 mL
 - Bécher en verre de 1 L
 - Thermoscelleuse
 - Photomètre à échelle de 0 à 10 000 lux

Facultatif

- Fluoromètre pour microplaques
 - Photomètre pour microplaques
-

Tableau 4. Équipement jetable requis pour l'exécution de l'essai

-
- Microplaques stériles jetables, en polystyrène rigide, à 96 alvéoles (capacité d'environ 0,25 mL); il est recommandé d'utiliser des microplaques non traitées; sont exigées des microplaques aux alvéoles à fond en U pour les compteurs électroniques de particules (compteur Coulter) et la numération manuelle (hématimètre) et des microplaques aux alvéoles à fond plat pour la méthode photométrique (lecteur de microplaques)
 - Pipettes sérologiques stériles jetables (de 1 mL et de 10 mL)
 - Pointes de pipettes microlitres stériles jetables, pour les pipettes microlitres et multicanaux
 - Réservoirs en plastique stériles jetables
 - Tubes à essai en verre stériles jetables (de 16 mm sur 150 mm)
 - Tubes à centrifuger stériles jetables avec bouchons à vis (de 15 mL et de 50 mL)
 - Sacs en plastique transparent scellables (de 16 cm sur 20 cm environ)
 - Godets en plastique transparent (de 20 mL)
 - Boîtes de Petri stériles jetables (de 100 mm sur 15 mm)
 - Membrane de filtration (à pores de 0,20 μm et de 0,45 μm)
 - Papier d'aluminium
 - Coupelles de pesée
 - Pipettes Pasteur en verre
 - Lames de verre pour recouvrir l'hématimètre
 - Microsphères d'étalonnage pour le compteur électronique de particules : on recommande des particules en latex de polystyrène divinylbenzène d'un diamètre de 8,7 μm
 - Pellicule adhésive en polyester pour microplaques
-

Tableau 5. Réactifs requis pour l'exécution de l'essai

-
- Des produits chimiques réactifs doivent être utilisés dans tous les essais
 - Eau réactive : eau Millipore Super Q^{MC} ou eau de qualité équivalente (c.-à-d. exempte d'ions, de molécules organiques, de particules et de micro-organismes d'un diamètre supérieur à 0,45 µm)
 - Toxique(s) de référence
 - Produits de nettoyage : détergent non phosphaté disponible dans le commerce, acide sulfochromique et acide chlorhydrique
 - Diluant isotonique : NaCl 0,15 mol/L, KCl 3,0 nmol/L, tampon phosphaté 15 nmol/L (pH 7,5)
 - Solutions tampons certifiées à pH de 4, 7 et 10 pour l'étalonnage du pH-mètre
 - Solutions mères nutritives (v. 2.3.1 et le tableau 1)
 - Milieu de culture liquide (v. 2.3.1)
 - Milieu de culture solide (v. 2.3.2)
 - Milieu d'enrichissement (v. 4.2)
 - Solutions d'eau et de bicarbonate
 - Solutions de NaOH et de HCl $\leq 1 N$
 - Inoculum algal de *P. subcapitata* provenant d'une culture mère d'algues âgée de 3 à 7 jours et en phase de croissance exponentielle
-

Tableau 6. Eau témoin/de dilution recommandée pour l'exécution de l'essai avec les divers types d'échantillons aqueux

Effluents, <i>élutriats</i> , <i>lixiviats</i>	Eau réactive ou eau réceptrice
Eaux réceptrices	Eau réactive ou eau d'amont
Toxiques de référence	Eau réactive
Substances chimiques	Eau réactive ou eau réceptrice

Procédures d'essai universelles

Les procédures énoncées dans la présente section s'appliquent à tous les types d'échantillons aqueux et à toutes les substances chimiques d'essai. Tous les aspects du système d'essai présenté à la section 3 doivent être intégrés dans les procédures d'essai universelles. Des procédures additionnelles s'appliquant à des échantillons de substances chimiques (avec ou sans constituants volatils), d'effluents, d'élutriats, de lixiviats et d'eaux réceptrices sont exposées aux sections 5, 6 et 7.

Les procédures et conditions de base applicables à tous les essais d'inhibition de la croissance d'algues sur microplaque sont résumées au tableau 7 et décrites en détail dans les sous-sections suivantes.

4.1 Configuration de la microplaque

Les configurations recommandées pour les essais de toxicité effectués avec ou sans eau réactive comme eau témoin/de dilution⁵ sont illustrées à la figure 3.

Les alvéoles périphériques de la microplaque sont exclues de l'essai à cause d'un « effet de bordure » associé aux microplaques : les pertes par évaporation y sont plus importantes que dans les autres alvéoles et causent une variabilité inutile entre les répétitions. Néanmoins, on les remplit d'eau réactive afin de saturer d'humidité leur espace libre, ce qui réduit au minimum les pertes par évaporation dans les alvéoles intérieures. Les pertes par évaporation des solutions d'essai ne devraient pas dépasser 10 % durant l'incubation. L'insertion, au centre de la plaque, d'une rangée de répétitions du témoin (p. ex. la rangée D, figure 3), parallèle au

gradient des concentrations d'essai, permet de détecter une contamination éventuelle par les substances toxiques volatiles des alvéoles adjacentes. Si l'eau témoin/de dilution utilisée n'est pas de l'eau réactive, il faut ajouter une rangée additionnelle de témoins (p. ex. la rangée E, figure 3). La sous-section 4.6 renferme des indications sur les méthodes statistiques tenant compte de l'hétérogénéité des estimations du rendement cellulaire attribuable à des substances volatiles ou à d'autres causes.

4.2 Préparation du milieu d'enrichissement et des solutions d'essai

L'inhibition de la croissance des algues dans l'essai peut être attribuée à la toxicité de la solution d'essai et/ou à sa carence en nutriments. L'ajout d'un supplément de nutriments (ou milieu d'enrichissement) de 10 µL dans chaque alvéole de traitement permet d'éliminer les faux négatifs dus à des carences en nutriments, et l'on s'assure ainsi que les cellules algales peuvent se reproduire à un niveau mesurable et acceptable au cours de l'incubation.

Le supplément de nutriments provient d'un milieu d'enrichissement que l'on prépare en ajoutant 13,75 mL de chacune des 5 solutions mères nutritives mentionnées au tableau 1 à environ 800 mL d'eau réactive, puis en portant le volume à 1 L avec ce même type d'eau⁶. La concentration finale de chaque nutriment dans les alvéoles de traitement est indiquée au tableau 8.

⁵ V. la sous-section 3.4, qui présente les options et recommandations quant au choix de l'eau témoin/de dilution.

⁶ Si l'essai porte sur des substances métalliques en milieu aqueux ou sur des effluents de mines de métaux, les solutions mères et les volumes utilisés doivent donner une concentration finale correspondant à 25 % du volume total. Compte tenu des solutions mères mentionnées au tableau 1 et des volumes précisés ici, la teneur en Na₂EDTA · 2H₂O de la solution mère n° 2 devrait être de 37,5 mg/500 mL.

Tableau 7. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés pour les essais de toxicité sur microplaque avec l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*

Méthodes universelles	
Type d'essai	– Essai sans renouvellement des solutions, d'une durée de 72 h
Contenant	– Microplaque en polystyrène à 96 alvéoles à fond plat ou en U; microplaque en verre (pour les essais sur des substances chimiques seulement)
Eau témoin/de dilution	– Eau réactive, eau réceptrice non contaminée, eau d'« amont », eau souterraine non contaminée, eau de surface ou eau reconstituée
Organismes d'essai	– <i>P. subcapitata</i> provenant d'une culture de 3–7 jours, en phase de croissance exponentielle; densité cellulaire initiale de $10\,000 \pm 1\,000$ cellules par millilitre
Nombre de concentrations	– au moins 7, plus un témoin normalisé préparé avec de l'eau réactive (et de l'eau de dilution supplémentaire, s'il y a lieu); il est recommandé d'en prévoir 10, plus un ou des témoins
Nombre de répétitions	– au moins 3, dénombrées pour chacune des concentrations d'essai; il est recommandé d'en prévoir 4 (2 témoins) ou 5 (1 témoin); 10 répétitions du ou des témoins, dont 8 dénombrées
Température	– 24 ± 2 °C
Filtration	– passage des solutions d'essai sur un filtre de $0,45\ \mu\text{m}$
Supplément de nutriments	– échantillons pour essai enrichis des mêmes nutriments, aux mêmes concentrations que celles utilisées pour l'eau témoin/de dilution
Aération	– aucune
pH	– aucun rajustement si le pH de la solution d'essai est compris entre 6,5 et 8,5; il est recommandé de procéder à un deuxième essai (à pH rajusté) si le pH se situe en dehors de cette plage
Éclairage	– éclairage fluorescent « blanc froid » vertical en spectre continu, $4\,000 \pm 400$ lux à la surface du contenant et flux quantique de 50 à $62\ \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$
Observations	– concentration cellulaire (ou absorbance à 430 nm), à $t = 72$ h
Mesures	– pH, température de l'enceinte expérimentale ou de l'incubateur
Paramètre	– rendement cellulaire (CI_p)
Toxique de référence	– phénol, ZnSO_4 ou CuSO_4
Validité de l'essai	– essai valide si : le <i>coefficient de variation</i> dans les alvéoles du témoin normalisé est de 20 % ou moins; le coefficient de variation dans les alvéoles du témoin normalisé est de 10 % ou plus mais n'excède pas 20 % et le traitement témoin normalisé n'affiche aucune tendance ou aucun gradient (<i>test de Mann-Kendall</i>); le coefficient d'augmentation du nombre de cellules algales mesuré ou estimé (par photométrie) des témoins normalisés est supérieur à 16
Substances chimiques	
Contenant	– microplaque en verre
Solvants	– seulement dans des circonstances spéciales; un témoin avec solvant est exigé

Tableau 7. (suite)

Eau témoin/de dilution	– eau réactive; eau réceptrice si l'essai a pour objet d'évaluer des effets toxiques locaux
Validité de l'essai	– comme sous la rubrique « Méthodes universelles »; <i>test de Mann-Whitney</i> si un solvant est utilisé
Effluents, éluutriats et lixiviats	
Échantillon exigé	– un seul échantillon de 1 L
Transport et entreposage	– si l'échantillon est tempéré (>7 °C), il faut le refroidir à 1–7 °C avec de la glace ordinaire (et non de la glace sèche) ou avec des sachets congelés, dès le prélèvement; l'échantillon ne doit pas geler pendant le transport ou l'entreposage; garder dans l'obscurité à 4 ± 2 °C; utiliser dans les essais le plus tôt possible après le prélèvement et, obligatoirement, dans les 3 jours suivant le prélèvement de l'échantillon ou l'extraction de l'éluatriat
Eau témoin/de dilution	– eau réactive pour les essais menés à des fins de <i>surveillance</i> du respect des règlements; eau réceptrice si l'essai a pour objet d'évaluer des effets locaux
Eau réceptrice	
Échantillon exigé	– comme sous la rubrique « Effluents, éluutriats et lixiviats »
Transport et entreposage	– comme sous la rubrique « Effluents, éluutriats et lixiviats »
Eau témoin/de dilution	– eau d'« amont » s'il s'agit d'évaluer des effets locaux (inclure dans l'essai des témoins distincts préparés avec de l'eau réactive); eau réactive dans des circonstances spéciales

Figure 3A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Eau réactive seulement											
B	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
C	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
D	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
E	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
F	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
G	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
H	Eau réactive seulement											

Figure 3B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Eau réactive seulement											
B	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
C	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
D	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		
F	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
G	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀		
H	Eau réactive seulement											

Figure 3. Configurations normalisées des microplaques

Figure 3A : disposition à utiliser lorsque de l'eau réactive est utilisée comme eau témoin et eau de dilution; figure 3B : disposition à utiliser lorsque de l'eau réactive n'est pas utilisée pour les dilutions (quand on se sert plutôt d'eau réceptrice, p. ex.). Les alvéoles périphériques sont remplies avec 220 μ L d'eau réactive. La lettre C désigne les concentrations, l'alvéole C₁ renfermant la concentration d'essai la plus élevée et l'alvéole C₁₀, la plus faible. Les témoins normalisés préparés avec de l'eau réactive sont désignés par la lettre N; les témoins de l'échantillon préparés avec une eau de dilution autre que de l'eau réactive sont désignés par la lettre E.

Tableau 8. Concentration finale de nutriments dans le milieu d'essai

Macronutriment	Concentration (mg/L)	Élément	Concentration (mg/L)
NaNO ₃	15,94	N	2,63
MgCl ₂ · 6H ₂ O	6,25	Mg	1,65
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,76	Ca	0,75
MgSO ₄ · 7H ₂ O	9,19	S	1,20
K ₂ HPO ₄	0,65	P	0,12
		K	0,293
NaHCO ₃	9,38	Na	6,88
		C	1,34
Micronutriment	Concentration (µg/L)	Élément	Concentration (µg/L)
H ₃ BO ₃	115,95	B	20,27
MnCl ₂ · 4H ₂ O	259,76	Mn	72,11
ZnCl ₂	2,05	Zn	0,98
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,89	Co	0,22
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0,008	Cu	0,003
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	4,54	Mo	1,8
FeCl ₃ · 6H ₂ O	100	Fe	20,7
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	187,5	-	-
		46,9 ^a	

^a Il faut utiliser cette concentration plus faible de Na₂EDTA · 2H₂O pour les essais sur des substances métalliques en milieu aqueux ou sur des effluents de mines de métaux.

On ajuste le pH, puis on stérilise le milieu par filtration (v. 2.3.1).

Le milieu d'enrichissement stérile non inoculé doit être entreposé dans l'obscurité, à 4 °C, dans un contenant inerte fermé. Dans ces conditions, il peut se conserver jusqu'à six mois.

4.3 Mise en route de l'essai

4.3.1 Préparation de l'inoculum algal

L'inoculum algal doit être préparé de 2 à 3 h au plus avant l'incubation de la microplaque. Il se compose de cellules de *P. subcapitata* prélevées dans une culture mère d'algues âgée de 3 à 7 jours, qui doit être en phase de croissance exponentielle (d'après les courbes de croissance).

Les cellules algales ne devraient pas provenir de la première culture mère préparée avec la culture de départ. Aux fins de l'essai décrit dans la présente méthode, la *densité cellulaire initiale* doit être de 10 000 ± 1 000 cellules par millilitre. Le volume final étant de 200 µL par alvéole, il faut dans chacune d'elles un nombre absolu de 2 200 cellules (10 000 cellules × 0,220 mL).

On estime⁷ le volume de culture mère liquide dont on a besoin pour l'essai, puis on prélève ce volume.

⁷ Par exemple, pour obtenir la concentration requise, on peut procéder comme suit :

Les cellules prélevées doivent être centrifugées à 2 000 g pendant 15 min, puis il faut éliminer le surnageant et remettre les cellules en suspension dans un petit volume (p. ex. 5–10 mL) d'une solution de bicarbonate (NaHCO_3 à raison de 15 mg/L). On peut préparer cette dernière en diluant la solution mère nutritive n° 5. Déterminer la concentration cellulaire (exprimée en cellules par millilitre) au moyen d'un compteur électronique de particules ou d'un hématimètre. Au besoin, diluer la suspension algale avec la solution de bicarbonate jusqu'à une concentration de 220 000 cellules par millilitre, de sorte qu'en ajoutant 10 μL d'*inoculum algal* dans chaque alvéole, on obtiendra la densité cellulaire initiale exigée, soit $10\,000 \pm 1\,000$ cellules par millilitre. Le volume final dans chaque alvéole doit être de 220 μL (p. ex.⁸ 200 μL d'échantillon pour essai,

10 μL d'*inoculum algal* et 10 μL de milieu d'enrichissement).

Dans cet essai sur microplaque, jusqu'à 6 solutions aqueuses peuvent être utilisées :

- 1) l'échantillon pour essai;
- 2) l'eau témoin/de dilution;
- 3) l'eau réactive;
- 4) une solution de bicarbonate (NaHCO_3 à raison de 15 mg/L);
- 5) un milieu d'enrichissement ou un supplément de nutriments;
- 6) des solutions pour le rajustement du pH.

Avant l'essai, toutes les solutions aqueuses devraient être à la température ambiante.

4.3.2 Préparation des solutions d'essai

On devrait agiter vigoureusement les échantillons pour essai afin de les rendre homogènes et de remettre les particules en suspension. Un sous-échantillon d'un volume suffisant pour l'essai (p. ex. 5 à 10 mL) doit être filtré⁹ au moyen d'une membrane préconditionnée¹⁰ à pores de 0,45 μm , et placé dans un tube à essai.

Le pH de tout échantillon aqueux doit être mesuré immédiatement avant d'utiliser ce dernier pour préparer les solutions d'essai. Normalement, il n'est pas nécessaire de rajuster le pH. Toutefois, s'il n'est pas compris dans la plage de 6,5 à 8,5 et que l'on souhaite évaluer les substances chimiques plutôt que les effets nocifs ou modificateurs du pH, on devrait le rajuster, avant de commencer l'essai, à 6,5 ou à 8,5 (soit à

-
- 1) Multiplier par 2 200 le nombre total d'alvéoles à inoculer afin d'obtenir le nombre total de cellules requis pour l'inoculation.
 - 2) Au moment de l'inoculation, environ 1 mL d'*inoculum algal* ne peut être utilisé. Pour tenir compte de cette perte, ajouter 500 000 au nombre total de cellules établi.
 - 3) Utiliser un compteur automatique de particules ou un hématimètre pour établir le nombre de cellules dans la culture mère d'algues.
 - 4) Diviser la valeur calculée au point 2) par la densité cellulaire obtenue au point 3).
 - 5) Il faut tenir compte d'une perte inévitable de cellules dans la phase suivante de centrifugation et de remise en suspension. Pour compenser cette perte, multiplier par 1,5 la valeur obtenue au point 4), afin d'obtenir le volume à prélever dans la culture mère d'algues.

Par exemple, pour une seule microplaque à inoculer et une densité de 1 000 000 de cellules par millilitre dans la culture mère d'algues, le volume total à retirer de la fiole de culture se calculerait comme suit :

- 1) $60 \text{ alvéoles} \times 2\,200 \text{ cellules par alvéole} = 132\,000 \text{ cellules}$
- 2) $+ 500\,000 \text{ cellules} = 632\,000 \text{ cellules}$
- 3) $1\,000\,000 \text{ de cellules par millilitre}$
- 4) $632\,000 \text{ cellules} \div 1\,000\,000 \text{ de cellules par millilitre} = 0,632 \text{ mL}$
- 5) $0,632 \text{ mL} \times 1,5 = 0,948 \text{ mL}$

⁸ Les ratios échantillon pour essai/*inoculum algal*/milieu d'enrichissement peuvent être modifiés, par exemple, pour un essai sur un effluent plus concentré. Toutefois, les résultats doivent être signalés en fonction des concentrations dont la dilution a été corrigée, et le volume final dans la microplaque doit être de 220 μL .

⁹ Cette exigence ne s'applique pas aux essais sur des substances chimiques; il ne faut pas filtrer les solutions mères utilisées dans ces essais. On peut filtrer l'eau réactive avant la préparation de la solution mère de la substance chimique.

¹⁰ On rince le filtre avec un petit volume de solution d'essai, puis on élimine cette eau de rinçage.

la valeur la plus proche du pH initial de l'échantillon), au moyen de HCl ou de NaOH ($\leq 1 N$). Pour déterminer l'influence du pH d'un échantillon sur la toxicité, il est recommandé de mener deux essais en parallèle, avec et sans rajustement du pH.

Idéalement, un essai devrait comprendre une concentration n'ayant aucun effet sur le rendement cellulaire, une concentration qui inhibe complètement la croissance des algues et deux concentrations situées l'une au-dessus et l'autre au-dessous de la CI_{50} . Si l'on connaît déjà la toxicité d'une substance pour *P. subcapitata*, on doit préparer les solutions d'essai à des concentrations englobant une gamme de réponses incluant l'absence d'inhibition de la croissance et l'absence de croissance. On peut préparer ces concentrations avec de l'eau réactive ou en diluant un échantillon pour essai avec une autre eau témoin/de dilution (v. 3.4). Si la toxicité d'un échantillon est inconnue, on devrait effectuer un essai préliminaire, lequel a pour but de définir une plage de concentrations englobant la CI_{50} et de déterminer si l'échantillon contient des substances volatiles.

Pour tout essai visant à estimer la CI_p , il faut préparer au moins 7 concentrations plus l'eau témoin/de dilution, mais on recommande d'en préparer un plus grand nombre (10, plus un témoin) pour augmenter la probabilité que chaque paramètre visé soit encadré. On peut choisir une progression géométrique dans laquelle chaque concentration successive est la moitié moins élevée que celle qui précède (p. ex. 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1 et 1,6 ou, pour les échantillons d'eau usée et d'eau réceptrice, 91, 46, 23, 11, 5,7, 2,8 et 1,4). Dans le cas d'échantillons d'eau usée et d'eau réceptrice, les concentrations réelles sont légèrement plus faibles du fait que les concentrations d'essai sont diluées¹¹ par l'ajout d'un supplément de nutriments et de l'*inoculum algal*; les concentrations réelles (calculées)

¹¹ Pour un volume normalisé de 10 μL d'*inoculum algal*, 10 μL de milieu d'enrichissement et 200 μL d'échantillon pour essai, la dilution serait de 0,9091.

doivent être utilisées pour le calcul des paramètres et pour les rapports.

On peut choisir les concentrations d'essai dans une autre série de dilutions convenables (p. ex. 100, 75, 56, 42, 32, 24, 18, 13, 10 et 7,5; v. la colonne 7 à l'annexe E). Si l'on présume que l'échantillon est extrêmement toxique, il faudrait également prévoir une série de concentrations plus faibles [p. ex. 11, 3,7, 1,2, 0,41, 0,14, 0,05 et 0,02 % (v/v)].

On doit prévoir 4 répétitions (pour 2 témoins) ou 5 répétitions (pour 1 témoin) de chaque solution d'essai, et au moins 3 d'entre elles doivent être dénombrées. Il faut utiliser 10 répétitions du témoin normalisé et de toute eau de dilution supplémentaire (le cas échéant); 2 des 10 alvéoles du témoin normalisé serviront à la mesure du pH et les 8 autres, au dénombrement.

Le volume total d'échantillon requis pour un essai est d'environ 5 mL (facteur de dilution de 0,33). On dilue l'échantillon dans des tubes à essai de taille appropriée, avec l'eau de dilution choisie. On devrait injecter chaque aliquote de l'échantillon au-dessous de la surface de l'eau de dilution et au fond du tube à essai de façon à réduire la volatilisation au minimum. Après chaque transfert, les solutions devraient être bien mélangées dans le tube à essai. Une fois les dilutions effectuées, le volume de solution pour chaque concentration de l'échantillon doit être d'au moins 3 mL. Si l'on souhaite effectuer une analyse chimique des concentrations, il faut préparer un volume plus grand de chaque solution d'essai.

4.3.3 *Distribution des solutions d'essai, de l'inoculum algal et du supplément de nutriments dans la microplaque*

Avant leur utilisation, les microplaques et leurs couvercles devraient être stérilisés aux ultraviolets pendant 15–20 min. On se sert d'une pipette multicanaux pour distribuer 220 μL d'eau réactive d'un réservoir à réactif en plastique dans chacune des 36 alvéoles périphériques de la microplaque. Cette dernière devrait être munie

d'une étiquette indiquant la substance d'essai, sa concentration ainsi que la date et l'heure de l'essai. On pipette ensuite 200 µL d'eau réactive dans chacune des 10 alvéoles qui constitueront le témoin normalisé préparé avec de l'eau réactive (c.-à-d. les alvéoles D2 à D11). On ajoute ensuite les solutions dans les alvéoles appropriées de la microplaque au moyen de la pipette multicanaux, en commençant par la plus faible concentration (ou plus forte dilution) et en finissant par la plus forte concentration (ou plus faible dilution). Il faut veiller à ne pas contaminer l'eau réactive, l'eau témoin/de dilution ou les solutions d'essai. On devrait employer un réservoir en plastique distinct pour chaque concentration d'essai; on peut toutefois utiliser sans inconvénient un seul réservoir pour toutes les concentrations, à la condition de commencer par distribuer la plus faible concentration et de progresser vers la plus forte, en vidant soigneusement le réservoir entre chaque addition.

On mélange des volumes égaux d'*inoculum algal* et de milieu d'enrichissement. Il faudrait vérifier la concentration cellulaire de ce mélange au moyen d'un compteur électronique de particules ou d'un hématimètre : elle doit être telle que la *densité cellulaire initiale* dans chaque alvéole de la microplaque soit de $10\,000 \pm 1\,000$ cellules par millilitre. Si cette densité est atteinte, on ajoute 20 µL de ce mélange dans chaque alvéole de la microplaque au moyen d'une pipette multicanaux, en omettant les alvéoles périphériques. Si la densité cellulaire initiale n'est pas comprise dans la plage acceptable, on devrait refaire le mélange.

Il faudrait maintenir l'homogénéité du mélange pendant l'inoculation. L'essai commence dès que l'*inoculum algal* et les nutriments sont introduits dans les alvéoles. On couvre chaque microplaque avec un couvercle ou une pellicule en polyester.

Si l'on sait ou présume que les substances toxiques dans les solutions d'essai sont volatiles, on doit utiliser une microplaque distincte pour chaque concentration d'essai ou employer une pellicule en polyester qui scellera chaque alvéole.

4.3.4 *Incubation et mesure de la concentration cellulaire initiale*

On place chaque microplaque dans un sac en plastique transparent que l'on scelle de façon à réduire l'évaporation au minimum pendant l'exposition. On doit ensuite placer toutes les microplaques dans un incubateur ou une enceinte environnementale. Les microplaques devraient être réparties au hasard dans l'incubateur.

4.3.5 *Microplaques de contrôle de la qualité*

Bien que leur utilisation soit facultative, on pourrait se servir de microplaques de contrôle de la qualité pour obtenir un étalon valable pour estimer la croissance des algues dans les conditions expérimentales et pour surveiller le pH dans les alvéoles. Les détails entourant la préparation et l'emploi d'une courbe de croissance pour *P. subcapitata* au moyen de microplaques de contrôle de la qualité sont fournis en 2.4 (v. la figure 1b). Il convient de souligner qu'une courbe de croissance établie au moyen de microplaques de contrôle de la qualité ne dispense pas de l'obligation d'établir une courbe de croissance de la culture mère d'algues dans une fiole Erlenmeyer (v. la figure 1a). Les mesures du pH au moyen des microplaques de contrôle de la qualité ne dispensent pas non plus de l'obligation de mesurer le pH de 2 alvéoles médianes témoins de chaque microplaque contenant les solutions d'essai (v. 4.5).

4.4 *Conditions expérimentales*

L'essai avec *P. subcapitata* dure 72 h et ne comporte aucun renouvellement des solutions.

Il doit se dérouler à une température de 24 ± 2 °C. L'éclairage doit être conforme aux indications fournies en 3.3. Les solutions d'essai ne doivent pas être aérées au cours de l'essai.

L'essai doit être considéré comme non valide si les conditions décrites en 4.6.1 ne sont pas satisfaites.

4.5 Observations et mesures

Après l'incubation, retirer chaque microplaque de son sac en plastique. Vérifier s'il y a de la condensation sur le couvercle ou dans le sac, consigner cette information et décrire à quel endroit. Placer la microplaque sur un fond blanc de façon à pouvoir déterminer à l'œil s'il y a eu croissance des algues dans les traitements d'essai. Les alvéoles à fond rond ou en U ont tendance à concentrer les organismes au centre; dans des solutions limpides, il est relativement facile de distinguer les alvéoles qui présentent une croissance des algues (couleur verte) de celles qui n'en présentent pas (couleur blanche). La présence d'une croissance blanche pourrait indiquer que des bactéries se sont développées pendant l'incubation. Toutes ces observations doivent être consignées.

Mesurer le pH d'une alvéole du témoin normalisé de chaque microplaque au début ($t = 0$ h) et à la fin ($t = 72$ h) de l'essai (p. ex. D6 et D7), avec une microsonde ou un papier indicateur de pH. La mesure à la fin de l'essai devrait être faite avant la remise en suspension des cellules algales. On ne devrait pas dénombrer les cellules algales dans ces deux alvéoles. L'écart de pH entre ces deux lectures ne devrait pas excéder 1,5 unité; s'il est supérieur à cette valeur, l'essai devrait être répété.

Dénombrer les cellules dans les 8 autres alvéoles du témoin normalisé (D2 à D5 et D8 à D11), dans au moins 3 alvéoles contenant chaque concentration d'essai et, le cas échéant, dans chacune des alvéoles du témoin de l'échantillon (v. la figure 3). Si les résultats obtenus pour les 3 répétitions des concentrations d'essai sont incohérents (c.-à-d. s'ils présentent une variation élevée), on doit dénombrer d'autres répétitions.

La numération peut porter sur moins de 7 concentrations dans les seuls cas suivants : (i) lorsque le dénombrement cellulaire dans les concentrations les plus faibles montre que celles-ci ont eu un effet important (p. ex. $\gg CI_{50}$), il n'est pas nécessaire de dénombrer les cellules

dans les concentrations plus élevées; (ii) lorsque le dénombrement révèle l'absence d'effet, on ne dénombrera les cellules que dans 6 concentrations, dont la plus élevée.

La concentration de cellules algales peut être déterminée directement par une numération au moyen d'un compteur électronique de particules ou d'un hématimètre, ou indirectement par une mesure de l'absorbance au moyen d'un photomètre pour microplaques.

Numération cellulaire électronique. Un compteur électronique de particules¹² permet de déterminer rapidement la concentration cellulaire (nombre de cellules par millilitre). Il faut avoir recours à des plaques dont les alvéoles ont un fond en U ou arrondi avec ce type de compteur. Ce dernier doit être étalonné conformément aux modes opératoires normalisés. Le diamètre d'ouverture recommandé pour *P. subcapitata* est de 70 μm .

Les cellules algales, qui se sont sans doute déposées au fond des alvéoles, doivent être remises en suspension de façon que le contenu de chaque alvéole soit homogène. À cette fin, on doit aspirer soigneusement le contenu des alvéoles dans une pipette multicanaux, puis le remettre dans les alvéoles. Cette opération doit être répétée au moins 10 fois; ensuite, avec la micropipette, on retire de chaque alvéole 170 μL que l'on distribue dans des godets individuels en plastique.

Remplir chaque godet jusqu'à 10 mL avec le diluant isotonique (facteur de dilution de 10:0,170); avec le compteur de particules, dénombrer les algues de chaque échantillon de une à trois fois. Idéalement, la numération devrait se faire immédiatement après l'addition de la solution isotonique. Sinon, recouvrir les godets et les conserver dans l'obscurité à 4° C, puis remettre en suspension et dénombrer les cellules

¹² On peut également utiliser d'autres types de compteurs automatiques, comme des compteurs optiques de particules, pour des numérations cellulaires rapides.

24 h au plus après l'addition. Porter les résultats sur un tableau suivant la configuration de microplaque utilisée dans l'essai. Vérifier au microscope que les répétitions ne sont pas contaminées par des bactéries.

Numération cellulaire manuelle. On peut dénombrer les cellules algales au moyen d'un microscope et d'un hématimètre. Consulter APHA et coll. (2005) pour obtenir des détails concernant la méthode de dénombrement au microscope. Bien que cette méthode soit moins précise que le dénombrement électronique, elle permet d'examiner directement l'état des cellules et les débris cellulaires. Les cellules doivent être remises en suspension avant le sous-échantillonnage. Tenir compte du facteur de dilution, déterminer la concentration cellulaire pour chaque répétition et consigner les résultats en suivant la configuration de microplaque utilisée dans l'essai de toxicité (c.-à-d. 8 rangées alphabétiques horizontales de A à H et 12 colonnes numériques verticales de 1 à 12).

La numération manuelle doit être exécutée le jour où l'essai prend fin; il ne faut pas entreposer les microplaques à 4 °C.

Photométrie de microplaque. On peut estimer de façon indirecte la concentration cellulaire¹³ en mesurant l'absorbance par les cellules algales remises en suspension dans chaque alvéole. L'opération peut être faite rapidement et facilement si l'on utilise des microplaques à fond plat. On doit effectuer un dénombrement parallèle des cellules au moyen d'un compteur électronique de particules ou d'un hématimètre, dans au moins 3 alvéoles contenant les solutions d'essai et représentant les densités cellulaires élevée, moyenne et faible. Les résultats de ces

trois numérations directes doivent être comparés aux estimations de la densité cellulaire obtenues par la méthode photométrique pour les mêmes alvéoles. Les numérations directes de la densité cellulaire devraient se situer à l'intérieur de la variation attendue (c.-à-d. ± 2 ET) pour les points respectifs de la courbe d'étalonnage normalisée représentant l'absorbance en regard de la concentration cellulaire (figure 4). Si tel n'est pas le cas, le dénombrement des cellules algales dans chaque alvéole de la microplaque devrait se faire seulement par numération directe au moyen d'un compteur électronique de particules ou d'un hématimètre.

Pour les déterminations par photométrie, il faut remettre en suspension les cellules algales de chaque alvéole dans de l'eau réactive avant de mesurer l'absorbance. À cette fin, placer la microplaque dans une centrifugeuse à température contrôlée munie d'une tête pour microplaques, et centrifuger à 2 000 g ($1,33 \times 10^{-7} \text{ m}^3/\text{kg} \cdot \text{s}^2$) pendant 5–10 min. Une fois l'opération terminée, retirer chaque microplaque de la centrifugeuse et enlever son couvercle et/ou sa pellicule d'étanchéité en polyester. Décanter soigneusement le surnageant à l'aide d'une pipette multicanaux en veillant à ne pas perturber l'agrégat algal au fond des alvéoles. Ajouter à chaque alvéole 200 μL d'eau réactive et remettre les organismes en suspension au moyen d'une pipette multicanaux, de la façon décrite précédemment.

Placer ensuite la microplaque dans un photomètre pour microplaques réglé à la longueur d'onde de 430 nm. Suivre les modes opératoires normalisés pour étalonner l'appareil. L'eau réactive devrait servir pour le réglage à blanc. Mesurer ensuite l'absorbance dans chaque alvéole de la microplaque.

4.6 Paramètres et calculs

Le paramètre de l'essai est fondé sur l'inhibition de la croissance des algues exposées aux matières ou substances d'essai. La variable utilisée pour déterminer le paramètre est le rendement

¹³ On peut utiliser d'autres méthodes de détermination indirecte de la densité cellulaire (p. ex. microturbidimétrie, microfluorimétrie), à la condition qu'elles soient assez sensibles et que le paramètre mesuré soit en corrélation avec la concentration de cellules algales. Toutes les mesures indirectes nécessitent une démonstration a priori de cette corrélation, au moyen d'une courbe d'étalonnage ou d'une analyse de régression (v. la figure 4).

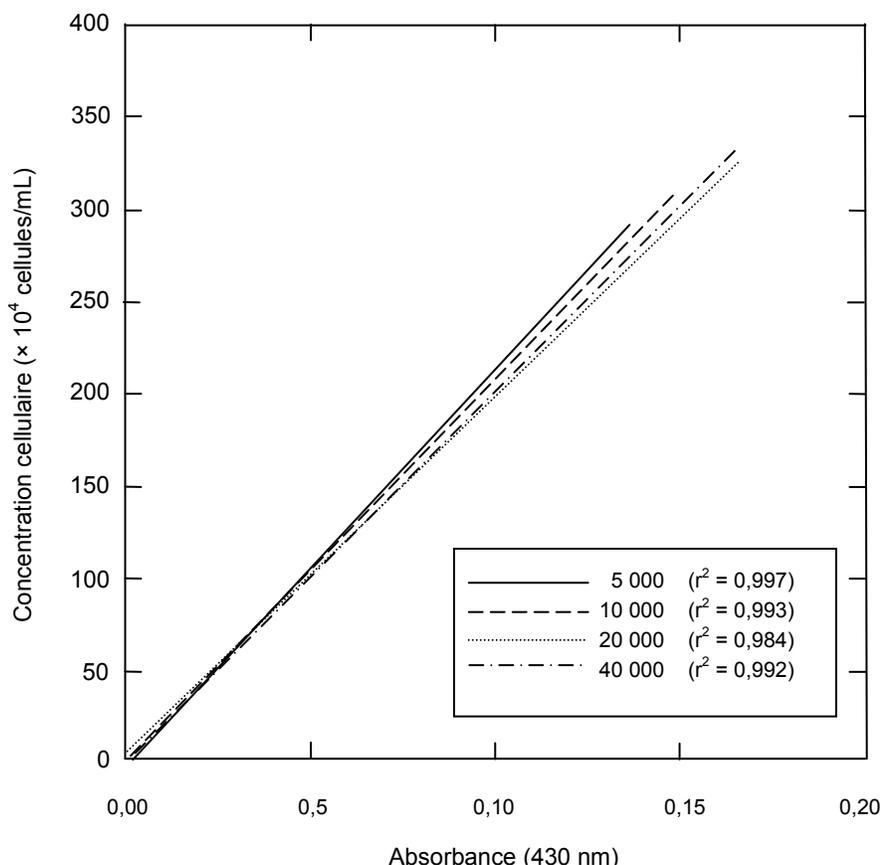


Figure 4. Régression de la concentration de cellules algales sur l'absorbance

On a effectué une régression linéaire de premier ordre de la concentration cellulaire sur l'absorbance, à 430 nm, pour quatre concentrations cellulaires initiales.

cellulaire algal, qui se définit comme le changement de la concentration cellulaire de la population algale pendant une période d'incubation de 72 h.

Pour déterminer le rendement cellulaire dans chaque alvéole, il faut soustraire la *densité cellulaire initiale* (~10 000 cellules par millilitre; v. 4.3) de la concentration finale mesurée (ou de la concentration estimée par photométrie). Le rendement cellulaire dans les alvéoles du témoin normalisé de chaque microplaque (alvéoles D2 à D5 et D8 à D11) doit avoir un coefficient de variation de 20 % ou moins. Si ce dernier est de 10 % ou plus mais n'excède pas 20 %, les résultats pour ces mêmes alvéoles doivent aussi être comparés statistiquement par une analyse des

tendances au moyen du *test de Mann-Kendall* (Gilbert, 1987) pour vérifier qu'il n'y a aucun gradient d'effet dans les alvéoles du traitement témoin (en d'autres termes, $p > 0,05$, ce qui signifie qu'il n'y a aucune tendance positive ou négative dans la concentration cellulaire algale). Toute tendance indique que les contaminants volatils présents dans l'échantillon ont eu un effet sur les témoins et les autres traitements; dans ce cas, l'essai doit être répété avec plusieurs microplaques (une par concentration d'essai) ou avec une pellicule de polyester pour sceller chaque alvéole. Par ailleurs, il est recommandé de comparer le rendement cellulaire moyen dans les alvéoles du témoin normalisé de chaque microplaque (alvéoles D2 à D5 et D8 à D11) avec celui obtenu pour les alvéoles du témoin

normalisé dans un autre essai (p. ex. un essai avec un toxique de référence) réalisé dans des conditions identiques et selon le même mode opératoire. Si ces données ne concordent pas (à l'intérieur de 2 ET – calcul établi pour le toxique de référence), l'essai devrait être répété avec une microplaque par concentration d'essai.

Calculer le rendement cellulaire moyen pour le témoin normalisé et/ou le témoin de l'échantillon. Si la configuration de la microplaque comprend à la fois un témoin normalisé préparé avec de l'eau réactive et un témoin de l'échantillon (v. la figure 3), on doit effectuer une comparaison statistique pour détecter les écarts significatifs entre les moyennes, à l'aide d'un test *t* jumelé ou du test de Wilcoxon pour observations appariées. S'il n'existe pas d'écart significatif, on peut soit regrouper les témoins pour en former un seul, soit utiliser le témoin de l'échantillon et exclure le témoin normalisé préparé avec de l'eau réactive.

4.6.1 Validité de l'essai

Pour être valide, un essai doit satisfaire à chacun des critères suivants :

- L'homogénéité des résultats des mesures ou estimations (photométriques) du rendement cellulaire doit être démontrée pour les alvéoles du témoin normalisé. Pour que l'essai soit valide, le coefficient de variation ne doit pas excéder 20 % (c.-à-d. qu'il doit être de 20 % ou moins).
- Lorsque le coefficient de variation dans les alvéoles du témoin normalisé est de 10 % ou plus mais n'excède pas 20 %, il faut appliquer une analyse des tendances (*test de Mann-Kendall*; v. Gilbert, 1987) aux estimations du rendement cellulaire dans les alvéoles du témoin normalisé, et cette analyse doit montrer que le traitement témoin ne présente aucune tendance ou gradient sur le plan de la concentration cellulaire algale ($p > 0,05$)¹⁴.

¹⁴ Si le coefficient de variation dans le traitement témoin est inférieur à 10 %, le test visant à détecter une tendance dans les alvéoles du témoin normalisé n'est pas exigé.

- Le coefficient d'augmentation du nombre de cellules algales mesuré ou estimé (si la méthode photométrique est employée) dans les témoins normalisés doit être supérieur à 16 au bout de 72 h.

4.6.2 Essais à concentrations multiples

Dans un essai sur microplaque avec des algues, la CI_p ^{15, 16} et ses limites de confiance à 95 % constituent le paramètre exigé; le rendement cellulaire entre dans tous les calculs. On trouvera dans EC (2005) des explications et des conseils pour le calcul de la CI_p , y compris des diagrammes de décision pour orienter le choix des tests statistiques pertinents. Tous les tests statistiques utilisés pour calculer un paramètre exigent que les concentrations soient exprimées sous forme de logarithmes. Les concentrations utilisées pour les calculs et signalées dans le rapport d'essai doivent être corrigées en fonction du volume de milieu d'enrichissement et d'inoculum algal¹⁷, le cas échéant.

Il est vivement recommandé de tracer un diagramme initial des données (rendement

¹⁵ Par le passé, les responsables des essais ont souvent analysé les paramètres sublétaux *quantitatifs* associés à des essais à concentrations multiples en calculant la *concentration sans effet observé (CSEO)* et la *concentration minimale avec effet observé (CMEO)*. Ces paramètres statistiques comportent des inconvénients, notamment leur dépendance à l'égard des concentrations d'essai choisies et l'incapacité de fournir une quelconque indication de la *précision* (en d'autres termes, il est impossible d'établir la limite de confiance à 95 % ou autre) (sous-section 7.1 dans EC, 2005). Compte tenu de ces inconvénients, la CI_p constitue le paramètre statistique requis pour les données sur la croissance obtenues dans un essai à concentrations multiples avec *P. subcapitata*.

¹⁶ La CI_p est la *concentration inhibitrice* correspondant à un *pourcentage* d'effet précis. Le « p » représente un pourcentage fixe de réduction choisi par le responsable de l'essai. En règle générale, sa valeur est établie à 25 % ou à 20 %.

¹⁷ Par exemple, dans le cas de la préparation type renfermant 200 µL de solution d'essai, 10 µL de milieu d'enrichissement et 10 µL d'inoculum algal, on aurait une dilution de 91 % de l'effluent d'origine. Si d'autres ratios sont utilisés pour la préparation, il faut corriger la dilution en conséquence.

cellulaire) en fonction du logarithme de la concentration afin d'obtenir une représentation visuelle des données, d'une part, et de vérifier si les résultats obtenus sont raisonnables en regard des calculs statistiques ultérieurs, d'autre part¹⁸. Tout écart important entre le graphique de la CI_p approximative et la CI_p calculée par la suite à l'aide d'un programme informatique doit être expliqué. Le graphique permettrait aussi de déterminer si un lien logique a été obtenu entre la concentration logarithmique (ou, dans certains cas, la concentration) et l'effet, ce qui est souhaitable dans tout essai valide (EC, 2005).

L'analyse de régression constitue la principale méthode statistique qui doit être utilisée pour calculer la CI_p , à la condition que les hypothèses ci-dessous soient satisfaites. Un certain nombre de modèles permettent d'évaluer les données sur la croissance (à l'aide d'un test statistique quantitatif) au moyen d'une analyse de régression. Pour que les méthodes de régression puissent être utilisées, les données doivent satisfaire aux hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité*. Des techniques de pondération peuvent être appliquées pour réaliser l'hypothèse d'*homoscédasticité*. Il convient aussi d'examiner les données afin de détecter les

¹⁸ Plutôt que de porter les données directement sur un diagramme, le responsable de l'essai peut choisir de calculer le pourcentage d'inhibition associé à chaque concentration expérimentale et de porter ce pourcentage sur un diagramme; ce calcul s'établit au moyen de la formule suivante :

$$I = \frac{R_t - R}{R_t} \times 100$$

où :

I est le pourcentage d'inhibition de la croissance des algues dans chaque répétition d'une concentration d'essai;
 R_t est le rendement cellulaire moyen dans le témoin;
 R est le rendement cellulaire dans chaque répétition de la concentration d'essai.

Lorsqu'elles sont portées sur un diagramme, toutes les valeurs au-dessus de l'axe des x représentent une inhibition de la croissance et toutes celles au-dessous, une augmentation de la croissance. I aura une valeur négative si la croissance dans les alvéoles d'une concentration d'essai est plus grande que dans les alvéoles du témoin (il y a augmentation de la croissance).

valeurs aberrantes à l'aide d'une des méthodes recommandées (v. 10.2 dans EC, 2005). Toute valeur aberrante doit être signalée, de même que la justification de sa suppression. Il faut tenter d'ajuster plus d'un modèle aux données et, enfin, choisir le modèle présentant le meilleur ajustement¹⁹ pour calculer la CI_p et ses limites de confiance à 95 %. Pour déterminer le meilleur ajustement, il est recommandé d'utiliser la plus faible erreur quadratique moyenne résiduelle, laquelle est fournie dans le tableau ANOVA pour tous les modèles. Les paramètres calculés au moyen d'une analyse de régression doivent être encadrés par les concentrations d'essai; l'extrapolation des paramètres au-delà de la concentration expérimentale maximale ne constitue pas une pratique acceptable.

Les résultats relatifs à la CI_p doivent toujours indiquer la durée d'exposition (72 h) et être exprimés en *pourcentage* (v/v) pour les échantillons d'eaux usées (avec correction tenant compte du volume de milieu d'enrichissement et d'inoculum algal). Pour les substances chimiques, on se sert des unités de concentration appropriées ($\mu\text{g/L}$ ou mg/L). Pour les eaux usées non toxiques, on doit signaler la CI_p 72 h comme suit : ND (non déterminable) ou $>100\%$ v/v. Lorsque la CI_p est au-dessous de la plus faible concentration d'essai, on indique qu'elle est inférieure à cette concentration ou l'on reprend l'essai avec des concentrations plus diluées.

Si l'absorbance sert à estimer les concentrations cellulaires, il faut corriger les valeurs obtenues pour celles-ci dans les témoins normalisés en

¹⁹ Comme il est indiqué à la sous-section 6.5.8 de EC (2005), les directives actuelles d'Environnement Canada concernant les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité précisent qu'il faut utiliser les cinq modèles suivants d'analyse de régression pour établir la CI_p estimative : modèle linéaire, modèle logistique, modèle de Gompertz, modèle exponentiel et modèle d'*hormèse* (modèle logistique adapté pour tenir compte de l'effet d'hormèse à de faibles concentrations). Le document d'orientation précité fournit également (en 6.5.8 et à l'annexe O) les expressions mathématiques propres à chaque modèle, dont des exemples détaillés associés à un logiciel de statistiques courant.

soustrayant l'absorbance du blanc, composé de 200 µL d'eau réactive et de 20 µL de NaHCO₃ et de supplément de nutriments à parties égales, puis calculer l'absorbance moyenne dans les témoins normalisés préparés avec de l'eau réactive.

Soustraire la valeur de l'absorbance mesurée dans chaque alvéole de chaque traitement de la valeur de l'absorbance moyenne des témoins normalisés préparés avec de l'eau réactive. Convertir les valeurs ainsi corrigées en concentrations cellulaires finales au moyen d'une équation prédéterminée par régression de la concentration cellulaire sur l'absorbance, ou directement au moyen d'une courbe d'étalonnage (figure 4). Déterminer ensuite la concentration qui produit un pourcentage donné d'inhibition de la croissance (p. ex. CI₅₀, CI₂₅ ou CI₂₀).

Un logiciel a été mis au point spécialement pour les photomètres pour microplaques, et il existe des programmes qui effectuent automatiquement les corrections d'absorbance en fonction de toutes les configurations de microplaques possibles. On peut facilement importer les fichiers de données ainsi obtenus dans des programmes analytiques standards pour effectuer de nouvelles manipulations des données et des analyses statistiques ainsi que pour obtenir des représentations graphiques.

La possibilité de décrire mathématiquement l'*hormèse* (c.-à-d. une stimulation ou une réponse « supérieure à celle du témoin » ne se produisant que lors d'une exposition à des concentrations faibles) dans la courbe concentration-réponse a été intégrée dans les modèles de régression récents pour les données quantitatives (v. 10.3 dans EC, 2005). Les données relatives à une *hormèse* peuvent être saisies directement puisque tous les points de données peuvent être pris en compte et incorporés dans le modèle; il n'y a aucun échantillonnage des points de données indiquant une réponse hormétique.

Si les données ne se prêtent pas à une analyse de régression (c.-à-d. si les hypothèses de *normalité*

et/ou d'*homoscédasticité* ne peuvent être satisfaites), on peut avoir recours à une interpolation linéaire (p. ex. le programme ICPIN; v. 6.4.3 dans EC, 2005) en vue de calculer une CI_p. Si les données montrent qu'il y a *hormèse* et que le programme ICPIN est utilisé, il faut entrer les réponses du témoin en regard des concentrations auxquelles le phénomène se produit (option 4, sous-section 10.3.3 dans EC, 2005).

Pour chaque concentration d'essai, y compris le ou les traitements témoins, on doit calculer le rendement cellulaire moyen (± ET) et le *coefficient de variation* correspondant.

4.6.3 Effet stimulant

Un *effet stimulant* (réponse plus marquée à toutes les concentrations ou aux concentrations élevées) doit être signalé pour toutes les concentrations auxquelles une stimulation importante a été observée. Le cas échéant, on procède à une comparaison statistique avec les témoins au moyen d'une ANOVA, puis à une comparaison par paire avec le témoin (v. 3.3 et 7.5 dans EC, 2005). Cette analyse permettra de déterminer quelles concentrations provoquent un effet stimulant qui s'écarte significativement de celui observé chez les témoins. Le pourcentage de stimulation attribuable à ces concentrations doit être signalé en tant que paramètre d'essai; on l'établit à l'aide de la formule suivante²⁰ :

$$S (\%) = \frac{E - T}{T} \times 100$$

où :

S (%) est le pourcentage de stimulation;
E est le rendement cellulaire moyen à la fin de l'essai dans les solutions expérimentales;

²⁰ Dans le contexte des essais sur des effluents, E = réponse moyenne dans l'effluent ou l'eau de surface et T = réponse moyenne dans le témoin (USEPA, 2002). Toutefois, ces équivalences ont été définies ici en termes plus généraux afin d'englober toutes les applications de la présente méthode dans le calcul du pourcentage de stimulation. Le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec fait appel à un calcul semblable (CEAEQ, 2005).

T est le rendement cellulaire moyen chez les témoins.

4.6.4 Autres plans d'expérience

Dans la méthode décrite dans le présent document, on utilise la biomasse, exprimée sous forme de densité cellulaire et de rendement cellulaire algal, pour le calcul du ou des paramètres connexes à l'inhibition de la croissance. D'autres méthodes publiées peuvent employer différentes expressions pour désigner la biomasse²¹, notamment la masse sèche²² ou la vitesse spécifique moyenne de croissance²³, dans le calcul du ou des paramètres. Les estimations de la toxicité sous forme de biomasse finale sont généralement plus sensibles que celles fondées sur la vitesse spécifique moyenne de croissance (Weyers et Vollmer, 2000; ISO, 2006). La vitesse de croissance est utile pour comparer les données d'essais dont les conditions d'exécution diffèrent (p. ex. sur le plan des nutriments, de l'éclairage et de la durée) et celles d'essais faisant appel à différentes souches algales (Weyers et Vollmer, 2000; Eberius et coll., 2002; ISO, 2006).

²¹ Certaines éditions antérieures de méthodes publiées utilisent également l'intégrale de biomasse, soit l'aire sous la courbe de croissance, mais ce n'est plus le cas des éditions courantes (ISO, 2002, 2006). Pour une comparaison entre l'aire sous la courbe de croissance et la vitesse de croissance, v. ISO, 2006.

²² On peut déterminer la masse sèche par gravimétrie ou la calculer indirectement à l'aide de facteurs de conversion (ASTM, 2006).

²³ On calcule la vitesse spécifique moyenne de croissance pendant une période donnée sous forme d'augmentation logarithmique de la biomasse, et ce, dans chaque récipient contenant les témoins et les traitements, selon la formule suivante (OCDE, 2004) :

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{m_j - m_i} \text{ (jour}^{-1}\text{)}$$

où :

μ_{i-j} est la vitesse spécifique moyenne de croissance entre le moment i et le moment j ;

X_i est la biomasse au moment i ;

X_j est la biomasse au moment j .

4.7 Toxique de référence

On se sert d'un toxique de référence pour évaluer la reproductibilité et la fiabilité (du point de vue de la précision et de la cohérence) des résultats obtenus avec un organisme d'essai donné, selon un mode opératoire particulier et/ou par un laboratoire pendant une période déterminée. On compare les résultats obtenus pour ce produit avec ceux d'essais antérieurs afin de savoir s'ils tombent dans une plage de variabilité acceptable. Si tel n'est pas le cas, c'est que l'état de santé ou la sensibilité génétique des organismes d'essai ont changé et/ou qu'il y a incohérence sur le plan de la méthode. On peut donc se servir d'un toxique de référence pour confirmer l'acceptabilité des résultats d'essais parallèles et pour démontrer que la performance du laboratoire est satisfaisante.

Pour cet essai, il faudrait utiliser comme toxique de référence un ou plusieurs des trois²⁴ composés suivants (de qualité réactif) : sulfate de cuivre (CuSO_4), sulfate de zinc (ZnSO_4) ou phénol. L'analyse chimique de chacune de ces substances est facile à réaliser et comporte un risque minime pour l'utilisateur. *P. subcapitata* est sensible aux substances chimiques — dont celles mentionnées ci-dessus — ayant une faible activité (p. ex. faible pente de la courbe concentration-réponse). Par ailleurs, des changements de la qualité de l'eau n'influent pas de manière significative sur la toxicité de ces substances. La source et la pureté du toxique de référence doivent être indiquées.

L'essai toxicologique avec le toxique de référence s'effectue selon les méthodes universelles exposées dans la présente sous-section. Les méthodes de préparation des concentrations d'essai sont décrites à l'annexe E de EC, 1990. L'eau réactive utilisée normalement

²⁴ Le chlorure de sodium (NaCl) n'est plus jugé acceptable comme toxique de référence; des données récentes de laboratoire montrent que les valeurs de la CI_p calculées en fonction de ce toxique de référence ne reflètent pas la contamination ou le mauvais état de santé de la culture (Harwood, 2006).

pour les essais toxicologiques avec des algues devrait servir d'eau témoin/de dilution pour les essais effectués avec le toxique de référence.

On doit réaliser l'essai toxicologique avec le ou les toxiques de référence dans les 14 jours qui précèdent ou suivent l'essai de toxicité (en d'autres termes, il doit débiter dans les 14 jours englobant la période de 72 h réservée à l'essai de toxicité). Les organismes utilisés devraient provenir du même lot que ceux employés pour l'essai sur un ou des échantillons. L'essai avec le ou les toxiques de référence doit se dérouler dans des conditions identiques à celles de l'essai sur un ou des échantillons.

Une *carte de contrôle* (EC, 1990, 2005) doit être établie et mise à jour pour chaque toxique de référence utilisé. On porte sur cette carte les CI_p successives, puis on détermine si les résultats se trouvent à ± 2 ET (= *limites de contrôle de 95 %*) ou à ± 3 ET (= *limites d'action*) des valeurs obtenues dans les essais antérieurs avec le même toxique de référence et en suivant le même mode opératoire. On calcule de nouveau la moyenne et l'écart-type du logarithme des CI_p disponibles à chaque essai successif, jusqu'à ce que la statistique se stabilise (EC, 1990, 2005). La carte de contrôle devrait représenter le logarithme de la CI_p sur l'axe vertical en fonction de la date de l'essai (ou du numéro de l'essai) sur l'axe horizontal (v. la figure 2).

On doit utiliser le logarithme de la concentration ($\log-CI_p$) dans tous les calculs de la moyenne et de l'écart-type et dans toutes les méthodes de présentation graphique. On continue ainsi d'adhérer à l'hypothèse selon laquelle on a estimé chaque CI_p d'après les logarithmes des concentrations. On peut établir la carte de contrôle en reportant les valeurs logarithmiques de la moyenne et ses limites sur papier graphique ordinaire ou en reportant les valeurs arithmétiques sur l'échelle logarithmique de papier semi-logarithmique. Si l'on devait montrer catégoriquement que les CI_p n'obéissent pas à la loi log-normale, la moyenne et les limites arithmétiques pourraient se révéler plus indiquées.

Chaque nouvelle CI_p du toxique de référence devrait être comparée aux limites de contrôle de 95 % établies sur la carte; on considère que la CI_p est acceptable si elle se trouve à l'intérieur de ces limites.

Si une valeur donnée de la CI_p se trouve à l'extérieur des limites de contrôle de 95 %, la sensibilité de la culture algale ainsi que le rendement et la précision de l'essai sont suspects. Comme le phénomène pourrait se produire 5 % du temps par le seul fait du hasard, une valeur aberrante n'est pas nécessairement le signe d'une sensibilité douteuse de la culture ou d'une mise en question des données. Ce serait plutôt un avertissement que tel pourrait être le cas. On exige alors que le personnel de laboratoire vérifie en profondeur les conditions et méthodes de culture et d'essai. Selon les résultats qui en ressortiront, il pourrait être nécessaire de préparer une nouvelle culture algale en vue d'un nouvel essai sur la matière ou la substance d'essai et avec le ou les toxiques de référence.

Des résultats qui restent à l'intérieur des limites de contrôle de 95 % n'indiquent pas nécessairement que le laboratoire obtient des résultats constants. Les résultats extrêmement variables que donne un toxique de référence élargissent ces limites; un nouveau point de données pourrait s'y trouver, tout en représentant un écart indésirable. Pour obtenir des indications sur la variation raisonnable entre les données sur les toxiques de référence, prière de consulter la sous-section 2.8.1 et l'annexe F de EC (2005).

Si une valeur de la CI_p était située à l'extérieur des limites d'action (moyenne ± 3 ET), l'essai serait fort probablement inacceptable et il faudrait le répéter après en avoir examiné soigneusement tous les aspects. Si les paramètres se situaient entre les limites d'action et les limites de contrôle plus de 5 % du temps, cela signifierait que la précision se détériore et, là encore, il faudrait répéter l'essai le plus récent, après examen minutieux des procédures, conditions et calculs.

Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité de substances chimiques

La présente section renferme des instructions particulières relatives aux essais sur des substances ou produits chimiques, qui s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

5.1 Propriétés, étiquetage et entreposage des échantillons

On devrait se renseigner sur les propriétés physiques et chimiques de la substance d'essai. Il convient aussi de consulter, si elles existent, la ou les fiches signalétiques de cette substance. Parmi les renseignements les plus importants pour l'exécution des essais et l'interprétation des résultats, on compte la solubilité dans l'eau, la pression de vapeur, les constantes de dissociation, la formule développée, le coefficient de partage *n*-octanol/eau, le degré de pureté ainsi que la nature et la quantité des impuretés ou additifs. Il est également utile de connaître la stabilité relative de la substance chimique et sa persistance dans l'eau douce.

Les contenants de produit chimique doivent être étanches et porter une étiquette indiquant le nom du produit et du fournisseur, la date de réception et le degré de qualité ou de pureté. Le produit chimique devrait être entreposé conformément aux instructions figurant sur l'étiquette ou sur la fiche signalétique.

5.2 Eau témoin/de dilution et récipients d'essai

Dans les essais visant à évaluer la toxicité d'une substance chimique pour *P. subcapitata*, il est recommandé d'utiliser de l'eau réactive comme eau témoin/de dilution. Cependant, si l'on veut évaluer l'effet toxique d'une substance sur une eau réceptrice donnée, on recommande d'employer cette eau comme eau témoin/de

dilution. L'évaluation des incidences d'un déversement de produits chimiques ou de la pulvérisation délibérée d'un pesticide sur une masse d'eau justifierait l'utilisation de l'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution. L'objectif de l'essai doit être fixé a priori du fait que les résultats relatifs à la toxicité pourraient varier selon l'eau employée.

Il faut utiliser des microplaques en verre pour les essais sur des substances chimiques. Si le laboratoire peut démontrer, par des comparaisons parallèles, que la sorption de la substance d'essai sur le polystyrène n'excède pas celle sur le verre, il peut utiliser des microplaques en polystyrène jetables.

5.3 Préparation des solutions d'essai

On devrait préparer les solutions d'essai de la substance chimique en diluant des volumes mesurés d'une solution mère fraîche avec de l'eau réactive. Les solutions mères utilisées dans les essais ne doivent pas être filtrées, mais l'eau réactive peut l'être avant la préparation de celles-ci. On devrait utiliser des fioles jaugées pour la préparation des solutions mères et des solutions d'essai. Dans le cas des substances peu solubles dans l'eau, on peut préparer les solutions mères au moyen de la technique de la colonne génératrice (Billington et coll., 1988; Shiu et coll., 1988) ou, ce qui est moins souhaitable, par dispersion ultrasonique²⁵. On peut aussi accroître la solubilité de la substance au moyen de solvants organiques, d'*émulsifiants* ou de *surfactifs*, mais seulement lorsque ces agents ou porteurs entrent

²⁵ La dispersion ultrasonique n'est pas recommandée, les ultrasons pouvant produire des gouttelettes non uniformes, de différentes tailles, dont certaines pourraient gagner la surface du liquide ou présenter une biodisponibilité variable, ce qui risquerait de modifier la toxicité.

dans la préparation commerciale du produit. Dans ce cas, il faut préparer une solution témoin supplémentaire du porteur renfermant la concentration la plus élevée de l'agent solubilisant qui sera utilisé dans l'essai. Cette solution témoin devrait être placée dans les alvéoles E2 à E11, à côté des répétitions du témoin normalisé (qui occupe les alvéoles D2 à D11) (voir la figure 3B).

Les procédures à suivre pour préparer les solutions d'essai (échantillon pour essai, inoculum algal et supplément de nutriments) sont décrites à la section 4; si l'essai porte sur une substance métallique en milieu aqueux ou un mélange de métaux, il faut réduire de 25 % le volume final de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ afin d'obtenir une concentration finale de 46,9 $\mu\text{g/L}$.

La plus forte concentration de l'agent solubilisant dans toute solution d'essai devrait être inférieure à celle de la CSEO du solvant dans l'eau témoin/de dilution. Si la CSEO est inconnue, on

peut la déterminer en effectuant l'essai d'inhibition de la croissance d'algues avec diverses concentrations de l'agent, en suivant les méthodes d'essai normalisées. On calcule la CSEO selon des méthodes reconnues (EC, 2005).

Les solvants organiques recommandés sont l'acétone et le méthanol (St-Laurent et coll., 1992), dont les CSEO sont inférieures à 0,91 % (v/v) (Stratton et Smith, 1988).

Un essai dans lequel on emploie un agent solubilisant est considéré valide si le rendement cellulaire dans les solvants utilisés comme porteurs n'est pas significativement différent de celui des témoins normalisés, selon le *test de Mann-Whitney* non paramétrique (Zar, 1999). Les témoins doivent être comparés statistiquement par une analyse des tendances (test de Mann-Kendall; v. Gilbert, 1987) pour détecter tout effet des substances volatiles présentes (le cas échéant) dans l'échantillon (v. 4.4 pour les détails).

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat

La présente section renferme des instructions particulières relatives aux essais sur des échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat, qui s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

6.1 *Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons*

En règle générale, 1 L d'échantillon d'effluent ou de lixiviat suffit pour l'essai d'inhibition de la croissance d'algues sur microplaque. Chaque échantillon doit être prélevé et placé dans un contenant étiqueté ou codé fait d'un matériau inerte. L'étiquetage ou le codage ainsi que les enregistrements connexes devraient indiquer le type d'échantillon, la source et/ou le lieu du prélèvement, la date et l'heure du prélèvement ainsi que le nom de la ou des personnes ayant prélevé l'échantillon. Le contenant doit être neuf ou avoir été nettoyé à fond et être rincé avec de l'eau non contaminée. Il devrait également être rincé avec l'eau à échantillonner, puis rempli jusqu'au bord et fermé hermétiquement. La chaîne de conservation au cours du prélèvement, du transport et de l'entreposage devrait être consignée.

On doit s'efforcer de garder les échantillons d'effluent ou de lixiviat au frais (1–7 °C, de préférence 4 ± 2 °C) durant le transport. Dès le prélèvement, il faut refroidir à 1–7 °C les échantillons tempérés (>7 °C), à l'aide de glace ordinaire (et non de glace sèche) ou de sachets réfrigérants. Au besoin, on doit ajouter dans le contenant de transport des quantités généreuses de glace, des sachets réfrigérants ou d'autres moyens de réfrigération, afin de maintenir la température de l'échantillon entre 1 et 7 °C durant le transport.

Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport ou l'entreposage. Il faut noter la température de l'échantillon dès son arrivée au laboratoire. On peut amener à la température d'essai, immédiatement ou pendant la nuit, une aliquote d'effluent ou de lixiviat dont on a besoin et l'utiliser dans l'essai. On doit garder dans l'obscurité les échantillons ou sous-échantillons destinés à des essais ultérieurs, dans des contenants étanches, sans espace libre, à 4 ± 2 °C.

Les échantillons d'effluent et de lixiviat devraient être soumis à l'essai le plus tôt possible et obligatoirement dans les 3 jours suivant le prélèvement. On devrait procéder à l'extraction des échantillons pour la préparation des éluutriats dans les 10 jours qui suivent leur réception. L'essai sur éluutriat doit commencer dans les 3 jours qui suivent la préparation.

Si l'eau utilisée pour la préparation des solutions d'essai (c.-à-d. l'eau témoin/de dilution) n'est pas de l'eau réactive (v. la section 4), une quantité suffisante d'eau témoin/de dilution doit aussi être prélevée, transportée et entreposée de la même façon que les échantillons aqueux. On ne devrait pas la conserver plus de 14 jours en raison du problème lié à la formation d'une pellicule biologique (USEPA, 2002). Idéalement, les échantillons devraient être transportés à des températures comprises entre 1 et 7 °C, et ils ne doivent pas geler pendant ce temps.

6.2 *Eau témoin/de dilution*

Pour les essais sur des échantillons d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat réalisés à des fins de surveillance de la conformité aux règlements, on devrait utiliser de l'eau réactive comme eau témoin/de dilution. Si l'on souhaite évaluer l'incidence possible d'un échantillon sur une eau

réceptrice donnée, c'est cette eau qui devrait être utilisée comme eau témoin/de dilution. On doit aussi inclure dans l'essai un témoin normalisé (c.-à-d. préparé avec de l'eau réactive).

Lorsqu'un degré poussé de normalisation est exigé pour les essais, on devrait utiliser de l'eau réactive pour toutes les dilutions et comme eau témoin, car ce type d'eau permet d'atténuer l'influence que peut exercer la composition chimique d'eaux de dilution différentes. Par exemple, l'eau réactive conviendrait aux études visant à comparer les données sur la toxicité de divers types et sources d'effluents, de lixiviat ou d'élutriats recueillies par différents laboratoires.

On doit fixer l'objectif de l'essai avant de faire un choix du fait que les résultats relatifs à la toxicité pourraient varier grandement selon l'eau employée.

6.3 Préparation des solutions d'essai

Les procédures à suivre pour préparer l'échantillon pour essai et les solutions expérimentales sont décrites à la section 4; si l'essai porte sur un effluent de mines de métaux, il faut réduire de 25 % le volume final de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ afin d'obtenir une concentration finale de 46,9 $\mu\text{g/L}$. Il est recommandé de soumettre ces échantillons aqueux à des essais en parallèle (p. ex. avec deux microplaques). En raison de l'ajout de l'*inoculum algal* et du milieu d'enrichissement, la concentration d'essai la plus élevée d'un effluent, d'un élutriat ou d'un lixiviat est habituellement de 91 %. On doit tenir compte de cette dilution dans les calculs du paramètre (v. 4.3.2).

Avant et après la filtration de l'échantillon, on devrait consigner la couleur, la *turbidité* et l'odeur de celui-ci, de même que la présence de matières flottantes ou déposées. On devrait aussi noter tout changement survenant au cours de la préparation de l'échantillon pour essai (p. ex. *précipitation*, *floculation*, changement de couleur ou d'odeur, émission de substances volatiles).

Il pourrait être souhaitable de mesurer la quantité totale des solides en suspension et des solides déposés (APHA et coll., 2005) dans les effluents qui en contiennent des quantités appréciables. L'enlèvement de ces fractions de l'effluent risquerait d'influer sur les résultats des essais de toxicité.

6.4 Interprétation des résultats

Dans tout essai où l'eau témoin/de dilution n'est pas de l'eau réactive, on devrait porter une attention particulière à la comparaison de la croissance des algues dans cette eau témoin/de dilution et dans les témoins normalisés préparés avec de l'eau réactive, afin de déterminer si l'eau témoin/de dilution est phytotoxique. Il faut aussi procéder à une comparaison statistique des témoins par analyse des tendances (*test de Mann-Kendall*; v. Gilbert, 1987) pour détecter tout effet des substances volatiles présentes (le cas échéant) dans l'échantillon (v. 4.4 pour les détails). Toute augmentation de la croissance dans les solutions d'essai par rapport aux solutions témoins doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats et doit être signalé.

Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'eau réceptrice

La présente section renferme des instructions relatives aux essais sur des échantillons d'eau réceptrice, qui s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons, et préparation des solutions d'essai

Les procédures s'appliquant aux échantillons d'eau réceptrice sont les mêmes que celles décrites en 6.1 et 6.3.

7.2 Eau témoin/de dilution

Pour évaluer la toxicité d'échantillons d'eau réceptrice prélevés au voisinage d'une source ponctuelle de contamination possible (p. ex. rejet d'eaux usées, déversement de produits chimiques), on devrait normalement prélever de l'eau d'« amont » et l'utiliser comme eau témoin et eau de dilution des échantillons d'eau prélevés en aval. Cette eau témoin/de dilution devrait être prélevée le plus près possible de la ou des sources de contamination, mais en amont ou à l'extérieur de sa zone d'influence. Si l'on utilise de l'eau

d'amont comme eau témoin/de dilution, on doit préparer une série distincte de solutions témoins de répétition avec de l'eau réactive et inclure ces témoins dans l'essai.

Si des effets d'inhibition de la croissance sont observés sur des algues témoins exposées à l'eau d'amont, on devrait procéder à un essai distinct sur une série de concentrations d'eau d'aval préparée avec de l'eau réactive. Dans un tel cas, on devrait prélever de l'eau d'aval en quantité suffisante pour permettre la préparation de ces dilutions.

Si la normalisation constitue une priorité élevée de l'essai ou s'il est souhaitable de procéder à des comparaisons de résultats interlaboratoires, on devrait utiliser de l'eau réactive comme eau témoin/de dilution. L'objectif ou les objectifs de l'essai doivent être arrêtés a priori.

7.3 Interprétation des résultats

En plus des procédures décrites à la section 4, on devrait tenir compte des points mentionnés en 6.4.

Rapports à produire

Chaque rapport d'essai doit indiquer si l'on s'est écarté des « obligations » énoncées aux sections 2 à 7 de la présente méthode et, le cas échéant, fournir des précisions. À la lecture du rapport d'essai, on doit être en mesure de déterminer si les conditions et les modes opératoires observés avant et pendant l'essai ont su assurer la validité et l'acceptabilité des résultats pour l'usage que l'on entend en faire.

La sous-section 8.1 énumère les éléments qui doivent être intégrés dans chaque rapport d'essai, tandis que la sous-section 8.2 décrit les éléments qui doivent figurer dans le rapport d'essai, être fournis séparément dans un rapport général ou être conservés dans les dossiers pendant au moins 5 ans. Des programmes particuliers de surveillance ou des protocoles expérimentaux connexes pourraient exiger de faire figurer dans le rapport d'essai certains des éléments énumérés en 8.2 et propres à l'essai, ou spécifier que certains renseignements au sujet de l'essai soient « conservés dans les dossiers » (p. ex. des précisions sur la substance ou la matière d'essai et/ou les modes opératoires et conditions précis ayant coïncidé avec le prélèvement, la manipulation, le transport et l'entreposage des échantillons).

On peut citer les modes opératoires et les conditions communs à une série d'essais en cours (p. ex. des essais toxicologiques systématiques exécutés à des fins de surveillance ou de vérification de la conformité aux règlements) et satisfaisant aux exigences de la présente méthode, ou joindre un rapport général exposant dans ses grandes lignes la pratique ordinairement suivie au laboratoire.

Les détails relatifs à la conduite et aux résultats de l'essai qui ne sont consignés ni dans le rapport d'essai ni dans un rapport général doivent être conservés par le laboratoire pendant au moins

5 ans, de sorte que l'on puisse fournir l'information pertinente si l'essai doit faire l'objet d'une vérification. L'information conservée dans les dossiers pourrait comprendre les éléments suivants :

- un enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons mis à l'essai à des fins de surveillance ou d'application d'un règlement;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons;
- certains résultats des analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons;
- les notes de laboratoire relatives aux observations et aux mesures effectuées au cours de l'essai;
- les notes de laboratoire et la ou les cartes de contrôle des essais toxicologiques de référence;
- les dossiers détaillés concernant l'origine et la santé des organismes;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

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

8.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

Voici la liste des éléments qui doivent figurer dans le rapport d'essai.

8.1.1 Substance ou matière d'essai

- Une courte description du type d'échantillon (p. ex. produit ou substance chimique, effluent, éluviat, lixiviât ou eau réceptrice), tel qu'il a été transmis, le cas échéant, au personnel de laboratoire;
- des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon;
- la date du prélèvement de l'échantillon; la date et l'heure d'arrivée au laboratoire;
- la mesure du pH de l'échantillon aqueux immédiatement avant sa préparation et son utilisation dans l'essai de toxicité;
- dans le cas d'un effluent ou d'un lixiviât, mesure de la température de l'échantillon à l'arrivée au laboratoire;
- dans le cas d'un essai sur éluviat, les dates de préparation et d'utilisation de l'éluviat.

8.1.2 Organismes d'essai

- Le nom de l'espèce, le numéro de la souche et l'origine de la culture;
- l'âge (c.-à-d. 3 à 7 jours), au début de l'essai, de la culture ayant servi à fournir les inoculums d'organismes d'essai;
- tout aspect ou traitement inhabituels de la culture d'âge connu, avant son emploi dans l'essai.

8.1.3 Installations d'essai et appareils

- Le nom et l'adresse du laboratoire;
- le nom de la ou des personnes ayant réalisé l'essai.

8.1.4 Eau témoin/de dilution

- Le ou les types d'eau utilisés comme eau témoin/de dilution, de même que la ou les sources de celle-ci;

- le type et la quantité de tout produit chimique ajouté à l'eau témoin/de dilution.

8.1.5 Méthode d'essai

- Le nom de la méthode d'essai biologique utilisée (c.-à-d. celle décrite dans le présent document);
- le plan d'étude s'il s'agit d'une procédure spéciale (p. ex. essai mené avec ou sans filtration de l'échantillon; essai mené avec ou sans rajustement du pH de l'échantillon; préparation et utilisation de l'éluviat; préparation et utilisation d'un solvant et, le cas échéant, du témoin avec solvant);
- le nom du ou des programmes et des méthodes employés pour calculer les paramètres statistiques, de même que des renvois à ces programmes et méthodes.

8.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La raison et la description de tout écart ou de toute omission, le cas échéant, en regard des modes opératoires et conditions exposés dans le présent document;
- la température d'essai moyenne;
- le nombre et la concentration des solutions d'essai;
- le nombre d'alvéoles de répétition par traitement (y compris les témoins);
- la densité cellulaire initiale dans les alvéoles de la microplaque au début de l'essai;
- une description (p. ex. de la procédure, du débit et de la durée) de l'aération, le cas échéant, de l'échantillon ou des solutions expérimentales avant le début de l'essai;
- une description de la méthode de filtration de l'échantillon;

- une brève description de tout échantillon ou de toute solution d'essai dont le pH a été rajusté, y compris la ou les méthodes de rajustement utilisées;
- la mesure du pH de l'échantillon avant dilution, au début de l'essai;
- la mesure du pH des 2 alvéoles médianes témoins au début et à la fin de l'essai;
- la date du début et de la fin de l'essai; la durée de l'essai.

8.1.7 Résultats

- La concentration cellulaire dans chaque répétition (y compris les témoins) à la fin de l'essai;
 - si l'absorbance est utilisée, la concentration cellulaire (numération directe) dans les 3 alvéoles contenant les concentrations d'essai élevée, médiane et faible, de même que leurs valeurs correspondantes estimées par absorbance;
 - le rendement cellulaire moyen (± 2 ET) à $t = 72$ h pour chaque traitement (y compris les témoins), avec les coefficients de variation correspondants ($CV = 100 \times \text{écart type/moyenne}$);
 - les résultats du test de Mann-Kendall (le cas échéant);
 - la CI_p (et ses limites de confiance à 95 %) du rendement cellulaire, obtenue au moyen de concentrations corrigées pour tenir compte du volume d'inoculum algal et de milieu d'enrichissement; des précisions relatives à toute technique de pondération appliquée aux données; une indication de la méthode quantitative utilisée;
 - les valeurs aberrantes ainsi que la justification de leur suppression;
- des précisions relatives à toute transformation statistique obligatoire des données;
 - la CI_p et ses limites de confiance à 95 % pour tout essai avec un ou des toxiques de référence entrepris dans les 14 jours englobant la période réservée à l'essai de toxicité, de même que la moyenne géométrique (± 2 ET) pour le ou les mêmes toxiques de référence obtenue à l'installation d'essai lors d'essais antérieurs;
 - toute observation d'une stimulation de la croissance, quelle que soit la concentration;
 - toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

8.2 Exigences supplémentaires

Voici la liste des éléments qui doivent soit être inclus dans le rapport d'essai, soit être conservés dans les dossiers pendant au moins 5 ans.

8.2.1 Substance ou matière d'essai

- Le nom de la ou des personnes ayant prélevé et/ou fourni l'échantillon;
- la chaîne de transmission et les fiches d'inscription de l'échantillon;
- l'état de l'échantillon à l'arrivée et pendant l'entreposage (p. ex. température, conservation dans l'obscurité, dans un récipient étanche).

8.2.2 Organismes d'essai

- La description des conditions et des méthodes de culture, y compris l'éclairage (intensité et qualité) et la température; la composition du milieu de croissance; les méthodes et les conditions de préparation et d'entreposage du milieu de croissance;
- la fréquence de renouvellement des cultures;

- les méthodes, les observations et les dossiers relatifs à la pureté des cultures mères;
- la confirmation que les cellules algales utilisées pour l'inoculum algal ne proviennent pas de la première culture mère obtenue de la culture de départ (v. 4.3.1);
- les enregistrements de toutes les courbes de croissance établies pour surveiller l'état de santé et le rendement des cultures.

8.2.3 Installations et appareillage

- La description des incubateurs et de l'appareillage employés pour la culture et pour l'essai;
- la description des systèmes de réglage de l'éclairage et de la température dans les installations de culture et d'essai;
- la description des procédures utilisées pour nettoyer ou rincer l'appareillage.

8.2.4 Eau témoin/de dilution

- Des précisions sur l'échantillonnage et l'entreposage si l'eau témoin/de dilution était de l'eau réceptrice d'« amont »;
- des précisions concernant tout prétraitement de l'eau (p. ex. méthodes et conditions de filtration, stérilisation, ajustement de la température, dégazage, aération, rajustement du pH);
- toute variable de la qualité de l'eau mesurée avant l'essai et/ou au démarrage de l'essai.

8.2.5 Méthode d'essai

- Une description de l'expérience accumulée par le laboratoire dans l'application de cette méthode d'essai biologique pour la mesure de la toxicité au moyen de *P. subcapitata*;
- des précisions sur la date et l'heure de la préparation de l'inoculum algal par rapport au début de l'essai;

- le type de microplaque utilisée (jetable, alvéoles à fond rond ou à fond plat; en verre);
- pour les essais sur des substances chimiques seulement, la comparaison de la sorption de ces dernières sur les microplaques en polystyrène et celles en verre (le cas échéant);
- la méthode utilisée pour préparer et entreposer les solutions mères et/ou les solutions d'essai des substances chimiques; la description et la ou les concentrations de tout solvant utilisé;
- les méthodes utilisées (avec références) pour les analyses chimiques de l'échantillon ou des solutions d'essai; des précisions sur le prélèvement, la préparation et l'entreposage de l'échantillon ou des solutions d'essai, avant les analyses chimiques;
- la description de l'essai préliminaire réalisé pour déterminer la gamme de concentrations.

8.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La *photopériode*, la source lumineuse et l'intensité lumineuse à proximité de la surface des solutions d'essai;
- l'aspect de l'échantillon et des solutions d'essai avant et après la filtration de l'échantillon;
- les méthodes ayant servi à mesurer les concentrations cellulaires et à calculer le rendement cellulaire;
- les mesures de la qualité de l'eau utilisée comme eau témoin/de dilution;
- toute autre mesure physique ou chimique de l'échantillon et des solutions mères (p. ex. concentrations de la ou des substances chimiques visées, avant et/ou au début de l'essai);

- les conditions, les modes opératoires, la fréquence, les dates et heures des essais de toxicité réalisés avec un ou des toxiques de référence.

8.2.7 Résultats de l'essai

- Les résultats du test de Mann-Whitney (le cas échéant);
- les résultats de l'essai préliminaire (le cas échéant);
- la représentation graphique des données concentration-réponse;
- une carte de contrôle montrant les résultats les plus récents et les résultats plus anciens des essais toxicologiques réalisés avec un ou des toxiques de référence;
- tout autre effet observé;
- les originaux des notes de laboratoire et d'autres feuilles de données, signés et datés par les membres du personnel de laboratoire qui ont effectué les essais et les analyses connexes.

Références

- Acreman, J., *Axenic Culture Techniques for Lemna*, Collection de cultures de l'Université de Toronto, Département de botanique, Université de Toronto, Toronto (Ont.) (2006).
- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation), « Toxicity », partie 8000, p. 8-1 à 8-173, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21^e éd., Washington, DC (2005).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Practice for Algal Growth Potential Testing with *Pseudokirchneriella subcapitata* », p. 22-26, dans : *2006 Annual Book of ASTM Standards*, Vol. 11.06, rapport D-3978-04, West Conshohocken, PA (2006).
- Billington, J.W., G.L. Huang, F. Seto, W.Y. Shiu et D. MacKay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:117-124 (1988).
- Blaise, C., Développement de bioessais sublétaux pour les évaluations écotoxicologiques des effluents, thèse de doctorat en toxicologie de l'Université de Metz (France) (1984).
- , « Micromethod for Acute Aquatic Toxicity Assessment Using the Green Alga *Selenastrum capricornutum* », *Tox. Asses.*, 1:377-385 (1986).
- , « Microbiotests in Aquatic Ecotoxicity: Characteristics, Utility and Prospects », *Environ. Toxicol. Water Quality*, 6:145-155 (1991).
- Blaise, C., R. Legault, N. Bermingham, R. van Coillie et P. Vasseur, « A Simple Microplate Algal Assay Technique for Aquatic Toxicity Assessment », *Toxicity Assessment*, 1:261-281 (1986).
- Blaise, C., G. Sergy, P. Wells, N. Bermingham et R. van Coillie, « Biological Testing, Development, Application and Trends in Canadian Environmental Protection Laboratories », *Tox. Asses.*, 3:385-406 (1988).
- Blaise, C., et M. Harwood, « Contribution à l'évaluation écotoxicologique du tébuthiuron - un herbicide de la classe des urées substituées », *Revue des sciences de l'eau*, 4:121-134 (1991).
- Blanck, H., *The Algal Microtest. An Algal Test Battery for Routine Studies of Growth Inhibition*, rapport présenté au Bureau national suédois d'inspection des substances chimiques et à l'Organisation de coopération et de développement économiques (1987).
- Blanck, H., et B. Björnsäter, *The Algal Microtest Battery. A Manual for Routine Tests of Growth Inhibition*, rapport présenté au Bureau national suédois d'inspection des substances chimiques, PrintGraf, Stockholm, Suède (1989).
- CEAEQ (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec), *Méthode d'analyse – Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue Pseudokirchneriella subcapitata*, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, MA. 500 – P – sub. 1.0 (2005).

- CEE (Communauté économique européenne), « Essai d'inhibition de la croissance des algues », Directive de la CEE, *Journal officiel de communautés européennes*, n° L 133:89–94 (1988).
- Deitzer, G., « Spectral comparisons of sunlight and different lamps », *c74*, p. 197–199, dans : *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop*, T.W. Tibbits (réd.), Madison, WI (1994).
- Eberius, M., G. Mennicken, I. Reuter et J. Vandenhirtz, « Sensitivity of different growth inhibition tests—just a question of mathematical calculation? » *Ecotoxicology*, 11:293–297 (2002).
- EC (Environnement Canada), *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*, Rapport SPE 1/RM/12, Conservation et Protection, Protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1990).
- , *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité*, rapport SPE 1/RM/46, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Ottawa (Ont.) (2005).
- Gilbert, R.O., *Statistical Methods for Environmental Pollution Monitoring*, Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY (1987).
- Harwood, M., Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, communication personnelle (2006).
- ISO (Organisation internationale de normalisation), *Qualité de l'eau — Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce Scenedesmus subspicatus et Scenedesmus capricornutum*, Norme internationale 8692:1989(E), Genève, (Suisse) (1989).
- , *Water quality – Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae*, Norme internationale provisoire 8692:2002(E), Genève, Suisse (2002).
- , *Water quality – Scientific and technical aspects of batch algae growth inhibition tests*, Rapport technique provisoire N213, Genève, Suisse (2006).
- Miller, W.E., J.C. Greene et T. Shiroyama, *The Selenastrum capricornutum Printz Algal Assay Bottle Test*, rapport 600/9-78-018 de l'USEPA, Corvallis OR (1978).
- Nygaard, G., J. Komárek, J. Kristiansen et O. Skilberg, « Taxonomic Designations of the Bioassay Alga, NIVA-CHL I (*Selenastrum capricornutum*) and some related strains », *Opera Botanica No. 90* (1986).
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques – Algues - essai d'inhibition de la croissance, document n° 201, Paris, France (1984).
- , *Guidelines for the Testing of Chemicals – Proposal for updating Guideline 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*, document n° ENV/JM(2004)33/ANN3, Paris, France (2004).
- Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young, *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish*, Ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria (C.-B) (1982).

- Sager, J.C., et C. McFarlane, « Radiation », p. 1–30, dans : *Plant Growth Chamber Handbook*, R.W. Langhans et T.W. Tibbits (éd.), North Central Regional Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report No. 99, Iowa State University of Science and Technology, Ames, IA (1997).
- Scroggins, R.P., J.A. Miller, A.L. Borgmann et J.B. Sprague, « Sublethal Toxicity Findings by the Pulp and Paper Industry for Cycle 1 and 2 of the Environmental Effects Monitoring Program », *Water Qual. Res. J. Canada*, 37:21–48 (2002).
- Sergy, G., Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environment Protection, rapport d'Environnement Canada, Edmonton (Alb.) (1987).
- Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. MacKay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II Multicomponent Systems – Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:125–137 (1988).
- Stratton, G.W., et T.M. Smith, « Interaction of Organic Solvents with the Green Alga, *Chlorella pyreboitosa* », *Bull. Environ. Toxicol.*, 40:736–742 (1988).
- St-Laurent, D., C. Blaise, P. MacQuarrie, R. Scroggins et B. Trottier, « Comparative Assessment of Herbicide Phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* Using Microplate and Flask Bioassay Procedures », *Environ. Toxicol. Water Quality*, 7:35–48 (1992).
- Thellen, C., C. Blaise, Y. Roy et C. Hickey, « Round Robin Testing with *Selenastrum capricornutum* Microplate Toxicity Assay », *Hydrobiologia*, 188/189:259–268 (1989).
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, rapport EPA-821-R-02-013, 4^e éd., Washington, DC (2002).
- Warner, J., Environmental and Toxicological Effects of Chromated Copper Arsenate, Pentachlorophenol and Preserved Wood, mémoire de maîtrise en science, Université de Guelph, Guelph (Ont.) (1990).
- Weyers, A., et G. Vollmer, « Algal growth inhibition: effect of the choice of growth rate or biomass as endpoint on classification and labelling of new substances notified in the EU », *Chemosphere*, 41:1007–1010 (2000).
- Zar, J.H., *Biostatistical Analysis*, 4^e éd., Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, NJ (1999).

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

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur <i>Daphnia</i> spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie du cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21 2 ^e édition	Février 2007	—
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22	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 d'une algue d'eau douce	SPE 1/RM/25 2 ^e édition	Mars 2007	—
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27	Décembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique)	SPE 1/RM/28 1 ^{re} édition	Décembre 1992	Janvier 1995
Essai de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2 ^e édition	Juillet 1998	—

^a Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Services des communications, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada. Pour en commander des copies papier, prière d'envoyer un courriel à eps pubs@ec.gc.ca. Il est également possible de les télécharger gratuitement en format PDF à partir de l'adresse suivante : http://www.etc-cte.ec.gc.ca/organization/bmd/bmd_publicist_f.html. Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le chef de la Division des méthodes biologiques, Centre des sciences et technologies environnementales, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)			
Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes (<i>Chironomus tentans</i> ou <i>Chironomus riparius</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	—
Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyaella azteca</i> dans les sédiments	SPE 1/RM/33	Décembre 1997	—
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37 2 ^e édition	Janvier 2007	—
Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides (<i>Polydora cornuta</i>) dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	—
Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre <i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia fetida</i> ou <i>Lumbricus terrestris</i>	SPE 1/RM/43	Juin 2004	—
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Février 2005	—
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol (titre provisoire)	SPE 1/RM/47	Décembre 2006	—
B. Méthodes de référence^b			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 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 de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/35	Décembre 1998	—
Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	—

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

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
C. Documents d'orientation			
Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence	SPE 1/RM/12	Août 1990	—
Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques	SPE 1/RM/29	Décembre 1994	—
Document d'orientation sur la mesure de la précision des essais de toxicité sur sédiment de contrôle dopé avec un produit toxique de référence	SPE 1/RM/30	Septembre 1995	—
Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats	SPE 1/RM/34	Décembre 1999	—
Guide des essais de pathogénicité et de toxicité de nouvelles substances microbiennes pour les organismes aquatiques et terrestres	SPE 1/RM/44	Mars 2004	—
Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité	SPE 1/RM/46	Mars 2005	—

Membres du Groupe intergouvernemental sur l'écotoxicité^a (en décembre 2006)

Gouvernement fédéral, Environnement Canada

W. Antonioli
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alb.)

C. Blaise
Centre Saint-Laurent
Montréal (Qué.)

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

J. Bruno
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

C. Buday
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

K. Doe
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

G. Elliott
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alb.)

F. Gagné
Centre St-Laurent
Montréal (Qué.)

M. Harwood
Service de la protection de l'environnement
Montréal (Qué.)

S. Hendry
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

D. Hughes
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

P. Jackman
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

N. Kruper
Service de la protection de l'environnement
Edmonton (Alb.)

M. Linssen
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

L. Porebski
Direction du milieu marin
Gatineau (Qué.)

J. Princz
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

G. Schroeder
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

R. Scroggins
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

T. Steeves
Centre des sciences de l'environnement, région
de l'Atlantique
Moncton (N.-B.)

^a Ancien nom : Groupe intergouvernemental sur la toxicité
aquatique.

D. Taillefer
Direction du milieu marin
Gatineau (Qué.)

L. Taylor
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

S. Trottier
Centre St-Laurent
Montréal (Qué.)

G. van Aggelen
Centre des sciences de l'environnement, région
du Pacifique
North Vancouver (C.-B.)

L. Van der Vliet
Centre de technologie environnementale
Ottawa (Ont.)

B. Walker
Centre St-Laurent
Montréal (Qué.)

P. Wells
Service de la conservation de l'environnement
Dartmouth (N.-É.)

Gouvernement fédéral, Pêches et Océans Canada

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

Gouvernement fédéral, Ressources naturelles Canada

M. Schwartz
Laboratoire des sciences minérales, CANMET
Ottawa (Ont.)

B. Vigneault
Laboratoire des sciences minérales, CANMET
Ottawa (Ont.)

Gouvernements provinciaux

C. Bastien
Ministère de l'Environnement du Québec
Ste-Foy (Qué.)

B. Bayer
Ministère de l'Environnement du Manitoba
Winnipeg (Man.)

K. Hunter
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

D. Poirier
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

J. Schroeder (président)
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Toronto (Ont.)

T. Watson-Leung
Ministère de l'Environnement de l'Ontario
Rexdale (Ont.)

Administration centrale et bureaux régionaux d'Environnement Canada

Administration centrale

351, boul. Saint-Joseph
Place Vincent-Massey
Gatineau (Qué.)
K1A 0H3

Région de l'Atlantique

Queen Square, 15^e étage
45, Alderney Drive
Dartmouth (N.-É.)
B2Y 2N6

Région du Québec

105, rue McGill, 8^e étage
Montréal (Qué.)
H2Y 2E7

Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin, 2^e étage
Downsview (Ont.)
M3H 5T4

Région de l'Ouest et du Nord

Twin Atria n^o 2, bureau 210
4999, 98^e Avenue
Edmonton (Alb.)
T6B 2X3

Région du Pacifique et du Yukon

401, rue Burrard
Vancouver (C.-B.)
V6C 3S5

Procédures générales de maintien de conditions stériles – *Pseudokirchneriella subcapitata* (modifié d'après Acreman, 2006)

Les cultures algales axéniques sont exemptes de contaminants microbiens. Elles sont produites dans des conditions stériles en milieu liquide ou sur gélose nutritive à l'aide de méthodes semblables à celles utilisées en microbiologie et pour la culture de tissus végétaux. De bonnes techniques stériles sont essentielles à la culture axénique de *P. subcapitata*. Il est indispensable de surveiller les cultures de près et de vérifier régulièrement si elles sont contaminées par des organismes microbiens. Une règle de base à appliquer à l'égard de toute culture axénique consiste à traiter la zone de manipulation des cultures de la même façon qu'un bloc opératoire. Une culture axénique est précieuse; si elle devient contaminée, il n'est pas toujours facile de l'assainir. Il faut toujours prévoir de nombreuses cultures filles pour s'assurer qu'au moins une culture reste stérile. Les directives ci-dessous devraient contribuer à réduire la contamination microbienne éventuelle des cultures.

Maintien de la propreté du laboratoire

On devrait nettoyer tous les 2–3 mois les zones d'entreposage ou d'incubation des cultures avec une solution d'hypochlorite de sodium (agent de blanchiment) à 1 % afin de réduire la quantité d'acariens détriticoles, de bactéries et de spores fongiques. Il faut nettoyer la zone à l'aspirateur avant d'employer cette solution afin d'éliminer les contaminants organiques présents, car ceux-ci atténueront l'efficacité du traitement. On devrait toujours utiliser une solution fraîchement préparée et la laisser agir pendant au moins 20–30 min sur les surfaces traitées. Une fois le contenant ouvert, la solution de blanchiment concentrée se conserve de 4 à 6 mois, selon qu'elle est exposée ou non à la lumière et à des températures élevées. Comme solution de rechange, on peut mélanger de l'hypochlorite de calcium granulaire dans de l'eau, à raison d'environ 10 g/L, ce qui donnera une solution possédant une teneur en chlore disponible de 70 %. La poudre sèche a pour avantage supplémentaire de se conserver longtemps : si elle est gardée au sec et au frais dans un contenant hermétique, on peut l'entreposer jusqu'à 10 ans, sans qu'elle subisse de dégradation importante. Voir « Solutions pour la désinfection des surfaces de travail » ci-après pour plus de détails sur la préparation de ces solutions.

Hotte à flux laminaire : fonctionnement et entretien

Une hotte à flux laminaire est idéale pour manipuler des cultures axéniques. On devrait appliquer un programme d'entretien régulier pour s'assurer que la hotte fonctionne adéquatement. Il existe des hottes peu coûteuses, dont le prix varie entre 1 000 \$ et 3 000 \$ (Envirco, États-Unis; tél. : 1-800-645-1610).

Le filtre à particules à haute efficacité (HEPA) constitue l'élément le plus important d'une hotte à flux laminaire. L'air de la pièce est aspiré dans l'unité et passe à travers un préfiltre qui retient les contaminants grossiers (charpie, poussière, etc.). L'air est ensuite comprimé et entraîné derrière le filtre HEPA puis à travers celui-ci en un écoulement laminaire. L'air purifié ressort au-dessus de l'ensemble de la surface de travail sous forme de lignes parallèles, et ce, à une vitesse uniforme. Le filtre HEPA supprime environ 99 % des bactéries et des spores fongiques de plus de 0,22 µm de diamètre présents dans l'air. Pour que son rendement soit maximal, il devrait être remplacé approximativement tous les 7 ans. Il convient de vérifier régulièrement le filtre pour détecter toute fissure ou tout dommage attribuable à des instruments coupants. Un professionnel d'une entreprise spécialisée dans les filtres

(p. ex. H.E.P.A. Filter Services Inc.; tél. : 1-800-669-0037) devrait vérifier chaque année la vitesse d'écoulement laminaire afin de repérer toute zone obstruée ou endommagée.

S'il n'existe pas de service d'évaluation ou si votre budget ne vous permet pas d'assumer les coûts d'un tel service, vous pouvez vérifier l'efficacité de la hotte à l'aide de plaques à la gélose pour essais de stérilité. Ces plaques sont préparées à partir d'un milieu de croissance auquel on ajoute des matières organiques comme du glucose (1 g/L), de la peptone (1 g/L) ou un extrait de levure (0,3 g/L). Il est indiqué de vérifier périodiquement l'efficacité de la hotte au moyen de cette méthode entre les visites du spécialiste des filtres. Répartir les plaques au centre de la table de travail et les laisser ouvertes pendant au moins 24 h, avec la hotte en marche. Noter l'emplacement de chaque plaque numérotée. Fermer les plaques, les sceller à l'aide de deux feuilles de Parafilm et les laisser dans un endroit chaud et sombre pendant au moins 5 jours afin de surveiller la croissance bactérienne ou fongique. Si ce test montre que certaines parties du filtre HEPA sont défectueuses, il est possible de réparer le filtre en injectant un produit d'étanchéité à base de silicone, à la condition que les zones endommagées soient restreintes. Les réparations étendues entraîneront une certaine turbulence de l'air dans la zone de travail. On devrait si possible confier les réparations à une entreprise spécialisée dans l'équipement doté de filtres HEPA.

Il est préférable de faire fonctionner en permanence les hottes à flux laminaire. Si cela n'est pas pratique, on devrait installer une lampe ultraviolette germicide afin de stériliser toutes les surfaces. Le ventilateur soufflant de la hotte devrait être mis en marche au moins 30 min avant l'utilisation afin de s'assurer que l'air présent dans la hotte est stérile.

Il est recommandé de laisser une lampe ultraviolette allumée lorsque la hotte n'est pas utilisée. Si cela n'est pas faisable, on devrait la laisser allumée au moins pendant 30 min avant d'utiliser la hotte. Si elle est mal employée, une lampe ultraviolette peut occasionner des brûlures de la peau et des yeux. L'observation des recommandations suivantes assurera une utilisation sûre et fiable des lampes germicides :

- Afficher des mises en garde près de la lampe.
- Nettoyer l'ampoule au moins toutes les deux semaines; après avoir débranché la lampe, essuyer l'ampoule avec un chiffon humecté d'alcool.
- Des facteurs comme l'âge de la lampe et un mauvais entretien peuvent réduire le rendement de celle-ci. Mesurer la puissance de rayonnement de l'ampoule au moins deux fois par année à l'aide d'un UV-mètre ou remplacer l'ampoule lorsque le rayonnement diminue à 70 % de sa puissance nominale (après un an, environ, d'usage normal). Si aucun UV-mètre n'est disponible, remplacer l'ampoule une fois par année.

Il faudrait nettoyer la zone de travail sous la hotte, y compris le dessus et les côtés de la table de travail, au moyen d'un agent nettoyant comme Bio-Clean, Cidex, Sporocidin (VWR) ou Viralex (Canadawide). L'éthanol est un bon désinfectant microbien, mais il n'est pas recommandé comme agent de stérilisation, car il ne constitue pas un fongicide ou un virucide efficace et il ne détruira pas les spores bactériennes. L'alcool (p. ex. l'éthanol) à des concentrations inférieures à 90 % est plus efficace que l'alcool pur du fait que l'eau servant à le diluer permet une meilleure pénétration des parois cellulaires bactériennes. La gamme optimale de concentrations se situe entre 70 % et 80 %; le temps de contact ne devrait pas être inférieur à 10 min. On vaporise les agents nettoyants sur la surface à traiter, puis on les laisse agir pendant le laps de temps approprié avant de les essuyer avec des essuie-tout ou des chiffons non pelucheux. Il faut nettoyer la surface de travail avant et après chaque utilisation.

La hotte doit être dégagée. Il faut maintenir une voie directe et non obstruée entre le filtre HEPA et la zone de manipulation des cultures à l'intérieur de la hotte. Les particules qui se détachent des objets non stériles (contenants de solutions, mains, etc.) contaminent l'air en aval de ceux-ci. Éviter de conserver de grands contenants dans la hotte.

Il faudrait vérifier qu'il n'y a aucune accumulation de poussière dans les préfiltres; ceux-ci devraient être lavés tous les 2–3 mois, selon le degré d'empoussièrement de la zone de travail. On devrait les assécher entièrement avant de les remettre en place. Les préfiltres non lavables devraient être jetés lorsqu'ils sont poussiéreux.

Maintien des cultures sur une table de laboratoire

À défaut d'une hotte à flux laminaire, on peut manipuler les cultures sur une table de laboratoire, à la condition de disposer d'un bec Bunsen et d'une zone de travail propre, à l'abri des courants d'air. Il serait préférable de travailler dans une pièce réservée exclusivement aux cultures cellulaires, où très peu de gens circulent. La pièce peut être dotée d'une lampe ultraviolette qui servira à stériliser la zone de travail. On nettoie cette zone au moyen d'un agent nettoyant comme Bio-Clean, Cidex, Sporocidin (VWR) ou Viralex (Canadawide), puis à l'aide d'éthanol à 70 %. Voir les directives ci-dessus sur la façon de procéder. Il faut nettoyer la surface de travail avant et après chaque utilisation. Une fois la zone de travail asséchée, on allume le bec Bunsen et l'on procède au repiquage près de la flamme. La chaleur et la convection du bec Bunsen permettent d'obtenir un milieu stérile autour de la zone de travail. Il faut faire preuve de prudence lorsqu'on utilise un liquide inflammable comme l'éthanol autour d'un bec Bunsen. Il faut aussi travailler rapidement pour éviter la pénétration de contaminants.

Stérilisation des anses et autres instruments

Les becs Bunsen et autres brûleurs à gaz à flamme continue sont efficaces pour stériliser les anses et autres instruments sur une aire de travail ouverte, mais ils peuvent créer de la turbulence lorsqu'ils sont utilisés dans une enceinte à flux laminaire et perturber ainsi l'écoulement d'air protecteur de l'enceinte; en outre, la chaleur produite par la flamme continue peut endommager le filtre HEPA. S'il faut utiliser un brûleur à gaz sous une hotte, on devrait en choisir un doté d'une veilleuse; au moins 20 cm devraient séparer le brûleur et le filtre HEPA. On pourrait aussi envisager l'utilisation d'un stérilisateur électrique pour stériliser les anses. On peut également employer des anses et des aiguilles en plastique jetables pour les travaux de culture si l'on ne dispose pas d'un incinérateur électrique ou d'une flamme au gaz.

Nettoyage des mains et équipement de protection individuel

Avant de procéder à une manipulation ou à un repiquage, il faut enlever bagues et autres bijoux et se laver les mains à fond avec un savon antibactérien, puis avec un nettoyant anhydre à base d'alcool (Endure, One-Step, etc.). Porter une attention particulière aux parties des mains qui peuvent entrer en contact avec les récipients de culture ou les anses de transfert. Il est recommandé de porter des gants d'examen (p. ex. en nitrile ou Microflex) pour manipuler les cultures. Les gants peuvent aussi être nettoyés avec de l'éthanol ou un nettoyant anhydre. Après avoir enlevé vos gants (et les avoir jetés), lavez vos mains encore une fois avec un savon antibactérien. Il est également recommandé de porter un sarrau de laboratoire, qui protégera les vêtements de l'utilisateur contre les déversements fortuits ou les accidents, de même que des lunettes de sécurité, qui protégeront les yeux contre les infections ou la perte de la vue attribuables à des déversements fortuits, à des éclaboussures et à des accidents; ces simples mesures de prévention contribueront à rendre le milieu de travail sécuritaire et sain.

Préparation et stérilisation des milieux d'essai

L'autoclavage constitue la technique de stérilisation des milieux de culture la plus répandue et la garantie ultime de stérilité (y compris pour détruire les virus). Il est recommandé de stériliser par

filtration les milieux de croissance liquides utilisés avec *P. subcapitata* (v. 2.3.1). Les autoclaves commerciaux sont le plus indiqués, mais les autocuiseurs de différentes capacités conviennent également. La stérilisation exige le maintien d'une pression de 15 psi et d'une température de 121 °C pendant 15 min dans la totalité du liquide (il faut prévoir des périodes plus longues pour des volumes plus élevés, soit environ 25 min pour 100–200 mL, 30 min pour >200–1 000 mL, 45 min pour 1–2 L et 60 min pour >2 L). Il est préférable d'autoclaver le milieu en petits lots afin de réduire la durée de l'autoclavage efficace et de prévenir tout changement chimique du milieu en raison d'une longue exposition à des températures élevées. On devrait éviter de mettre des charges trop élevées dans l'autoclave, car il faudra plus de temps pour qu'elles atteignent la température de stérilisation, sans compter le risque que le milieu ne soit pas stérilisé adéquatement.

Pour savoir si la température voulue a été atteinte, on devrait apposer, sur l'extérieur des récipients contenant le milieu d'essai et sur les emballages du matériel à stériliser, une bandelette indicatrice thermosensible qui change de couleur. De telles bandelettes NE SONT PAS une garantie de stérilité – elles indiquent seulement qu'une procédure de stérilisation a été appliquée. Il est impératif de vérifier que les volumes importants de milieu d'essai ou que les charges élevées placés dans l'autoclave ont atteint la température de stérilisation voulue. On peut se servir de bioindicateurs vendus sur le marché dans des ampoules scellées (p. ex. Raven Biological Laboratories), ou encore d'intégrateurs chimiques à bande de couleur (p. ex. STEAMPlus Steam Sterilization Integrator, de SPS Medical). Il existe une autre méthode de rechange simple : on place un petit morceau de ruban à autoclave dans une pipette Pasteur, on scelle la pointe de celle-ci à la chaleur, puis on bouche l'autre extrémité à l'aide d'un tampon ouaté. Après avoir attaché une ficelle en coton à la pipette, on abaisse celle-ci dans le milieu, en maintenant l'extrémité dotée du tampon ouaté à 10–15 cm au-dessus de la surface du liquide. On fixe au moyen d'une bande adhésive l'autre extrémité de la ficelle sur l'extérieur du flacon, ce qui permet de retirer facilement l'indicateur. On récupère l'indicateur une fois l'opération terminée et l'on confirme que sa couleur a changé également. Cette dernière méthode n'est pas aussi fiable que celle faisant appel à des bioindicateurs ou à des intégrateurs chimiques à bande de couleur.

Il faudrait vérifier régulièrement l'efficacité de l'autoclave au moyen d'essais avec des bioindicateurs renfermant des spores bactériennes. Il existe sur le marché des trousse d'indicateur d'essai (p. ex. VWR, n° de cat. 55710-014) qui utilisent des spores de *Bacillus stearothermophilus* rendues non viables à 121 °C (250 °F). Pour l'essai, on autoclave des bandelettes ou des ampoules de spores de *B. stearothermophilus*, on les met à incuber pendant 48 h dans un bouillon de soja tryptique, puis on observe tout indice de croissance, ce qui indiquerait que l'autoclave ne fonctionne pas adéquatement.

Les plaques à la gélose sont utiles pour le maintien à long terme des cultures de *P. subcapitata*. On les prépare habituellement au moins 2 jours avant leur utilisation, puis on les laisse sécher dans la hotte à flux laminaire avant de les sceller avec deux feuilles de Parafilm (VWR) ou de Duraseal (VWR ou Sigma). Si les plaques à la gélose ne sont pas utilisées une semaine environ après leur préparation, il faudrait les envelopper dans une pellicule plastique, les retourner, les placer dans des sacs en plastique fermés hermétiquement, puis les entreposer à la température ambiante pendant quelques jours, ce qui permettra de surveiller toute trace de contamination avant de les mettre au réfrigérateur. Dans le cas des géloses inclinées, placer les tubes à un angle de 45° et laisser la gélose prendre; les bouchons doivent être légèrement dévissés afin de prévenir une condensation excessive. Après le séchage, bien resserrer les bouchons et réfrigérer les géloses inclinées après les avoir laissées à la température ambiante afin de surveiller toute trace de contamination. Les géloses inclinées et les plaques à la gélose peuvent être entreposées pendant plusieurs mois à 4 °C.

Techniques de transfert

Il faudrait toujours observer les procédures suivantes lors du transfert des cultures :

- Tous les récipients de culture, outils de transfert, pipettes avec tampon ouaté et milieux doivent être stérilisés et prêts à l'emploi. Les milieux de culture devraient être maintenus à la température ambiante.
- Se laver les mains à fond et porter un sarrau de laboratoire, des gants en nitrile et des lunettes de sécurité.
- Les anses devraient être stérilisées au moyen d'un stérilisateur à flamme ou électrique pendant 15 secondes, soit jusqu'à ce qu'elles soient chauffées au rouge. Les refroidir par contact avec la gélose ou un liquide stériles avant de les utiliser.
- Dégager la hotte à flux laminaire ou la zone de travail pour que rien n'entrave l'air circulant entre le filtre HEPA et la zone de repiquage ou la flamme. Rien ne doit venir en contact avec le filtre HEPA.
- Nettoyer la zone de travail sous la hotte ou sur la table de travail immédiatement avant chaque utilisation, tout en prenant soin de ne pas vaporiser de solution sur le filtre HEPA. Nettoyer la zone de nouveau une fois les transferts terminés.
- Pour réduire au minimum la contamination, toujours procéder aux transferts à au moins 15 cm (6 po) du devant de la hotte ou de la flamme du bec Bunsen afin de s'assurer que l'air de la pièce ne contamine pas la zone de travail. Dans la mesure du possible, exécuter l'opération à la hauteur des yeux.
- Ne rien toucher qui viendra en contact avec la culture; s'il y a contact, procéder à une nouvelle stérilisation avant de continuer. Éviter de transvaser les solutions stériles à partir de fioles ou de tubes. Utiliser des pipettes sérologiques ou Pasteur dans la mesure du possible. Si le transvasement est inévitable, s'assurer que les ouvertures des récipients sont passées à la flamme pendant environ 10 secondes avant le transfert.
- Éviter de parler, de chanter, de siffler, de tousser ou d'éternuer dans la direction des objets qui devraient être stériles. Les cheveux longs devraient être attachés par mesure de sécurité; ils peuvent être une source de contamination.
- Travailler rapidement afin de réduire au minimum le temps pendant lequel les récipients de culture sont ouverts.
- Dans la mesure du possible, ne pas toucher les extrémités des couvercles des boîtes de Petri. Tenir les couvercles par le dessus.
- Sceller toutes les boîtes de Petri à l'aide de deux feuilles de Parafilm ou de Duraseal. Examiner soigneusement les boîtes pour détecter toute fissure. (L'odeur du milieu de culture attire les acariens détriticoles, et ceux-ci peuvent ramper jusque dans les plaques stériles.)
- Tous les 2–3 jours, vérifier que les plaques ne sont pas contaminées.
- Pour de meilleurs résultats, transférer les cultures toutes les 2–3 semaines.

Solutions pour la désinfection des surfaces de travail

On peut utiliser les solutions suivantes pour maintenir les surfaces de travail dans des conditions stériles.

Solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (0,5 L)

1. L'agent de blanchiment de préparation commerciale est habituellement une solution d'hypochlorite de sodium à 5 % (eau de Javel). Préparer la dilution immédiatement avant emploi.
2. Utiliser une éprouvette graduée d'une capacité de 500 mL pour mesurer les 100 mL requis d'agent de blanchiment. Ajouter 400 mL d'*eau distillée* ou désionisée afin de diluer l'agent et d'obtenir 500 mL de solution.

Solution chlorée à partir d'une poudre

1. Ajouter 10 g d'hypochlorite de calcium granulaire à 1 L d'eau distillée.
2. Brasser vigoureusement et laisser le mélange reposer pendant 6 h ou toute la nuit. Porter des gants et un masque, car le chlore est corrosif. Si possible, préparer la solution sous une hotte.
3. Filtrer le surnageant dans un bidon en plastique propre et bien refermer. Si la solution est entreposée dans un contenant en verre, celui-ci devrait être conservé dans un endroit obscur.

Éthanol à 70 % (utilisé pour essuyer la hotte à flux laminaire et vaporiser les gants)

1. Utiliser une éprouvette graduée d'une capacité de 500 mL pour mesurer les 370 mL requis d'éthanol à 95 %.
2. Ajouter suffisamment d'eau distillée pour porter le volume de liquide à 500 mL.
3. Conserver la solution dans un contenant fermé hermétiquement.

Annexe E

Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques^a

Colonne (nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1) ^b						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

^a Modifié d'après Rocchini et coll. (1982).

^b Dans une colonne, on devrait choisir une série d'au moins sept concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées sous forme de pourcentage, de volume ou de masse (p. ex. mg/L ou µg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par n'importe quelle puissance de 10. On pourrait utiliser la première colonne si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. Il n'est pas recommandé d'utiliser des concentrations plus largement espacées. Pour les essais sur les effluents, on augmente rarement le gain de précision en choisissant les concentrations d'une colonne à droite de la colonne 3. Les valeurs plus rapprochées des colonnes 4 à 7 pourraient parfois être utiles pour les essais sur des produits chimiques dont le seuil d'effet est abrupt. Quant aux essais sur des échantillons d'effluent, d'élutriat ou de lixiviat, la concentration la plus élevée est normalement de 91 %, et il faudrait tenir compte de cette valeur dans les séries de dilution signalées.