

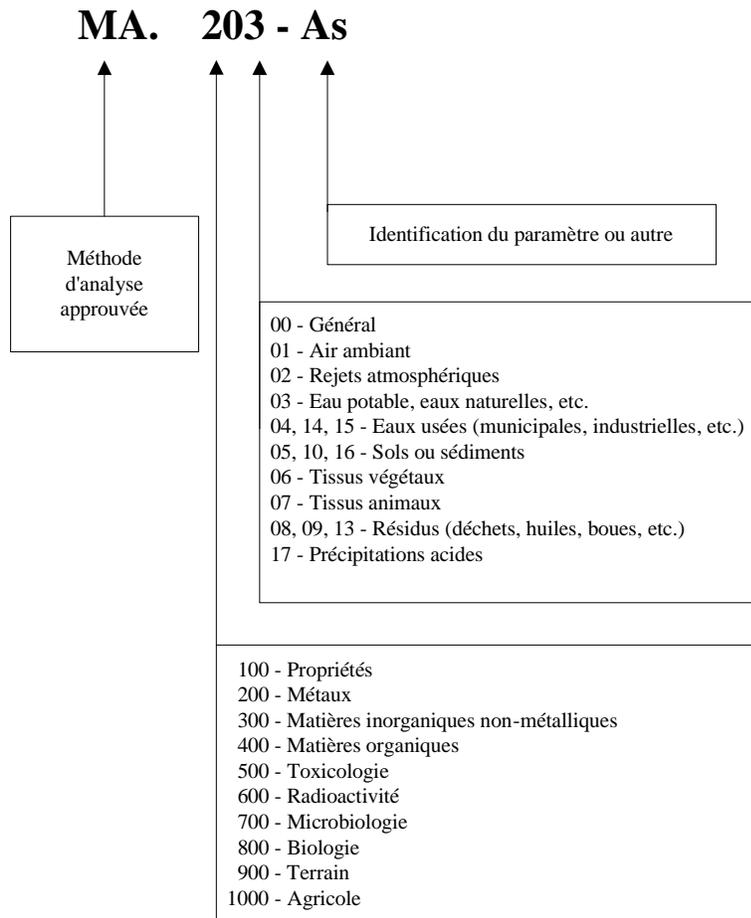
Méthode d'analyse



MA. 500 – P.sub 1.0

Détermination de la toxicité : inhibition de la croissance chez l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*

Comment fonctionne la codification?



Note – Les méthodes publiées avant le 14 janvier 2014 ont deux chiffres à la fin de la codification de la méthode (ex. : MA. 203 – As 3.4). Le premier chiffre désigne le numéro de la méthode (3) et le deuxième chiffre désigne le numéro de l'édition (4).

Ce document doit être cité de la façon suivante :

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

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

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

© Gouvernement du Québec, 2015

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	5
3.1. Interférences	6
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	6
4.1. Prélèvement	6
4.2. Conservation	6
5. APPAREILLAGE ET ÉQUIPEMENTS	6
6. RÉACTIFS ET MILIEU DE CULTURE	7
6.1. Réactifs	7
6.2. Milieu de culture	8
6.3. Solution isotonique	11
6.4. Toxique de référence	11
7. ORGANISMES BIOLOGIQUES	11
7.1. Espèces et souche	11
7.2. Méthode de culture	11
8. PROTOCOLE ANALYTIQUE	12
8.1. Préparation de l'échantillon	12
8.2. Milieu d'enrichissement	13
8.3. Eau de dilution	14
8.4. Préparation de l'inoculum	14
8.5. Conditions d'essai	15
8.6. Choix des dilutions	15
8.7. Réalisation de l'essai	15
8.8. Essai avec toxique de référence	17
8.9. Acceptabilité des résultats	18
9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	18
9.1. Détermination des CI_p	18
9.2. Détermination de pourcentage de stimulation (% S)	19
9.3. Expression des résultats	19

10.	VOCABULAIRE	19
11.	BIBLIOGRAPHIE	20

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures concentrées d'algues	8
Tableau 2 :	Concentrations finales des macroéléments et des microéléments dans le milieu de culture	9
Tableau 3 :	Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures gélosées	10
Tableau 4 :	Solutions concentrées d'éléments traces pour le maintien des cultures gélosées	10
Tableau 5 :	Concentrations finales des macroéléments et des micro-éléments dans les cuvettes à essai	13
Tableau 6 :	Résumé des conditions d'essai	15

INTRODUCTION

La méthode d'analyse utilisant l'algue unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement appelée *Selenastrum capricornutum*) est employée pour déterminer la toxicité d'échantillons liquides. Elle est basée sur l'inhibition de la croissance de la population algale. L'essai consiste à effectuer plusieurs dilutions de l'échantillon et à mesurer la densité cellulaire après quatre jours d'exposition dans des conditions contrôlées.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode sert à déterminer la toxicité dans des échantillons liquides tels que les eaux usées industrielles, les eaux municipales ou agricoles, les eaux de lixiviation, les lixiviats de résidus solides, les eaux réceptrices, les substances chimiques solubles dans l'eau ou toute autre solution susceptible de contenir des substances toxiques.

L'essai de toxicité avec *Pseudokirchneriella subcapitata* est utilisé au Québec, entre autres pour le suivi de la toxicité des effluents industriels.

Cet essai peut également être utilisé pour identifier les échantillons qui entraînent une stimulation de la croissance algale liée à la présence d'azote et de phosphore.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

L'essai consiste à déterminer la concentration de l'échantillon qui cause une réduction de 25 % de la croissance de la population algale, après une période d'exposition de 96 heures (CI₂₅ 96h) à une série de concentrations de l'échantillon, ayant des potentiels identiques de croissance (détermination de la relation concentration-réponse). La CI₅₀ est également calculée.

L'incubation est effectuée dans un système statique (sans renouvellement) et dans des conditions contrôlées (température et lumière).

L'effet d'inhibition est mesuré par la détermination de la densité cellulaire.

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

3. FIABILITÉ

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

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

3.1. INTERFÉRENCES

Des concentrations élevées de solides en suspension et une couleur intense peuvent interférer avec la pénétration de la lumière et réduire la croissance algale.

Les organismes planctivores présents dans l'échantillon peuvent réduire la survie et la croissance des algues.

La présence d'une concentration élevée en éléments nutritifs (phosphore et azote) peut masquer la toxicité et causer une stimulation de la croissance algale. À cet effet, la section 8.2 prévoit une modification au protocole pour les effluents enrichis en phosphore.

Un pH se situant hors des limites de tolérance de l'espèce peut affecter les organismes et rendre impossible le discernement des effets reliés aux substances toxiques présentes dans l'échantillon.

4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

4.1. PRÉLÈVEMENT

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

4.2. CONSERVATION

Aucun agent de conservation ne doit être ajouté et l'échantillon doit être conservé à l'obscurité à une température d'environ 4 °C pendant le transport et au laboratoire. L'échantillon doit être acheminé au laboratoire dans le plus court délai possible (< 24 heures). L'essai devrait commencer le plus rapidement possible après le prélèvement. Le délai maximal de conservation entre le prélèvement et l'analyse est de 3 jours.

5. **APPAREILLAGE ET ÉQUIPEMENTS**

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

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant et une procédure de lavage adéquate doit être de rigueur.

5.1. Incubateur, chambre environnementale ou toute autre installation en mesure de fournir la température et l'éclairage appropriés

5.2. Agitateur orbital pouvant fonctionner à 100 cycles par minute (100 cpm)

5.3. Système de purification d'eau (Milli-Q ou autre)

5.4. pH-mètre

- 5.5. Compteur électronique de particules permettant le décompte ou compte de cellule dans une classe de tailles entre 2 et 7 μm
- 5.6. Microscope avec objectifs 10 X, 45 X et 100 X et oculaire 10 X
- 5.7. Centrifugeuse
- 5.8. Équipement pour la filtration
- 5.9. Ballons volumétriques (10 - 1 000 ml)
- 5.10. Cylindres gradués (10 - 1 000 ml)
- 5.11. Pipettes volumétriques (1 - 100 ml)
- 5.12. Pipettes sérologiques graduées (1 - 10 ml)
- 5.13. Pipettes automatiques et embouts
- 5.14. Filtres 0,45 μm (Millipore type HA ou autres)
- 5.15. Flacons 20 ml, cuvette en polystyrène (compteur de particules électronique)
- 5.16. Tubes pour centrifugeuse
- 5.17. Tubes de verre 15 ml avec capuchon pour gélose inclinée

6. RÉACTIFS ET MILIEU DE CULTURE

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS, à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions de toxiques de référence est de l'eau ultrapure.

6.1. RÉACTIFS

- 6.1.1 Bicarbonate de sodium, NaHCO_3 (CAS n° 144-55-8)
- 6.1.2 Chlorure de magnésium hexahydraté, $\text{mgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 7791-18-6)
- 6.1.3 Chlorure de calcium dihydraté, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 10035-04-8)
- 6.1.4 Nitrate de sodium, NaNO_3 (CAS n° 7631-99-4)
- 6.1.5 Sulfate de magnésium heptahydraté, $\text{mgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 10034-99-8)
- 6.1.6 Phosphate de potassium (dibasique anhydre), K_2HPO_4 (CAS n° 7758-11-4)
- 6.1.7 Chlorure de sodium, NaCl (CAS n° 7647-14-5)

- 6.1.8. Chlorure ferrique hexahydraté, $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 10025-77-1)
- 6.1.9. Acide borique, H_3BO_3 (CAS n° 10043-35-3)
- 6.1.10. Chlorure de manganèse tétrahydraté, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 13446-34-9)
- 6.1.11. Hydroxide de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)
- 6.1.12. Acide chlorydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)
- 6.1.13. Dichlorure de zinc, ZnCl_2 (CAS n° 7646-85-7)
- 6.1.14. Dichlorure de cobalt hexahydraté, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 7791-13-1)
- 6.1.15. Molybdate de sodium dihydraté, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 10102-40-6)
- 6.1.16. Dichlorure de cuivre dihydraté, $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 10125-13-0)
- 6.1.17. Éthylènediamine tétraacétate, disodique dihydraté, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 6381-92-6)
- 6.1.18. Azoture de sodium, NaN_3 (CAS n° 2GG28-22-8)
- 6.1.19. Bacto Agar (CAS n° 9002-18-0)

6.2. MILIEU DE CULTURE

6.2.1. Milieu pour cultures liquides

- Préparer 7 solutions concentrées d'éléments nutritifs (tableau 1) à partir de produits chimiques de qualité laboratoire.

Tableau 1 : Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures concentrées d'algues

Solutions éléments nutritifs	Composés	Quantité dissoute dans 500 ml d'eau distillée
1	NaNO_3	12,75 g
2	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	6,08 g
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2,20 g
4	H_3BO_3 $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ZnCl_2 $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	92,80 mg 208,00 mg 1,64 mg ^a 79,90 mg 0,71 mg ^b 3,63 mg ^c 0,006 mg ^d 150,00 mg
5	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7,35 g
6	K_2HPO_4	0,52 g
7	NaHCO_3	7,50 g

- a : dissoudre 164 mg de ZnCl₂ dans 100 ml d'eau distillée. Ajouter 1 ml de cette solution à la solution n° 4.
- b : dissoudre 71,4 mg de CoCl₂·6 H₂O dans 100 ml d'eau distillée. Ajouter 1 ml de cette solution à la solution n° 4.
- c : dissoudre 36,3 mg de Na₂MoO₄·2 H₂O dans 10 ml d'eau distillée. Ajouter 1 ml de cette solution à la solution n° 4.
- d : dissoudre 60,0 mg de CuCl₂·2 H₂O dans 1 000 ml d'eau distillée. Prendre 1 ml de cette solution et diluer dans 10 ml. Ajouter 1 ml de cette seconde solution à la solution n° 4.

- Stériliser les solutions par filtration sur une membrane de 0,22 µm. Les solutions concentrées peuvent se conserver six mois à 4 °C et à l'obscurité.
- Ajouter 1 ml de chacune des solutions concentrées à approximativement 900 ml d'eau ultrapure en agitant légèrement entre chaque ajout.
- Compléter le volume à 1 l et ajuster si nécessaire le pH du milieu final à 7,0 ± 0,2 avec une solution NaOH ou HCl à 0,1 N. La concentration finale des macroéléments et des microéléments dans le milieu de culture est donnée au tableau 2.
- Autoclaver le milieu dans des contenants de verre pendant 15 minutes (121 °C, 1,06 - 1,20 kg/cm²). Le milieu de culture autoclavé peut se conserver six mois.

Tableau 2 : Concentrations finales des macroéléments et des microéléments dans le milieu de culture

Macroéléments	Concentration (mg/l)	Éléments	Concentration (mg/l)
NaNO ₃	25,5	N	4,20
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	12,2	Mg	2,90
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	4,41	Ca	1,20
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	14,7	S	1,91
K ₂ HPO ₄	1,04	P	0,186
NaHCO ₃	15,0	Na	11
		C	2,14
		K	0,469

Micro-éléments	Concentration (µg/l)	Éléments	Concentration (µg/l)
H ₃ BO ₃	185	B	32,5
MnCl ₂ ·4 H ₂ O	416	Mn	115
ZnCl ₂	3,27	Zn	1,57
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	1,43	Co	0,354
CuCl ₂ ·2 H ₂ O	0,012	Cu	0,004
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	7,26	Mo	2,88
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	160	Fe	33,1

6.2.2. Milieu pour cultures gélosées

Le milieu utilisé pour le repiquage sur gélose est présenté au tableau 3.

Tableau 3: Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures gélosées

Solutions éléments nutritifs	Composés	Quantité préparée dans l'eau distillée
1	KH_2PO_4	8,75 g/500 ml
2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,25 g/500 ml
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3,75 g/500 ml
4	NaNO_3	12,5 g/500 ml
5	K_2HPO_4	3,75 g/500 ml
6	NaCl	1,25 g/500 ml
7	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{KOH}$	10 et 6,2 g/l
8	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$	4,98 g/l 1 ml/l
9	Métaux traces	Voir tableau 4
10	H_3BO_3	5,75g/500 ml

- Ajuster le pH à 6,8 avec du NaOH ou du HCl.
- Ajouter 10 ml/l de milieu pour les solutions 1 à 6 ; 1 ml/l pour les solutions 7 à 9 et 0,7 ml/l pour la solution 10.

Tableau 4 : Solutions concentrées d'éléments traces pour le maintien des cultures gélosées

Produits	Composés	Quantité préparée dans l'eau distillée en g/l
1	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5,53
2	H_3BO_3	3,80
3	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,34
4	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,16
5	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,635
6	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,073
7	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,016

- Ajouter 15g/l d'agar au milieu de culture reconstitué et faire chauffer sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète. Mettre 8 ml de milieu avec agar dans des tubes de 15 ml en verre et autoclaver pendant 15 minutes à 121 °C et 1,06-1,20 kg/cm². À la sortie de l'autoclave, penché les tubes à essai de façon à obtenir des géloses inclinées. Les géloses sont conservées à 4 °C pour une période maximale de trois mois.

6.3. SOLUTION ISOTONIQUE

Préparer comme suit dans l'eau ultrapure :

- a) NaCl 9,5 g/l
- b) NaN₃ 0,95 g/l
- c) Filtration sur filtre 0,22 µm

Cette solution peut se conserver six mois à 4 °C et à l'obscurité.

6.4. TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

Différents produits peuvent être utilisés comme toxique de référence pour le test d'inhibition de la croissance avec algues tels que le sulfate de cuivre ou le phénol. Le produit utilisé par le laboratoire du CEAEQ est un mélange de chlorophénols et d'acides résiniques.

7. ORGANISMES BIOLOGIQUES

7.1. ESPÈCES ET SOUCHE

L'organisme utilisé est l'algue verte unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*, **obtenue et certifiée par CPCC (Canadian Phycological Culture Collection) ou par un organisme équivalent.**

Les algues doivent être en phase logarithmique de croissance âgées entre 3 et 7 jours.

7.2. MÉTHODE DE CULTURE

Une culture « mère » concentrée est initiée par le transfert à l'aide d'un fil à boucle et en condition aseptique (à la flamme) d'un inoculum d'une culture de départ (souche certifiée de CPCC ou autre, gélose ou liquide), dans un erlenmeyer de 500 ml (ou un contenant de verre équivalent) contenant de 80 à 100 ml du milieu de culture (cf. 6.2). Cette culture est incubée jusqu'à l'atteinte de la phase exponentielle de croissance. La culture de départ de CPCC peut être utilisée pendant une période maximale de 6 mois et elle doit être conservée à 4 °C à l'obscurité.

La culture mère est utilisée pour produire par repiquage des cultures filles qui serviront à la préparation des inoculums pour le départ des essais de toxicité.

La première culture fille en phase exponentielle est repiquée sur gélose dans le but de maintenir la pureté des cultures en initiant de nouveau des cultures mères liquides à partir d'une nouvelle gélose. L'analyse des BHAA (bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies; CEAEQ, MA.700 – BHA35 1.0) et une observation microscopique sont effectuées sur cette première culture fille pour s'assurer qu'elle n'est pas contaminée. La culture gélosée est préparée en prélevant à l'aide d'un fil à boucle et à la flamme de la culture liquide qui estensemencée sur la gélose. La gélose est incubée dans la même condition de culture que les cultures liquides jusqu'à la formation de colonies algales. La culture sur gélose est conservée au réfrigérateur à 4 °C et à l'obscurité pour une période maximale de quatre mois. Tous les deux mois au minimum, une nouvelle culture mère liquide est

initiée à partir de la culture sur gélose. Il est recommandé de partir une nouvelle culture liquide au moins deux semaines avant l'échéance de deux mois de la culture liquide active afin de s'assurer d'avoir en permanence une culture en phase exponentielle.

Les cultures filles sont repiquées une ou deux fois par semaine de façon à disposer selon le besoin de cultures en phase exponentielle pour les inoculums servant au départ d'essais de toxicité. La première culture fille origine d'un repiquage de 1 ml de la culture mère liquide en phase exponentielle dans un erlenmeyer de 500 ml contenant de 80 à 100 ml de milieu de culture frais et stérile. Les cultures filles suivantes sont produites par repiquage à partir de la culture fille active, également en phase exponentielle. Le repiquage successif des cultures filles est actif pour une période maximale de deux mois après le premier repiquage de la culture mère. Après cette période, une nouvelle culture fille doit être initiée à partir d'une nouvelle culture mère. Après quatre semaines de repiquage, la culture fille en usage est vérifiée par observation microscopique et analyse des BHAA pour s'assurer qu'elle n'est pas contaminée.

Les cultures liquides sont conservées à $24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ sous un éclairage continu d'une intensité entre $4\ 300\text{ lux} \pm 10\%$ ($58\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1} \pm 10\%$), provenant **de fluorescents de type « Cool White »**. **Une agitation automatique en continue ou manuelle deux fois par jour assure une croissance adéquate des algues.**

La performance de la culture d'algues est évaluée tous les trois mois en déterminant la courbe de croissance sur une période de 8 à 10 jours. Un volume de culture d'algues de 1 ml en phase exponentielle de croissance est inoculé dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu de culture. La culture est incubée selon les conditions déjà citées plus haut. La phase exponentielle devrait normalement se situer entre 3 et 7 jours et le plateau devrait être atteint entre 8 et 10 jours.

8. PROTOCOLE ANALYTIQUE

8.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Avant le début de l'essai, l'échantillon doit être filtré sur une membrane de $0,45\ \mu\text{m}$. Une préfiltration sur un filtre de porosité supérieure peut s'avérer nécessaire si l'échantillon est très chargé de matières en suspension. La filtration est nécessaire afin d'éliminer tous les organismes planctivores et les interférences lors de l'utilisation de la technique de comptage au compteur de particules. Un ajout d'éléments nutritifs doit être effectué dans l'échantillon non dilué afin d'éviter toute inhibition de croissance qui serait liée à une carence d'azote ou de phosphore. Cet ajout se fait en introduisant 10 ml de milieu d'enrichissement (*cf.* 8.2) par litre d'échantillon.

La température de l'échantillon doit être ajustée à $24\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Avant le début de l'essai, la température, le pH, la conductivité et l'oxygène dissous sont mesurés et notés.

Aucun ajustement de pH n'est effectué sur l'échantillon. Par contre, si le pH est inférieur à 6,5 ou supérieur à 8,5, un test supplémentaire peut être effectué avec l'échantillon à pH ajusté si on désire discriminer, dans la mesure du possible, les effets du pH de ceux des contaminants toxiques. Aucune autre modification de l'échantillon n'est effectuée.

8.2. MILIEU D'ENRICHISSEMENT

Afin d'éliminer toute possibilité d'inhibition de croissance causée par une carence en éléments nutritifs, l'eau de dilution est préparée à partir de solutions concentrées d'éléments nutritifs sans EDTA. Ce milieu d'enrichissement est également utilisé pour l'échantillon et pour introduire l'inoculum d'algues dans chacune des cuvettes. Les concentrations finales en éléments nutritifs ajoutées dans l'échantillon et dans l'eau de dilution représentent 62,5 % de celles du milieu de culture original.

Cette solution peut être préparée comme suit :

- Ajouter 6,25 ml de chacune des solutions mères du tableau 1 (sauf EDTA) à environ 40 ml d'eau ultrapure. Agiter entre chaque ajout puis jauger à 100 ml. Ajouter 10 ml de cette solution par litre d'échantillon. Cette solution est fraîchement préparée à chaque jour où des tests sont effectués.

Les concentrations finales ajoutées dans l'échantillon sont présentées au tableau 5.

À noter que pour les effluents industriels ayant un traitement biologique, les effluents municipaux ou tout autre échantillon soupçonné de contenir de fortes concentrations en phosphore pouvant masquer la toxicité par un effet de stimulation de la croissance des algues, un ajout de phosphore doit être fait de façon à éviter les fausses réponses négatives. Un ajout de 10,0 mg/l de P remplace l'usage de la solution 6 (*cf.* tableau 1). Cet ajout est effectué comme suit :

Préparer une solution concentrée de 5,623 g/l de K_2HPO_4 dans l'eau ultrapure. Cette solution contient 1 000 mg/l de P. Pour un ajout de 10 mg/l de P, ajouter 100 μ l de cette solution dans chacune des cuvettes contenant au final 10 ml, incluant l'échantillon non dilué et les groupes témoins.

Tableau 5 : Concentrations finales des macroéléments et des micro-éléments dans les cuvettes à essai

Macroéléments	Concentration (mg/l)	Éléments	Concentration (mg/l)
$NaNO_3$	15,9	N	2,63
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	7,60	Mg	1,81
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	2,76	Ca	0,75
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	9,19	S	1,19
K_2HPO_4	0,65	P	0,12
$NaHCO_3$	9,38	Na	6,88
		K	0,29
		C	1,34

Micro-éléments	Concentration (μ g/l)	Éléments	Concentration (μ g/l)
H_3BO_3	116	B	20,3
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	260	Mn	71,9
$ZnCl_2$	2,04	Zn	0,98
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,89	Co	0,22
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	0,008	Cu	0,0025
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	4,54	Mo	1,80
$FeCl_3 \cdot 6 H_2O$	100	Fe	20,7

8.3. EAU DE DILUTION

- L'eau de dilution est également enrichie par l'ajout de 10 ml du milieu d'enrichissement par litre d'eau ultrapure. La concentration finale en macroéléments et micro-éléments est présentée au tableau 5.
- Agiter adéquatement.

8.4. PRÉPARATION DE L'INOCULUM

L'inoculum est préparé au maximum 2 à 3 heures avant le début du test à partir d'une population d'algues âgées entre 3 à 7 jours (en phase logarithmique de croissance). **La culture doit avoir une belle apparence verdâtre et ne pas être jaunie.**

Chaque millilitre d'inoculum doit contenir suffisamment de cellules pour fournir une densité cellulaire initiale de 10 000 cellules/ml ($\pm 10\%$) dans les cuvettes d'essai.

- Faire un compte cellulaire au compteur de particules de la culture d'algues pour déterminer sa densité (cf. 8.7.6).
- Centrifuger entre 15 et 40 ml (selon la densité initiale) de la culture à 1 000 g pendant 12 minutes.
- Décantier le surnageant et resuspendre les cellules dans le même volume de milieu de dilution (sans EDTA) qu'à l'étape précédente.
- Répéter les étapes de centrifugation et de décantation et resuspendre les cellules toujours dans le même volume d'eau de dilution (sans EDTA).
- Diluer le concentré afin d'obtenir une densité cellulaire de 400 000 cellules/ml et vérifier la densité par un compte cellulaire au compteur de particules.
- Calculer le volume (ml) de concentré cellulaire requis de la façon suivante :

$$\text{Volume de concentré requis (ml)} = \frac{\text{Nombre de cuvettes qui seront utilisées} \times \text{Volume de solution par cuvette} \times 10\,000 \text{ cell./ml}}{\text{Densité cellulaire (cell./ml) du concentré}}$$

Pour un test réalisé avec des triplicata et utilisant un groupe contrôle et 9 concentrations de l'échantillon, le volume d'inoculum requis est de 7,50 ml, soit 0,25 ml d'inoculum par cuvette. Pour un test à cinq concentrations, le volume requis est de 4,5 ml, soit 0,25 ml par cuvette.

8.5. CONDITIONS D'ESSAI

Tableau 6 : Résumé des conditions d'essai

1. Type de test :	Statique
2. Température :	24 °C ± 2 °C
3. Type d'éclairage :	Fluorescent de type « Cool White »
4. Intensité lumineuse :	4 300 lux ± 10 % (58 µmol m ⁻² s ⁻¹ ± 10 %)
5. Photopériode :	Continue
6. Dimension des cuvettes :	30 ml
7. Volume de solution :	10 ml
8. Densité cellulaire initiale :	10 000 cellules/ml
9. Nombre de réplicats par concentration et pour le contrôle :	3
10. Âge des algues de l'inoculum :	3 à 7 jours
11. Agitation :	Agitation automatique continue ou manuelle 2 fois par jour
12. Eau de dilution :	Milieu de culture modifié sans EDTA
13. Nombre de concentrations :	5 à 10 plus le contrôle
14. Facteur de dilution :	Entre 0,5 et 0,8
15. Durée du test :	96 heures
16. Effet mesuré :	Croissance (compte cellulaire)
17. Expression des résultats :	CI ₂₅ 96h et CI ₅₀ 96h
18. Acceptabilité du test :	Densité cell. des contrôles = ± 2S de la moyenne historique; variabilité des contrôles égale ou inférieure à 20 %; toxique de référence à l'intérieur de ± 2S
19. Volume d'échantillon :	500 ml

8.6. CHOIX DES DILUTIONS

La gamme de dilutions doit permettre la détermination de la CI₂₅ 96h et de la CI₅₀ 96h. Une série de 8 à 10 concentrations est recommandée. Différents facteurs de dilutions peuvent être adéquats, mais le facteur de 0,5 fréquemment appliqué entraîne souvent une gamme de dilutions trop étendue pour obtenir une bonne progression dans les réponses d'inhibition. Une gamme de dilutions plus serrée est recommandée pour obtenir une bonne détermination des paramètres de mesure.

8.7. RÉALISATION DE L'ESSAI

8.7.1. Préparation des dilutions

- Préparer le milieu d'enrichissement et l'eau de dilution tel que décrit aux sections 8.2 et 8.3.

- Agiter l'échantillon préparé comme décrit à la section 8.1 (avec ajout du milieu d'enrichissement) et effectuer les dilutions, selon le facteur choisi, en procédant de la plus faible concentration à la plus forte. Agiter de nouveau.
- Identifier les cuvettes de façon à assurer la traçabilité des résultats. **Des cuvettes à fond rond sont souhaitables pour obtenir un meilleur mouvement d'agitation si un agitateur automatique est utilisé.**
- Transférer 9,75 ml de chaque dilution dans chacune des trois cuvettes de 30 ml (triplicata pour chaque concentration). Les cuvettes de polystyrène utilisées pour le dénombrement des algues au compteur de particules sont les récipients d'essai utilisés. Ceci présente l'avantage d'éliminer le lavage de la verrerie, de réduire le nombre de manipulations ainsi que l'espace requis pour l'incubation. Pour trois concentrations (une faible, une moyenne et une élevée) et le contrôle, préparer une cuvette supplémentaire contenant du milieu d'essai et l'inoculum pour le suivi des conditions physico-chimiques.

8.7.2. Préparation des contrôles

- Un groupe contrôle est préparé en triplicata en transférant 9,75 ml d'eau de dilution dans trois cuvettes de 20 ml.
- Les récipients d'essai sont recouverts pour limiter l'évaporation sans toutefois être scellés complètement.

8.7.3. Départ de l'essai

- Avant d'inoculer les cuvettes s'assurer que leur contenu est à la même température que l'inoculum.
- Ajouter 0,25 ml d'inoculum contenant 400 000 cell./ml dans chaque cuvette et couvrir les cuvettes. Le volume final est de 10 ml.
- Les cuvettes sont disposées sur un plateau pour l'incubation. Il est primordial de s'assurer de l'homogénéité de la luminosité et de la température dans l'unité d'incubation. Il est souhaitable de disposer les cuvettes de façon aléatoire. Toutefois, s'il est démontré qu'il n'y a pas de différence de compte cellulaire entre les cuvettes en fonction de leur positionnement sur le plateau, il n'est pas obligatoire d'utiliser une configuration aléatoire.
- Les cuvettes sont agitées en continue à l'aide d'un agitateur **automatique** ou **manuellement et de façon vigoureuse deux fois par jour.**
- Incuber les cuvettes d'essai dans une chambre environnementale selon les conditions précisées dans le tableau 6.

8.7.4. Observations au début et à la fin de l'essai

Les mesures suivantes doivent être effectuées :

- Le pH est mesuré au début et à la fin de l'essai pour le groupe contrôle et dans une concentration faible, une concentration moyenne et une concentration élevée.
- La température de l'unité d'incubation est mesurée au début et à la fin de l'essai.
- La luminosité dans l'enceinte d'incubation est mesurée au début de l'essai.

8.7.5. Fin de l'essai

L'essai est terminé 96 heures après l'inoculation. La densité algale dans chacune des cuvettes est mesurée par un compte cellulaire.

8.7.6. Compte cellulaire

Le compte cellulaire est effectué à l'aide d'un compteur de particules. Une « cellule » de 70 µm est recommandée.

- Préparer la solution d'isoton tel que décrit à la section 6.3.
- Ajouter 19 ml de solution d'isoton dans des cuvettes de comptage. Utiliser autant de cuvettes qu'il y a de comptes à faire.
- Bien homogénéiser le contenu des cuvettes tests en brassant vigoureusement, retirer 1 ml de son contenu et le mettre dans une seconde cuvette correspondante contenant de la solution d'isoton.
- Effectuer les comptes cellulaires en commençant par ordre décroissant de concentrations et en finissant par les groupes témoins.
- Utiliser une fenêtre de lecture de 2 à 7 µm pour le compte cellulaire (si le compteur utilisé permet cette sélection de classe de taille).
- Rincer la cellule du compteur avec de l'isoton propre entre chaque essai.

8.8. ESSAI AVEC TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

Des essais avec toxique de référence doivent être effectués deux fois par mois ou une fois par 10 analyses si le laboratoire effectue plus de 10 analyses par deux semaines. Si le laboratoire effectue moins d'une analyse par deux semaines, un essai avec toxique de référence par série d'essais est recommandé. Les résultats issus de ces essais sont compilés sous forme de diagramme de contrôle.

Des limites de contrôle inférieures (- 2S et - 3S) et supérieures (+ 2S et + 3S) sont déterminées et les résultats situés à l'extérieur de ces limites indiquent des problèmes potentiels dans le système

d'essai. Au maximum, un essai sur 20 devrait se situer à l'extérieur des limites de $\pm 2S$ (seuil de probabilité de 95 %).

8.9. ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats d'essai sont acceptables si la densité cellulaire algale dans les cuvettes des contrôles à la fin de l'essai se situe entre les limites de $\pm 2S$ de la moyenne historique des densités cellulaires des contrôles¹. La densité cellulaire moyenne des contrôles devrait être d'au moins $1,0 \times 10^6$ cell./ml. Le coefficient de variation des comptes cellulaires historiques ne devrait pas excéder 25 %.

La variation entre les réplicats des groupes contrôles est égale ou inférieure à 20 %.

Les résultats de l'essai avec toxique de référence effectué selon la fréquence requise se situent à l'intérieur des limites de $\pm 2S$; les résultats se situant à l'extérieur des limites de $\pm 3S$ entraînent le rejet du résultat d'essai; si le résultat se situe entre les limites de $+ 2S$ et $+ 3S$ ou $- 2S$ et $- 3S$, le résultat d'essai peut être acceptable selon le cas s'il est démontré qu'il ne s'agit pas d'une tendance hors contrôle.

Il faut également prendre en considération la qualité de la relation concentrations-réponses. Les résultats devraient être considérés avec réserve dans les cas où la progression des réponses d'inhibition est erratique ou présente une courbe en U. Une note explicative devrait accompagner le résultat dans ce genre de situation. La reprise de l'essai peut constituer la meilleure alternative lorsque possible. Toutefois, certains types de contaminants peuvent entraîner une relation concentrations-réponses où à très faible concentration l'échantillon provoque une stimulation (hormesis), laquelle est suivie d'une inhibition lorsque la concentration augmente.

Les autres conditions du test (température, luminosité, etc.) ont été respectées.

9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. DÉTERMINATION DES CI_p

Les CI_p (CI_{25} 96h et CI_{50} 96h) et leurs intervalles de confiance à 95 % peuvent être déterminés à l'aide de différentes méthodes. La méthode recommandée est la régression (linéaire ou non linéaire). Certains progiciels de statistiques tels CETIS et SYSTAT sont polyvalents et peuvent être utilisés pour effectuer le calcul des CI_p .

Différents modèles de régression s'offrent à l'analyste. Le choix d'un modèle doit débiter par l'examen visuel du graphique de la relation de la réponse biologique en fonction du logarithme de la concentration. Les principaux modèles pouvant être adéquats comprennent le modèle linéaire et quatre modèles non linéaires (exponentiel, de Gompertz, logistique et hormético-logistique). Pour plus de détails, il est recommandé de consulter le *Document d'orientation sur les méthodes*

¹ Les limites de $\pm 2S$ et $\pm 3S$ sont établies à partir de la moyenne « historique » des densités cellulaires des groupes contrôles sur une période suffisamment prolongée pour que la valeur soit représentative des différentes conditions d'application de la méthode, à l'intérieur d'un même laboratoire.

statistiques applicable aux essais d'écotoxicité produit par Environnement Canada (Env. Can., 2005).

L'interpolation linéaire avec calcul des intervalles de confiance peut également être utilisée. Cette méthode non paramétrique ne nécessite pas d'ajuster les données à un modèle déterminé. Elle présente l'avantage de s'accommoder d'une grande variété de données et permet le calcul de n'importe quelle CI_p entre 1 et 99.

Les CI_p déterminées par extrapolation ne sont pas acceptables et doivent plutôt être rapportées comme suit, ex. : CI_{25} inférieure à la plus faible concentration testée.

L'utilisation des CSEO et CMEO n'est pas recommandée compte tenu des inconvénients liés à cette approche : aucun intervalle de confiance ne peut être calculé, la CSEO et la CMEO sont obligatoirement des concentrations testées et le calcul de ces paramètres est très dépendant du schéma expérimental (nombre de concentrations, nombre de réplicats, etc.).

9.2. DÉTERMINATION DE POURCENTAGE DE STIMULATION (% S)

Lorsque la densité algale dans l'échantillon est supérieure à la densité dans les contrôles, le pourcentage de stimulation S (%) est calculé comme suit :

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

où

S : compte cellulaire de l'échantillon;
C : compte cellulaire du contrôle.

9.3. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats de la CI_{25} 96 h et de la CI_{50} 96h sont exprimés comme suit avec leur intervalle de confiance à 95 %.

- en pourcentage (% V/V);
- pour les produits purs le résultat est exprimé en P/V;
- les résultats peuvent également être exprimés en unité toxique chronique (UT_c) pour les effluents, soit $100/CI_{25}$.

10. VOCABULAIRE

CI_{25} : concentration qui inhibe 25 % d'une réponse biologique de type quantitative (croissance, bioluminescence, etc.).

CI_{50} : concentration qui inhibe 50 % d'une réponse biologique de type quantitative (croissance, bioluminescence, etc.).

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

Eau de dilution : eau utilisée pour le contrôle ou pour diluer la substance à tester.

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

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

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

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

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

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

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

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

11. BIBLIOGRAPHIE

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie*, DR-12-SCA-03, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Édition courante. [http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA03_lignes_dir_toxico.pdf]

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Recherche et dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives; méthode par incorporation à la gélose*. MA. 700 – BHA35 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, édition courante.

ENVIRONNEMENT CANADA. *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.

NORBERG-KING, T.J. *A Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity, the Inhibition Concentration (ICp) Approach* (version 2.0), National Effluent Toxicity Assessment Center, Technical Report 03-93, USEPA, 1993.

STEIN, J. (Ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, 448 p., 1973.

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 th edition, Washington, DC, 2002.