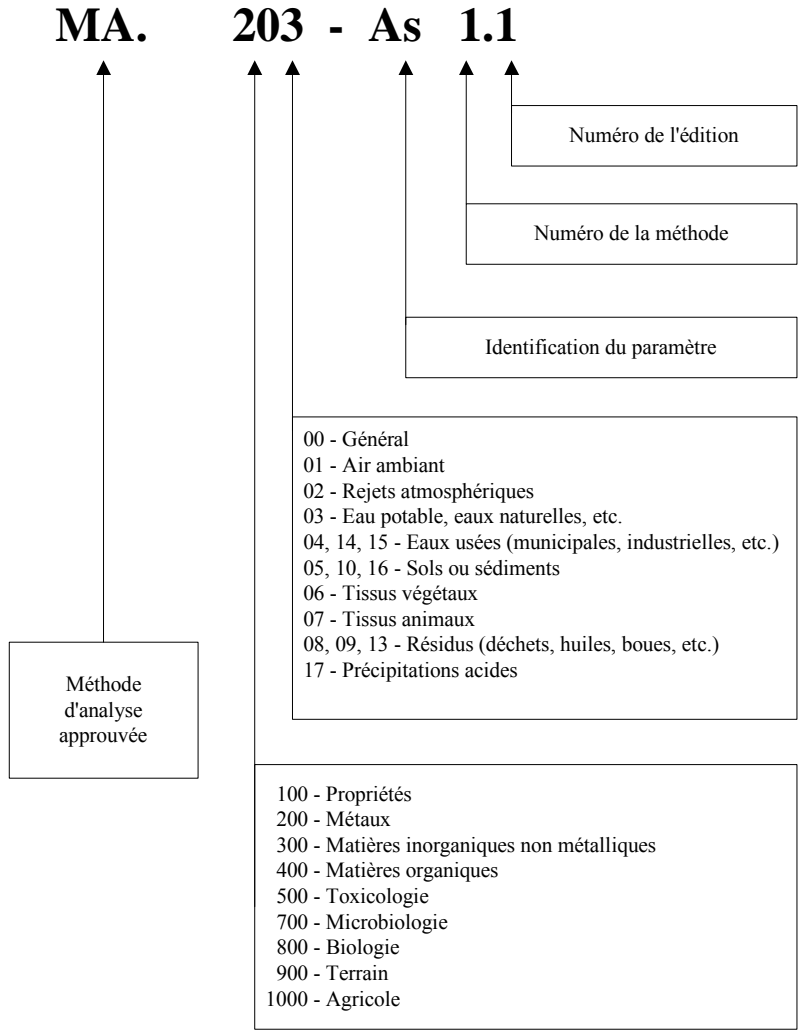


MA. 500 – GCR 1.0
Édition : 2003-04-08

Méthode d'analyse
Inhibition de la germination et de la croissance
chez les semences de végétaux

Exemple de numérotation :



ÉDITION APPROUVÉE LE : 8 avril 2003

Historique de la méthode

Cette méthode a été élaborée pour déterminer la phytotoxicité des sols contaminés, des résidus solides et des matières résiduelles fertilisantes. Des mesures biologiques de succès de la germination ainsi que de la croissance des tiges et des racines sont utilisées afin d'optimiser la sensibilité du test.

Reproduction et traduction, même partielles, interdites sans l'autorisation du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, ministère de l'Environnement du Québec.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Inhibition de la germination et de la croissance chez les semences de végétaux. MA. 500 –
GCR 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, 2003, 30 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
1. DOMAINE D'APPLICATION	7
2. PRINCIPE ET THÉORIE	8
3. FIABILITÉ	8
3.1. Interférence	8
3.2. Fidélité	9
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	10
4.1. Prélèvement	10
4.2. Conservation	10
5. APPAREILLAGE ET FOURNITURES	11
6. RÉACTIFS ET ÉTALONS	12
6.1. Toxique de référence	12
6.2. Sol artificiel	12
7. ORGANISME BIOLOGIQUE	13
7.1. Espèce et souche	13
8. PROTOCOLE D'ANALYSE	14
8.1. Préparation des échantillons	14
8.2. Conditions du test	16
8.3. Schéma expérimental	17
8.4. Départ du test	17
8.5. Mesures à la fin du test	18
8.6. Essai avec toxique de référence	19
8.7. Acceptabilité des résultats	19
9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	20
9.1. Statistique pour les tests à concentration unique	21
9.2. Détermination des CE ₅₀ , CE ₂₅ , CI ₅₀ et CI ₂₅	21
9.3. Expression des résultats	21
10. VOCABULAIRE	21
11. BIBLIOGRAPHIE	22
ANNEXE 1 : Feuille de travail	25

INTRODUCTION

Les végétaux terrestres agissent comme producteurs primaires en fixant le carbone atmosphérique sous forme de molécules biologiques (hydrates de carbone), lesquelles contribuent à la constitution des tissus végétaux. Le processus de photosynthèse qui est responsable de cette fixation du carbone utilise l'énergie solaire, l'eau et le CO₂ atmosphérique. Les plantes terrestres sont donc une composante fondamentale des écosystèmes en étant à la base de la chaîne trophique. Lorsque l'intégrité naturelle du sol est affectée par une contamination, il peut en résulter une inhibition plus ou moins marquée de la productivité végétale ainsi qu'une bioaccumulation des contaminants et potentiellement un transfert vers les niveaux supérieurs de la chaîne trophique. Le stockage de contaminants dans les tissus végétaux peut présenter un risque potentiel pour la faune et la santé humaine.

Le niveau de phytotoxicité des contaminants est intimement lié à leur biodisponibilité, laquelle est modulée par un ensemble de facteurs physiques, chimiques et biologiques. La mesure de la phytotoxicité d'un sol confirme la biodisponibilité des contaminants et contribue ainsi à une meilleure caractérisation du sol étudié.

Ce protocole est inspiré des méthodes de Greene *et al.* (1989) et de ASTM (1994) et vise la détermination de l'inhibition de la germination et de la croissance des semences de végétaux. La méthode de Greene *et al.* (USEPA) consiste essentiellement à mesurer l'inhibition de la germination sur une période de cinq jours. Cette méthode présente l'avantage d'être simple; par contre, elle est limitée par une mesure biologique unique qui n'optimise pas la sensibilité du test. Quant à la méthode ASTM, elle préconise la mesure d'un ensemble de paramètres biologiques (germination, longueur des tiges et des racines, poids humide et poids sec des tiges et des racines) après une exposition de sept jours. La méthode ASTM est cependant mal définie en offrant plusieurs options qui laissent une trop grande place à l'interprétation et à l'adaptation par l'utilisateur.

La méthode présentée ici se veut détaillée et précise de façon à bien encadrer la production des résultats analytiques. Elle a été optimisée et adaptée sur la base d'une expérience acquise lors de plusieurs projets antérieurs. Elle vise principalement à augmenter la sensibilité générale des essais sur végétaux et à obtenir un maximum de renseignements pertinents sur la toxicité de l'échantillon.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détermination de la phytotoxicité d'échantillons solides tels que les sols contaminés et les résidus solides. Elle peut également être appliquée à des échantillons liquides tels que les eaux de lixiviation, les lixiviats de résidus solides, les eaux usées industrielles, agricoles ou municipales, les substances chimiques solubles dans l'eau ou à toute autre solution susceptible de contenir des substances toxiques.

Elle a été mise au point et validée avec les semences d'orge (*Hordeum vulgare*) et son application est actuellement limitée à cette espèce. Toutefois, elle est potentiellement applicable à d'autres espèces végétales; une validation préliminaire serait par contre requise.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Ce test consiste à déterminer l'effet inhibiteur d'échantillons solides ou liquides contaminés sur le potentiel de germination et de croissance de l'orge. Les mesures de croissance sont la longueur des racines, la longueur de la tige, le poids humide des tiges et le poids sec des tiges. L'effet inhibiteur des contaminants est établi en comparant les groupes tests à des groupes de contrôle.

Les réponses mesurées intègrent les effets additifs de toutes les composantes chimiques, physiques et biologiques de l'échantillon pouvant affecter les organismes végétaux.

Pour les échantillons liquides ou les produits purs (liquides ou solides), un sol artificiel de composition standardisée est utilisé. Selon la nature de l'étude, le test peut être réalisé avec une seule concentration de l'échantillon (test à concentration unique) ou avec une série de dilutions (test concentrations-réponses) permettant de déterminer différents paramètres de mesure tels les CE_{25} et CE_{50} pour la germination et les CI_{25} et CI_{50} pour la croissance en longueur, en poids humide et en poids sec. D'autres paramètres de mesure permettant de déterminer l'inhibition au début de la zone d'effet (seuil d'effet) peuvent également être utilisés.

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCE

La réalisation d'un test de toxicité nécessite des conditions environnementales optimales au cours de la période d'exposition, lesquelles sont adaptées spécifiquement à l'organisme biologique utilisé. Il est fréquent que les échantillons solides présentent des écarts significatifs par rapport à ces conditions optimales et que des ajustements soient nécessaires afin d'éviter de fausses réponses positives. Les modifications apportées à l'échantillon peuvent interférer avec l'équilibre physico-chimique des contaminants et de la matrice et entraîner un masquage ou une augmentation de la réponse toxique. Le compromis obligatoire que l'on doit faire pour rendre la matrice propice à la survie et à la croissance des organismes pendant le test, de façon à ne mesurer que l'effet des contaminants, entraîne souvent une difficulté à tester les échantillons de façon parfaitement représentative. L'usage de groupes de contrôle et de sol de référence permet de déterminer en partie l'incidence de ces modifications.

Dans certains cas, les propriétés physiques du sol peuvent interférer directement avec la réalisation du test. Les sols argileux contenant un excès de fines particules entraînent une compaction et une augmentation de la densité du sol, laquelle peut être inappropriée au test. L'excès ou le manque d'humidité, les pH extrêmes ou l'hétérogénéité granulométrique peuvent également créer de l'interférence et nécessiter un prétraitement de l'échantillon qui en modifie l'intégrité initiale. Par exemple, la réduction de la compaction par l'ajout de sable de silice contribue à augmenter la porosité, laquelle peut modifier la volatilisation de certains contaminants ainsi que leur biodisponibilité. Ainsi, la silice accroît la perméabilité du sol et l'écoulement de l'eau, ce qui peut faciliter la solubilisation des contaminants (pour plus de détails sur ces aspects, voir Zagury *et al.* 2002).

L'interprétation des résultats devra donc prendre en considération les interférences liées à la matrice et à la perte de représentativité ou les deux, cette dernière elle-même liée aux modifications apportées à l'échantillon.

3.2. FIDÉLITÉ

La fidélité de la méthode analytique est déterminée en effectuant régulièrement des essais avec un toxique de référence. Dans le cas présent, sept essais ont été effectués avec le chlorure de cadmium.

3.2.1. Seuil d'effet de la méthode

Le seuil d'effet varie en fonction de l'organisme utilisé, de la réponse biologique mesurée de même que du schéma expérimental (nombre d'organismes par replica, nombre de replica, etc.) et niveau de signification choisis.

Pour les semences d'orge, le seuil d'effet, tel que défini pour $\alpha = 0,05$, peut être déterminé en fonction des différentes mesures biologiques disponibles. Selon les résultats obtenus lors des sept essais avec le chlorure de cadmium, les seuils d'effet exprimés en pourcentage d'inhibition ont été de 11,5 % pour la longueur des tiges, de 28,4 % pour la longueur des racines, de 14,4 % pour le poids humide et de 21,6 % pour le poids sec.

3.2.2. Répétabilité

Les sept essais avec le toxique de référence ont permis d'évaluer la répétabilité des mesures de croissance (tableau 1).

La moyenne des CI_{50} du chlorure de cadmium se situait entre 155 et 189 mg/kg Cd (tableau 1) selon le type de mesure biologique. La longueur des racines s'est avérée la mesure la plus sensible alors que le poids sec du feuillage s'est avéré la mesure la moins sensible.

La répétabilité a été calculée comme suit :

$$I. C. 95 \% = x \pm \left[t(0,95; N-1) \frac{s}{\sqrt{N}} \right]$$

où

- N : nombre de mesures;
- x : moyenne arithmétique d'une série de mesures;
- s : écart type d'une série de mesures;
- t(0,975; N-1) : variable de la distribution de Student au niveau de confiance de 95 % pour N-1 degrés de liberté.

Tableau 1 - Répétabilité des CI₅₀ obtenues avec 7 essais de chlorure de cadmium

	Longueur du feuillage	Longueur des racines	Poids humide du feuillage	Poids sec du feuillage
Moyenne (mg/kg)	178	155	179	189
Écart type (mg/kg)	26,0	25,7	23,3	22,6
Coefficient de variation (%)	14,6	16,6	13,0	12,0
Répétabilité	178 ± 24,1	155 ± 24,1	179 ± 21,3	189 ± 21,3

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

4.1. PRÉLÈVEMENT

Le prélèvement et la préparation des échantillons de sol posent des exigences particulières. L'échantillon doit d'abord être représentatif du site étudié. L'hétérogénéité de la matrice en termes de granulométrie et de structure verticale ainsi que les proportions variables des principaux constituants minéraux et organiques font en sorte que le niveau de représentativité des échantillons solides est plus difficile à concevoir que pour la plupart des matrices liquides. Les échantillons doivent être prélevés en préservant le plus possible la structure du sol, de façon à minimiser les modifications physico-chimiques. À cet égard, les guides d'échantillonnage présentant les techniques de prélèvement appropriées doivent être suivis.

Des précautions particulières doivent également être prises lors du prélèvement de sols situés dans une couche profonde où l'exposition à l'air a été très faible ou inexistante. Ces échantillons, de même que ceux contenant potentiellement des composés volatils, devraient être rapidement mis en pot, remplis à ras bord et compactés de façon à limiter le plus possible l'oxydation et la volatilisation des contaminants.

4.2. CONSERVATION

Les échantillons doivent être entreposés à l'obscurité à 4 °C. Aucun agent de préservation ne doit être ajouté et les échantillons ne doivent pas être congelés.

Il est recommandé de procéder aux tests de toxicité le plus rapidement possible après l'échantillonnage. Pour les échantillons liquides, tels les lixiviats de sites contaminés ou les eaux usées en général, le délai de conservation est de cinq jours. Pour les lixiviats préparés au laboratoire, le délai maximal est de cinq jours après la lixiviation.

Dans le cas des échantillons solides, la durée de conservation peut être variable selon la nature et l'âge de la contamination. Les sols présentant des contaminations récentes susceptibles de contenir des substances dégradables ou volatiles doivent être traités dans un délai de sept jours. Aussi, les sols ou déchets faisant l'objet de contamination ancienne susceptible d'être relativement stable peuvent tolérer une durée de conservation à 4 °C allant jusqu'à six mois avant traitement.

5. APPAREILLAGE ET FOURNITURES

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

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant organique, inorganique ou biologique. Une procédure de lavage adéquate doit être appliquée avant l'utilisation du matériel.

- 5.1. Incubateur, chambre environnementale ou toute autre installation en mesure de fournir une température de 24 ± 2 °C, un éclairage de 4 300 lux \pm 10 % et une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité
- 5.2. pH-mètre
- 5.3. Conductivimètre
- 5.4. Thermomètre minimum/maximum
- 5.5. Luxmètre
- 5.6. Système de purification d'eau de type Milli-Q
- 5.7. Balance de précision à 0,0001 g
- 5.8. Balance pour poids élevés (1 – 10 kg)
- 5.9. Étuve
- 5.10. Cylindres gradués
- 5.11. Vials de polystyrène de 25 ml
- 5.12. Nacelles d'aluminium pour les pesées
- 5.13. Éprouvettes de plastique
- 5.14. Scalpel, ciseau et pince
- 5.15. Règle à mesurer
- 5.16. Sacs de plastique en polyéthylène (Ziploc[®] 6 × 9 et 9 × 12; 2 MIL)
- 5.17. Bechers 100 ml pour la mesure du pH
- 5.18. Grand contenant de plastique (type Rubbermaid[®]) pour mélanger le sol
- 5.19. Contenants de verre 1 litre avec système de fermeture hermétique (pour les tests sur les composés volatils)

5.20. Boîte de Pétri 100 × 15 mm

6. RÉACTIFS ET ÉTALONS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des solutions du toxique de référence est de l'eau ultra-pure de type Milli-Q.

6.1. Toxique de référence

- Chlorure de cadmium, $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (CAS n° 7790-78-5).

Une solution mère de chlorure de cadmium est préparée à une concentration de 12,80 g $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}/\text{L}$ (10,0 g CdCl_2/l ou 6,30 g Cd/l) avec de l'eau ultra-pure. Cette solution peut être conservée pour une durée de six mois. Après six mois, si la solution est vérifiée chimiquement et que sa concentration n'a pas varié de plus de 10 %, la même solution peut être conservée pour une durée additionnelle de trois mois.

6.2. SOL ARTIFICIEL

- Le sol artificiel utilisé est le sol CEAEQ.

6.2.1. Composition

- 70 % sable de silice grade 70 tamisé à 106-250 μm
- 22 % de limon (sable de silice grade 70 tamisé à 20-75 μm)
- 5 % d'argile kaolinite
- 3 % terre noire (humus noir de *Sphagnum* sp.) tamisé à 4 mm

6.2.2. Préparation

Déterminer le pourcentage d'humidité de la terre noire en faisant sécher une fraction de 10 g à 105 °C pendant 24 heures et peser de nouveau. Déterminer le pourcentage d'humidité de la façon suivante :

$$\left[\frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}} \right] \times 100$$

Tenir compte du taux d'humidité pour réajuster le poids de terre noire de façon à respecter 3 % en poids sec dans le sol artificiel.

Tamiser pendant 15 minutes du sable de silice grade 70 à l'aide d'un tamiseur automatique muni d'une séquence de tamis de 300, 250, 106, 75 et 20 µm. La fraction 106-250 µm est conservée comme la fraction sable et la fraction de 20 à 75 µm est conservée comme la fraction limon.

Dans un mélangeur rotatif muni d'une cuve en polypropylène, préparer des portions d'environ 25 kg de sol en ajoutant les proportions suivantes et en mélangeant pendant 45 minutes :

- 3500 g de sable 106-250 µm
- 1100 g de limon 20-75 µm
- 250 g de kaolin
- 150 g de terre noire (équivalent sec) tamisée à 4 mm

Le mélange sec est conservé dans le mélangeur et lorsqu'une quantité de sol doit être utilisée, le sol est mélangé de nouveau pour une durée de 15 minutes. Ce deuxième mélange a pour but de réhomogénéiser le sol, car avec le temps d'entreposage une ségrégation granulométrique verticale peut se faire entraînant la fraction fine vers le fond du contenant. De façon à avoir un mélange bien homogène, il est donc nécessaire de remélanger le sol selon le besoin.

Le pH du sol est déterminé en mélangeant 10 g de sol à 100 ml d'eau ultra-pure (ratio 1 : 10). Le pH de ce sol se situe naturellement entre une valeur de 5,8 et de 6,2. Si le pH est inférieur à 5,7, il doit être réajusté à $6,0 \pm 0,2$ à l'aide de carbonate de calcium à une concentration d'environ 0,1 %. À noter que le pH du sol peut varier légèrement dans les jours suivant l'ajustement du taux d'humidité.

La capacité maximale de rétention en eau (*cf.* 8.1.1) a été déterminée à 36 % après quatre essais avec une méthode avec application de 5 lb/po² de pression.

7. ORGANISME BIOLOGIQUE

7.1. ESPÈCE ET SOUCHE

L'espèce utilisée est l'orge (*Hordeum vulgare*), une monocotylédon de la famille des graminées. La variété orge rond est utilisée et présente un taux de germination supérieur à 90 %. La variété Chapais est également adéquate. Les semences sont achetées commercialement d'un même lot. Elles ne doivent pas être traitées aux fongicides ni aux insecticides et elles doivent être homogènes en taille. Le pourcentage de germination garantie devrait être connu et égal ou supérieur à 90 %. Les semences sont entreposées à 4 °C et elles sont conservées pour une durée maximale de un an.

8. PROTOCOLE D'ANALYSE

8.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

8.1.1. Échantillons solides

Les échantillons solides doivent être bien homogénéisés et tamisés à 4 mm. Le pH et le pourcentage d'humidité sont déterminés et le taux d'humidité est ajusté à 83 % de la capacité maximale de rétention en eau (cette valeur peut varier selon la texture du sol). Pour le sol de référence utilisé dans ce protocole, cette valeur équivaut à un taux d'humidité de 30 %. Si le sol est détrempé, il doit être séché jusqu'à l'obtention du taux d'humidité désiré.

La capacité maximale de rétention en eau est déterminée comme suit :

- Utiliser un becher de polypropylène de 50 ml, dont le fond a été retiré et remplacé par une grille plastifiée. Déposer sur la grille un filtre Whatman n° 2 couvrant entièrement le fond du becher et saturer d'eau le filtre.
- Peser le becher avec le filtre saturé d'eau.
- Peser une quantité de 50 g de sol (équivalent sec) et le déposer dans le becher; peser de nouveau le sol et le becher et noter le poids.
- Saturer d'eau le sol en l'immergeant pendant 15 minutes dans un contenant plus grand contenant de l'eau de façon à ce que le niveau d'eau atteigne environ la demie de la hauteur du niveau du sol.
- Retirer du grand récipient d'eau le becher contenant le sol et laisser drainer quelques minutes; déposer ensuite sur une surface absorbante et laisser librement l'eau se drainer pendant 15 minutes.
- Déposer ensuite le becher contenant le sol sur une rampe à filtration sous vide, appliquer une pression de 5 lb/po² pendant 5 minutes et laisser l'eau se drainer.
- Peser de nouveau le becher contenant le sol humidifié et noter.
- Déterminer le poids du sol humide en soustrayant le poids du becher avec le filtre saturé d'eau.

La capacité maximale de rétention est calculée comme suit :

$$\frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}}$$

Procéder ensuite à l'hydratation de l'échantillon de sol à un niveau correspondant à 83 % de la capacité maximale de rétention.

Un temps d'équilibrage de 24 heures après l'hydratation doit être appliqué pour les sols initialement secs et pour les sols artificiels fabriqués au laboratoire. En effet, le pH peut présenter des variations au cours des heures suivant l'hydratation. Pour le sol artificiel, le pH est mesuré de nouveau après la période d'équilibrage de 24 heures.

Pour certains sols à faible teneur en matière organique et à fractions particulières très fines, l'hydratation peut être problématique. Le sol peut passer rapidement d'une structure dure et compacte à un état boueux lors de la phase d'hydratation. Dans ces cas particuliers, il est recommandé, lorsque cela est possible, d'effectuer des prétests d'hydratation de façon à déterminer la quantité précise d'eau à ajouter. Dans le cas des échantillons très compacts (argileux), il peut être également nécessaire d'améliorer la texture du sol par l'ajout de sable de silice. Ces modifications doivent être précisées sur la feuille de travail du laboratoire ainsi que sur le certificat d'analyse. Dans les cas de sols ayant des textures problématiques, il est fortement recommandé de mener parallèlement un groupe référence constitué du même sol que le sol contaminé mais provenant d'une zone non contaminée.

Pour les échantillons contenant des volatiles, l'exposition à l'air doit être minimisée. Ainsi, au lieu de tamiser, il est plutôt conseillé de broyer et d'homogénéiser le sol dans un sac de polyéthylène hermétiquement fermé.

8.1.2. Échantillons liquides

Les échantillons liquides peuvent être testés sur le sol artificiel en humidifiant ce dernier au moyen de l'échantillon. Il est également possible de déterminer la relation concentrations-réponses en effectuant des dilutions de l'échantillon avec de l'eau ultra-pure.

Pour plus de détails sur les procédures de fabrication d'extraits liquides pour l'estimation de la mobilité des contaminants dans les sols, consulter le « Protocole de lixiviation applicable aux tests biologiques », MA. 500 – Lix. 1.0.

8.2. CONDITIONS DU TEST

Tableau 2 - Conditions d'essai pour le test d'inhibition de la germination et de la croissance

Espèce	<i>Hordeum vulgare</i> ou autre
Température d'incubation	24 ± 2 °C
Luminosité et photopériode	4 300 lux ± 10 %; 16 h lumière/8 h obscurité
Sol artificiel/sol contrôle	70 % sable de silice (106-250 µm) 22% limon (20-75 µm) 5 % kaolin 3 % terre noire pH : 6,0 ± 0,2
Hydratation et % d'humidité	83 % du taux maximal de rétention en eau pour les échantillons solides Hydratation au début du test seulement
Type de contenant de test	Vials de polystyrène de 25 ml
Masse de sol par replica	20 g humide
Nombre de graines/vial	1
Nombre de vial/sac hermétique ou bocal de verre	5
Nombre de replica	5 × 5 graines pour test avec échantillon 100 % 3 × 5 graines pour test avec relation concentrations-réponses
Durée du test	7 jours
Mesures physico-chimiques	Humidité et pH de l'échantillon au début du test. Température et intensité lumineuse de l'incubateur au début et à la fin du test.
Mesures biologiques	% de germination, longueur des tiges, longueur des racines, poids humide et poids sec des tiges après 7 jours d'exposition.
Paramètres de mesure	% d'inhibition par rapport au contrôle pour les tests à concentration unique. Pour les tests avec relation concentrations-réponses : CE ₂₅ et CE ₅₀ germination CI ₂₅ et CI ₅₀ longueur des tiges CI ₂₅ et CI ₅₀ longueur des racines CI ₅₀ poids humide des tiges CI ₅₀ poids sec des tiges
Expression des résultats (CE et CI)	Pour les solides : mg/kg de poids sec Pour les liquides : ml/kg de poids sec
Statistiques	Test <i>t</i> unilatéral de comparaison de moyennes pour les tests à concentration unique. Probit, moyenne mobile, Spearman Karber ou binomiale pour la CE ₅₀ et la CE ₂₅ ; interpolation linéaire (IC _p) pour les CI ₅₀ et CI ₂₅ des tests avec relation concentrations-réponses.
Critères d'acceptabilité	Critères des témoins - Germination : ≥ 90 % - Mesures de croissance : ± 2S de la moyenne historique Toxique de référence : - Chlorure de cadmium : moyenne ± 2S du pourcentage d'inhibition de deux concentrations de chlorure de cadmium pour la longueur des tiges et des racines.

8.3. SCHÉMA EXPÉRIMENTAL

De façon générale, aucune dilution de sol n'est effectuée dans les sols contaminés et les déchets solides lorsque l'échantillon provient du terrain. L'approche expérimentale est alors basée sur une comparaison statistique (test t unilatéral) entre l'échantillon et le témoin. Un nombre plus grand de replica (5 ou plus) est nécessaire dans cette approche. À noter que les replica sont utilisés comme tels uniquement pour les comparaisons de moyennes des poids humides et des poids secs, car la résolution nécessaire à la pesée exige de grouper les tiges et les racines d'au moins cinq plantes. Pour les mesures de longueurs, les moyennes sont établies sur l'ensemble des graines. Le replica est alors la plante elle-même.

Dans certains cas, le processus de gestion du sol contaminé peut nécessiter une dilution avec un sol propre et la réutilisation du sol ainsi modifié. Le sol peut alors être testé à la concentration 100 % et à la concentration d'usage prévue.

Dans le cas des échantillons liquides (lixiviats, eau usée, etc.), un sol artificiel est hydraté avec l'échantillon et comparé au témoin hydraté avec de l'eau déminéralisée.

Dans le contexte d'études sur la toxicité de produits purs ou de mélanges de produits purs (établissement de critères, etc.), la détermination de la relation concentrations-réponses est nécessaire. Un nombre de trois replica est alors utilisé avec une gamme de concentrations relativement étendue. Le choix de la gamme de dilutions doit être basé sur le comportement de l'échantillon plutôt que sur un choix préétabli.

Dans cette méthode, plusieurs effets biologiques sont mesurés. Ceci peut exiger plus de concentrations et une gamme plus étendue pour couvrir les zones d'effet de tous les paramètres biologiques.

8.4. DÉPART DU TEST

Les semences doivent être examinées et sélectionnées. Les graines décolorées, endommagées ou anormalement petites sont mises de côté.

Déposer 20 g de sol hydraté dans chacun des vials à germination. À l'aide de pinces de laboratoire, insérer la graine à 1,0 cm de profondeur. Recouvrir légèrement la graine.

Pour les tests avec un sol contaminé, 5 replica contenant chacun 5 graines sont utilisés, soit 25 graines pour l'échantillon à 100 % et 25 graines pour le témoin. L'usage de pots contenant une seule graine facilite grandement les manipulations pour la détermination de la longueur des racines et augmente la fiabilité des résultats. Les racines d'orge se développent comme de longs fils entremêlés et lorsque plusieurs graines sont plantées dans le même contenant, beaucoup de temps doit être investi dans la séparation des racines de chaque graine et le risque de briser des racines devient important.

Le groupe témoin est composé de sol artificiel (*cf.* 6.2). Pour les tests avec un sol contaminé prélevé sur le terrain, il est fortement recommandé de mener parallèlement un groupe référence constitué du même sol que l'échantillon mais exempt de contamination. Ce sol de référence peut

être obtenu à proximité du site d'échantillonnage mais dans une zone non contaminée. La toxicité mesurée dans l'échantillon est alors comparée au site de référence. Le groupe témoin (sol artificiel) du test agit pour sa part comme un contrôle de qualité interne au laboratoire.

Pour les tests avec détermination de la relation concentrations-réponses, le nombre de replica est de trois.

Les vials sont déposés par groupe de cinq dans un plat de Pétrie de 100 × 15 mm et insérés dans un sac de polyéthylène (Ziploc[®]) ou dans un bocal hermétique (pour les contaminants volatils) et identifiés clairement. Ils sont par la suite déposés aléatoirement dans une chambre de croissance pour une période de sept jours à une température de 24 ± 2 °C, et soumis à une intensité lumineuse de $4\,300 \text{ lux} \pm 10\%$ selon une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. Aucune mesure biologique n'est effectuée pendant la période d'exposition et les sacs (ou bocaux) ne doivent pas être ouverts. L'intensité lumineuse et la température de l'incubateur doivent être mesurées au début du test, au troisième jour et à la fin du test.

8.5. MESURES À LA FIN DU TEST

À la fin de la période de sept jours d'exposition, les groupes tests et témoins sont retirés de l'incubateur et les vials sont retirés des sacs de polyéthylène ou des bocaux. La température et la luminosité de l'incubateur sont notées.

Une observation générale de l'état des plantes est effectuée et les symptômes tels flétrissement, dessèchement ou décoloration du feuillage sont notés.

Il s'agit ensuite de déterminer le succès de germination pour chacun des replica, des groupes tests et du témoin. Le critère de germination est l'ouverture de la graine et l'émergence d'une tige de 3 mm. Noter les renseignements relatifs au succès de germination sur la feuille de travail.

Par la suite, récupérer les plantes entières en retirant la masse de sol de chacun des vials et en agitant doucement de façon à détacher le maximum de particules de sol des racines. Les graines ayant été plantées individuellement, le groupe de racines de chaque graine est facilement récupérable. Déposer les plants dans un tamis de 2 mm et nettoyer délicatement tout en immergeant dans l'eau tiède. Étaler la plante sur une surface propre et à l'aide d'un scalpel ou d'un ciseau, couper la tige et en mesurer la longueur à l'aide d'une règle. Déterminer ensuite la longueur des racines en étalant bien le groupe de racines et mesurer immédiatement (ne pas laisser sécher) la racine la plus longue. Rapporter les résultats en centimètres sur la feuille de travail.

Identifier les contenants de pesage pour chacun des replica du groupe test et du témoin. Peser les nacelles et noter le poids avec une précision à 0,0001 g. Introduire les tiges (sans les presser entre elles) de tous les individus d'un replica dans le contenant et procéder au pesage avec une précision de 0,0001 g. Soustraire le poids du contenant et rapporter le poids humide des tiges sur la feuille de travail. La détermination du poids humide doit être faite immédiatement après la coupe des tiges car le feuillage perd rapidement de son contenu en eau après la récolte.

Placer ensuite les contenants avec les tiges dans une étuve et procéder au séchage à 90 °C pendant 24 heures. Après 24 heures, peser les contenants avec les tiges sèches. Soustraire le poids du contenant et rapporter le poids sec des tiges avec une précision de 0,0001 g.

Déterminer le pH et le taux d'humidité du sol témoin et des groupes tests en constituant un échantillon d'environ 10 g en mélangeant des sous-échantillons de chacun des replica.

Un exemple de feuille de travail est fourni à l'annexe 1.

8.6. ESSAI AVEC TOXIQUE DE RÉFÉRENCE

Le toxique de référence utilisé est le chlorure de cadmium. Dans le but de réduire la charge de travail liée au contrôle de qualité, les tests de toxique de référence effectués dans un contexte de suivi en routine sont réalisés uniquement avec deux concentrations de chlorure de cadmium. Trois replica témoins et trois replica de chacune des deux concentrations choisies sont utilisés. Les réponses moyennes (pourcentage d'inhibition par rapport au témoin) des trois replica des groupes tests sont calculées pour les mesures biologiques et sont rapportées sur des diagrammes de contrôle avec des limites de $\pm 2S$ et $\pm 3S$. Les concentrations du toxique de référence (exprimées en Cd) utilisées devraient permettre l'obtention de pourcentages d'inhibition se situant entre 10 % et 90 % pour l'effet retenu.

L'utilisation d'une seule concentration est insuffisante en raison des écarts de sensibilité des différents processus biologiques de la plante. Les mesures biologiques du test avec toxique de référence se limiteront à la croissance des tiges et à la croissance des racines. Dans une telle application, l'essai aura essentiellement pour rôle de s'assurer que la sensibilité du lot de semence utilisé s'inscrit dans les limites de la moyenne $\pm 2S$ du diagramme de contrôle.

Pour le chlorure de cadmium et le sol du CEAEQ, une concentration de 180 mg/kg Cd est adéquate pour mesurer une réduction de 50 % de la croissance des tiges et une concentration de 150 mg/kg Cd est adéquate pour mesurer une réduction de 50 % de la croissance des racines.

Les essais avec le toxique de référence doivent être effectués une fois par mois ou une fois par série d'essais si la fréquence des essais est inférieure à une fois par mois.

Des limites de contrôle inférieures (moyenne - 2S et - 3S) et supérieures (moyenne + 2S et + 3S) sont calculées 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 %).

Pour les tests visant à établir la relation concentrations-réponses, la gamme de 35 à 450 mg/kg de cadmium est adéquate.

8.7. ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats du test sont acceptables si :

- le pourcentage de germination dans les contrôles est supérieur ou égal à 90 %;

- la longueur moyenne des tiges et des racines ainsi que le poids humide et le poids sec des tiges dans les témoins se situent dans les limites de $\pm 2S$ de la moyenne historique;
- les résultats du test avec toxique de référence, effectué selon la fréquence requise, se situent à l'intérieur des limites de la moyenne $\pm 2S$. Tout résultat se situant à l'extérieur des limites de la moyenne $\pm 3S$ doit être rejeté. Si le résultat se situe entre les limites de $\pm 2S$ et $\pm 3S$, il pourrait, selon le cas, être accepté. Une note doit toutefois être inscrite au rapport d'analyse précisant la situation;
- les conditions d'application du test (température, luminosité, etc.) ont été respectées.

9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Le pourcentage de germination attendu des semences témoins se situant entre 90 et 100 %, l'inhibition observée dans le groupe témoin doit être soustraite des groupes tests. Également, le pourcentage d'inhibition de la germination est exprimé sur la totalité des graines sans égard au replica et il s'exprime comme suit :

$$\frac{\% \text{ germ.témoin} - \% \text{ germ.test}}{\% \text{ germ.témoin}}$$

La moyenne et l'écart type des replica témoins et tests sont également calculés pour les besoins du test de comparaison de moyenne dans les tests à concentration unique. Pour les tests avec dilutions, le pourcentage d'inhibition (avec soustraction de l'inhibition dans témoin) pour l'ensemble des graines de chacune des concentrations est utilisé pour le calcul de la CE_{25} et de la CE_{50} germination.

Pour les mesures de croissance en longueur et en poids, aucune valeur n'est attribuée aux graines n'ayant pas germé.

Les longueurs moyennes des tiges et des racines des graines ayant germé dans le témoin et les concentrations tests sont calculées sur les données groupées (ensemble des 15 ou 25 graines sans égard au replica) et sont utilisées pour exprimer le pourcentage d'inhibition par rapport au témoin. Pour les tests avec dilutions, chacune des données de longueur est utilisée comme une valeur saisie (chaque plante équivaut à un replica) pour le calcul des CI_p à l'aide du programme d'interpolation linéaire. Autrement dit, pour les mesures de longueur, les replica (sac Ziploc[®] avec 5 graines) ne sont d'aucune utilité.

Pour les mesures de poids humide et de poids sec, les replica sont utilisés comme tel car les cinq plantes de chaque replica doivent être regroupées pour obtenir une résolution suffisante à la pesée. La moyenne et l'écart type sont déterminées pour l'ensemble des trois ou cinq replica selon le cas et servent à exprimer le pourcentage d'inhibition et à calculer le test t unilatéral. Pour les tests avec dilutions, chacune des données de replica est utilisée comme une valeur saisie pour le calcul des CI_p à l'aide du programme d'interpolation linéaire.

9.1. STATISTIQUE POUR LES TESTS À CONCENTRATION UNIQUE

Pour les tests à concentration unique, les moyennes des réponses biologiques des groupes de contrôle et des groupes tests sont comparées statistiquement pour déterminer si les différences observées sont significatives. Le test *t* unilatéral pour un seuil de confiance de 95 % est appliqué.

9.2. DÉTERMINATION DES CE₅₀, CE₂₅, CI₅₀ ET CI₂₅

La CE₅₀, la CE₂₅ et leurs intervalles de confiance à 95 % sont déterminés à l'aide de la méthode probit, de la moyenne mobile, de la méthode Spearman-Kärber ou de la méthode binomiale. Toutefois, le résultat obtenu par la méthode binomiale ne doit être utilisé que dans les cas où aucune inhibition partielle n'a été observée, même après l'usage d'une gamme de dilutions suffisamment serrée. Les CI₅₀ et CI₂₅ sont déterminées à l'aide de la méthode d'interpolation linéaire version 2.0 (IC_p) de Norberg-King (1993).

9.3. Expression des résultats

Les résultats des CE et des CI et leurs intervalles de confiance à 95 % sont exprimés en % P/P en base sèche ou en P/P (i.e. mg/kg) pour les produits solides purs. Pour les échantillons liquides, les résultats sont exprimés en ml/kg.

10. VOCABULAIRE

CE_p (ex. : CE₅₀) : concentration efficace qui inhibe un pourcentage donné d'une réponse biologique de type binaire (ex. : germination ou absence de germination).

CI_p (ex. : CI₅₀) : concentration inhibitrice qui inhibe un pourcentage donné d'une réponse biologique de type quantitative (ex. : croissance radriculaire).

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 relié aux conditions de base du test de toxicité (ex. : qualité de l'eau de dilution, manipulation et état de santé des organismes soumis au test de toxicité, etc.).

Groupe référence : groupe d'organismes exposés à un sol provenant du même site de prélèvement que l'échantillon testé, mais dans une zone non contaminée du site (lorsque cela est possible). Le sol de référence doit présenter les mêmes caractéristiques physiques et chimiques que l'échantillon, mis à part la contamination. Il permet de détecter la présence d'interférences liées par exemple à une texture inadéquate du sol.

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. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime pour les tests de toxicité 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 : niveau d'effet minimal pouvant être quantifié lors d'un test de toxicité avec une fiabilité définie. Le seuil d'effet est défini comme étant la valeur de t de la table de Student ($\alpha = 0,05$) multipliée par l'écart type (S) de n mesures sur des groupes témoins. Le seuil d'effet correspond à la limite de détection du test et s'exprime en pourcentage d'effet 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.

Test 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

ASTM, Standard Practice for Conducting Early Seedling Growth Tests, ASTM Designation E 1598-94, American Society for Testing and Materials, 7 p., 1994.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en toxicologie, DR—12—SCA-03, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Protocole de lixiviation applicable aux tests biologiques, MA. 500 – Lix. 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

GREEN, J.C., C.L. BARTELS, W.J. WARREN-HICK, B.R. PACKHURST, G.L. LINDER, S.A. PETERSON and W.E. MILLER, Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites, USEPA 600/3-88-029, 102 p., 1989.

NORBERG-KING, T.J., An interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (IC_p) Approach (version 2.0), National Effluent Toxicity Assessment Center, Technical Report 03-93, USEPA, 39 p., 1993.

ZAGURY G. J., Y. DUDAL, J. BUREAU, C. BASTIEN and R. CHASSÉ, Sample Handling and Preparation for Estimation of Mobility, Bioavailability and Toxicity of Contaminated Soils. In : Sunahara G.I., A.Y. Renoux, C. Thellen, C.L. Gaudet and A. Pilon ed. Environmental Analysis Of Contaminated Sites – Toxicological Methods and Approaches. John Wiley and Sons, 2002.

ANNEXE 1

N° laboratoire : _____

N° dossier : _____

FEUILLE DE TRAVAIL INHIBITION DE LA GERMINATION ET DE LA CROISSANCE Formulaire n° FO-09-01-BMS-139-1

Client : _____

Mode de conservation : _____

Projet : _____

Espèce testée : _____

Identification : _____

Lot de graines : _____

Date d'analyse : _____

Nature échantillon à la réception : sol. ____ liq. ____

Intensité lumineuse (lux) : début ____ fin ____

Temp (°C) de l'incubateur : Début ____ fin ____

Traitement de l'échantillon : _____

Caractéristiques de l'échantillon avant le début de l'essai

Température (°C) : _____ **S** Humidité (%) : _____ Apparence : _____

pH : _____ **L** Conductivité (µS/cm) : _____ **S** Texture : _____

S : échantillon solide seulement **L** : échantillon liquide seulement

Mesures physico-chimiques des concentrations testées

Concentration	Humidité (%)		pH		Conductivité (µS/cm)	
	Début	Fin	Début	Fin	Début	Fin

Feuille de calcul pour germination

N° lab. : _____

Conc.	Replica	Nombre de graines germées	Nombre de graines non germées	Nombre de graines testées	% inh.	Moy. graines germées	Écart type
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	total						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	total						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	total						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	total						
	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	total						
témoin	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	total						

Croissance - Longueur du feuillage

N° lab.: _____

Conc.	Replica	Longueur (cm)					Moyenne (cm)	Écart type (cm)	% Inhibition
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
témoin	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								

Croissance – Longueur des racines

N° lab. : _____

Conc.	Replica	Longueur (cm)					Moyenne (cm)	Écart type (cm)	% Inhibition
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								
témoin	1								
	2								
	3								
	4								
	5								
	total								

Croissance – Poids du feuillage

N° lab. : _____

conc.	Replica	nb. tiges	nacelle vide (g)	nacelle + éch. hum. (g)	échant. hum. (g)	pds hum. par tige (g)	nacelle + éch. sec (g)	échant. sec (g)	pds sec par tige (g)	% inhib. feuilles Humides	% inhib. feuilles Secs	
1	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
2	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
3	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
4	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
5	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
6	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
7	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
8	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
9	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
10	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			
témoin	1											
	2											
	3											
	4											
	5											
						moyenne :			moyenne :			
						écart type :			écart type :			

Inhibition par rapport au témoin										
Concentration %	Germination		Longueur feuilles		Longueur racines		Poids humide feuilles		Poids sec feuilles	
	%	Signif.	%	Signif.	%	Signif.	%	Signif.	%	Signif.

Signif. : S : Différence significative par rapport au témoin
 NS : Différence non significative par rapport au témoin