

Méthode d'analyse

MA. 500 – P.sub 1.0
2026-02-13 (révision 5)

Détermination de la toxicité :
inhibition de la croissance chez l'algue
Raphidocelis subcapitata (anciennement
Pseudokirchneriella subcapitata)

Coordination et rédaction

Cette publication a été réalisée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) du ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP). Elle a été produite par la Direction des communications du MELCCFP.

Renseignements

Téléphone : 418 521-3830
1 800 561-1616 (sans frais)

Formulaire : www.environnement.gouv.qc.ca/formulaires/renseignements.asp

Internet : www.environnement.gouv.qc.ca

Dépôt légal – 2026

Bibliothèque et Archives nationales du Québec

ISBN 978-2-555-03191-3 (PDF)

Tous droits réservés pour tous les pays.

© Gouvernement du Québec – 2026

Table des matières

Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Abréviations et symboles	viii
Avant-propos	ix
1.Domaine d'application	1
2.Principe et théorie	1
3.Interférence	1
4.Conservation	2
5.Matériel et appareillage	2
6.Réactifs et solutions	3
6.1Réactifs	3
6.2Milieux de culture	4
6.3Solutions	7
6.4Toxique de référence	7
7.Organismes biologiques	7
7.1Espèces et souches	7
7.2Méthode de culture	7
8.Protocole d'analyse	9
8.1Préparation des échantillons	9
8.2Conditions d'essai	11
8.3Sélection des concentrations d'essai	12
8.4Réalisation de l'essai	12
8.5Essai avec toxique de référence	14
9.Calcul et expression des résultats	14

9.1Détermination des CI_p	14
9.2Détermination du pourcentage de stimulation (% S)	15
9.3Expression des résultats	15
10.Critères d'acceptabilité	16
11.Références bibliographiques	17
Annexe 1. Schématisation de la séquence de repiquage	18

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition des solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures d'algues et la préparation du milieu d'enrichissement servant aux essais _____ 4

Tableau 2. Concentrations finales des macroéléments et des microéléments dans le milieu de culture liquide _____ 5

Tableau 3. Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures sur géloses
6

Tableau 4. Solution concentrée d'éléments traces (n° 9) pour le maintien des cultures sur géloses
6

Tableau 5. Concentrations finales des macroéléments et des microéléments dans les récipients d'essai _____ 10

Tableau 6. Résumé des conditions d'essai _____ 11

Abréviations et symboles

ACS.....	American Chemical Society
ASTM	American Society for Testing and Materials
BHAA.....	Bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives
CEAEQ.....	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
CI _p	Concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet p donné
CMEQ.....	Concentration minimale avec effet observé
CPCC	Canadian Phycological Culture Collection
CSEO	Concentration sans effet observé
DEL	Diode électroluminescente
EC	Environnement Canada
PALA	Programme d'accréditation des laboratoires d'analyse
P/V.....	Rapport de poids à volume
UTc.....	Unité toxique chronique
V/V.....	Rapport de volume à volume

Avant-propos

Le texte de la présente méthode a été presque intégralement refondu. Pour en faciliter la consultation, seules les modifications importantes sont identifiées en rouge.

1. Domaine d'application

Cette méthode utilisant l'algue unicellulaire d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* (anciennement connue sous l'appellation *Pseudokirchneriella subcapitata*) sert à la détermination de la toxicité d'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. 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 (CI_{25} 96 h). Une série de concentrations de l'échantillon ayant des potentiels identiques de croissance au contrôle (via l'ajout d'un supplément de nutriments) est utilisée pour déterminer la relation concentration-réponse. La CI_{50} 96 h est également calculée.

L'incubation est effectuée dans un système statique (sans renouvellement) et dans des conditions contrôlées de température et de 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 susceptibles d'affecter le potentiel de croissance de l'organisme.

3. Interférence

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 planctonivores 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. Pour cette raison, la section 8.1.1.1 prévoit une modification du 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 liés aux substances toxiques présentes dans l'échantillon.

4. Conservation

Les échantillons doivent être prélevés et conservés selon les recommandations décrites dans les Guides d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales du site Web du CEAEQ¹.

L'échantillon doit être prélevé dans un contenant de polypropylène (ou autre) non toxique, neuf ou ayant subi un lavage approprié. Un échantillon représentatif de 500 ml est requis pour réaliser l'analyse. Le contenant doit être préalablement rincé avec l'échantillon. On le remplit ensuite en laissant le minimum d'air entre le couvercle et l'échantillon afin de permettre le brassage tout en réduisant la perte d'éventuels contaminants volatils.

Pendant leur transport, les échantillons doivent être conservés à l'obscurité et refroidis au moyen d'agents réfrigérants tout en étant maintenus au-dessus du point de congélation. Au laboratoire, les échantillons doivent être conservés au réfrigérateur, à environ 4 °C, jusqu'à leur utilisation. Les échantillons doivent être acheminés au laboratoire dans le plus court délai possible. L'essai devrait commencer le plus rapidement possible après le prélèvement.

Les échantillons sont conservés selon les modalités suivantes :

Nature de l'échantillon	Conditions de conservation	Délai de conservation
Eaux usées, eaux de lixiviation, lixiviat de résidus solides, eaux réceptrices	Environ 4 °C, obscurité, aucun agent de conservation	3 jours

5. Matériel et appareillage

Les marques de commerce citées ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Un modèle équivalent d'un autre fabricant peut également être utilisé.

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

- Incubateur, chambre environnementale ou toute autre installation en mesure de fournir la température et l'éclairage appropriés
- Agitateur orbital
- Compteur électronique de particules (ou appareil de comptage cellulaire équivalent) permettant le décompte de cellules dans une classe de tailles entre 2 et 7 µm, avec une limite de détection ≤ 10 000 cellules/ml
- Microscope à contraste de phase (grossissement de 100 à 400X)

¹ www.ceaeq.gouv.qc.ca/documents/publications/echantillonnage.htm

- Centrifugeuse
- Membranes filtrantes de 0,45 µm (Millipore type HA ou autres), de préférence en polypropylène (PP), en polyéther sulfone (PES) ou en acétate de cellulose (CA)
- Membranes filtrantes de 0,2 µm (Millipore type HA ou autres)
- Microsphères d'étalonnage pour l'appareil de décompte cellulaire (étalonnage selon la taille et le nombre)

6. Réactifs et solutions

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS ou l'équivalent, à moins d'indication contraire.

L'eau utilisée pour la préparation des réactifs et des solutions est de l'eau ultrapure ou purifiée (type I ou II selon l'ASTM) et qui respectent les critères de qualité mentionnés dans les *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie* (DR-12-SCA-03). Pour alléger le texte, le terme « eau ultrapure » est utilisé dans cette méthode.

6.1 Réactifs

Nom	Formule chimique	N° de CAS
Bicarbonate de sodium	NaHCO_3	144-55-8
Chlorure de magnésium hexahydraté	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	7791-18-6
Chlorure de calcium dihydraté	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10035-04-8
Nitrate de sodium	NaNO_3	7631-99-4
Sulfate de magnésium heptahydraté	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10034-99-8
Phosphate de potassium (dibasique anhydre)	K_2HPO_4	7758-11-4
Phosphate de potassium (monobasique)	KH_2PO_4	7778-77-0
Chlorure de sodium	NaCl	7647-14-5
Chlorure ferrique hexahydraté	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	10025-77-1
Sulfate d'ammonium ferreux hexahydraté	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	7783-85-9
Sulfate ferrique heptahydraté	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7782-63-0
Acide borique	H_3BO_3	10043-35-3
Chlorure de manganèse tétrahydraté	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	13446-34-9
Hydroxyde de sodium	NaOH	1310-73-2
Acide chlorhydrique	HCl	7647-01-0
Acide sulfurique	H_2SO_4	7664-93-9
Chlorure de zinc	ZnCl_2	7646-85-7
Chlorure de cobalt hexahydraté	$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	7791-13-1
Molybdate de sodium dihydraté	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10102-40-6
Chlorure de cuivre dihydraté	$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	10125-13-0
Éthylènediamine tétraacétate, disodique dihydraté	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6381-92-6
Hydroxyde de potassium	KOH	1310-58-3
Bacto Agar		9002-18-0

6.2 Milieux de culture

6.2.1 Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour milieux liquides

Les solutions d'éléments nutritifs pour milieux liquides servent à la fois à la préparation du milieu de culture liquide (cf. 6.2.2) et à la préparation du milieu d'enrichissement pour les essais (cf. 8.1.1).

- Préparer les neuf solutions concentrées d'éléments nutritifs (tableau 1). À noter que les solutions 4A et 4B peuvent être légèrement chauffées pour faciliter la dissolution du H_3BO_3 .
- Stériliser les solutions concentrées d'éléments nutritifs par filtration sur une membrane de 0,22 μm .

Tableau 1. Composition des solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures d'algues et la préparation du milieu d'enrichissement servant aux essais

Solutions éléments nutritifs	Composés	Quantité dissoute dans 500 ml d'eau ultrapure
1	NaNO_3	12,75 g
2	$\text{MgCl}_2 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$	6,08 g
3	$\text{CaCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	2,20 g
4A	H_3BO_3 $\text{MnCl}_2 \bullet 4 \text{H}_2\text{O}$ ZnCl_2 $\text{FeCl}_3 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$ $\text{CoCl}_2 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{CuCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{EDTA} \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	92,80 mg 208,00 mg 1,64 mg ^a 79,90 mg 0,714 mg ^b 3,63 mg ^c 0,006 mg ^d 150,00 mg
4B ^e	Même préparation que pour la solution 4A, mais sans $\text{Na}_2\text{EDTA} \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$	
5	$\text{MgSO}_4 \bullet 7 \text{H}_2\text{O}$	7,35 g
6A	K_2HPO_4	0,52 g
6B ^f	K_2HPO_4	45 g
7	NaHCO_3	7,50 g

^{a,b,c,d} Étant donné les faibles concentrations des métaux traces dans les solutions 4A et 4B, il faut passer par la préparation de sous-solutions pour éviter de peser des quantités infimes de chacun des composés. Des sous-solutions sont proposées plus bas.

^{e,f} Voir le descriptif plus bas.

- Sous-solution proposée** : Dissoudre 164 mg de ZnCl_2 dans 100 ml d'eau ultrapure. Ajouter 1 ml de cette solution aux solutions n° 4 (ne pas conserver cette solution).
- Sous-solution proposée** : Dissoudre 71,4 mg de $\text{CoCl}_2 \bullet 6 \text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau ultrapure. Ajouter 1 ml de cette solution aux solutions n° 4 (ne pas conserver cette solution).
- Sous-solution proposée** : Dissoudre 36,3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ dans 10 ml d'eau ultrapure. Ajouter 1 ml de cette solution aux solutions n° 4 (ne pas conserver cette solution).
- Sous-solutions proposées** : Dissoudre 60,0 mg de $\text{CuCl}_2 \bullet 2 \text{H}_2\text{O}$ dans 1 000 ml d'eau ultrapure. Prendre 1 ml de cette solution et la diluer dans 9 ml d'eau ultrapure (volume final de 10 ml). Ajouter 1 ml de cette seconde solution aux solutions n° 4 (ne pas conserver ces solutions).

- e) La solution 4B est utilisée dans la préparation du milieu d'enrichissement servant aux essais, en remplacement de la solution 4A qui sert au milieu de culture liquide.
- f) La solution 6B est utilisée dans la préparation du milieu d'enrichissement enrichi en phosphore servant aux essais, en remplacement de la solution 6A.

Les solutions concentrées d'éléments nutritifs doivent être maintenues stériles et conservées à 4 °C et à l'obscurité pendant une période maximale d'un an, à l'exception des solutions 4A et 4B, qui sont conservées pour une période maximale de 6 mois.

6.2.2 Milieu pour culture liquide

- Ajouter 1 ml de chacune des sept solutions concentrées d'éléments nutritifs (1, 2, 3, 4A, 5, 6A et 7) du tableau 1 à approximativement 900 ml d'eau ultrapure en agitant légèrement entre chaque ajout.
- Compléter le volume à 1 litre et ajuster si nécessaire le pH du milieu final à $7,5 \pm 0,1$ avec une solution de NaOH ou de HCl à 1 N. La concentration finale des macroéléments et des microéléments dans le milieu de culture est donnée au tableau 2.
- Stériliser le milieu par filtration sous un vide d'au plus 50,7 kPa (380 mm de Hg) à l'aide d'un dispositif stérile et d'une membrane de 0,22 µm. Le milieu de culture stérilisé est ensuite placé dans des fioles stériles munies de bouchons stériles et peut se conserver 6 mois à 4 °C et à l'obscurité.

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

Macroéléments	Concentration (mg/l)	Éléments	Concentration (mg/l)
NaNO ₃	25,5	N	4,20
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	12,2	Mg	2,91
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	4,40	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

Microéléments	Concentration (µg/l)	Éléments	Concentration (µg/l)
H ₃ BO ₃	186	B	32,5
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	416	Mn	115
ZnCl ₂	3,28	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

6.2.3 Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour géloses

Un milieu BBM (Bold's Basal Medium) stérile et sans ajout de vitamines doit être utilisé pour les géloses. Les géloses peuvent être achetées dans le commerce, ou fabriquées au laboratoire à l'aide de milieux achetés dans le commerce ou préparés au laboratoire. La composition du milieu utilisé pour le repiquage sur gélose est présentée aux tableaux 3 et 4.

Tableau 3. Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures sur géloses

Solutions éléments nutritifs	Composés	Quantité préparée dans l'eau ultrapure
1	KH ₂ PO ₄	8,75 g/500 ml
2	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	1,25 g/500 ml
3	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	3,75 g/500 ml
4	NaNO ₃	12,5 g/500 ml
5	K ₂ HPO ₄	3,75 g/500 ml
6	NaCl	1,25 g/500 ml
7	Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O KOH	10 g/l 6,2 g/l
8	FeSO ₄ • 7 H ₂ O H ₂ SO ₄ concentré	4,98 g/l 1 ml/l
9	Métaux traces	Voir le tableau 4
10	H ₃ BO ₃	5,75 g/500 ml

Tableau 4. Solution concentrée d'éléments traces (n° 9) pour le maintien des cultures sur géloses

Composés	Quantité préparée dans l'eau ultrapure en g/l
Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	5,53
H ₃ BO ₃	3,80
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ • 6 H ₂ O	2,34
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	0,16
MnSO ₄ • H ₂ O	0,635
ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0,073
CoSO ₄ • 7 H ₂ O	0,016

Les solutions concentrées d'éléments nutritifs doivent être maintenues stériles et conservées à 4 °C et à l'obscurité pendant une période maximale d'un an, à l'exception de la solution 9 (tableau 4), qui est conservée pour une période maximale de 6 mois.

6.2.4 Milieu pour culture sur gélose

- Ajouter 10 ml des solutions 1 à 6, 1 ml des solutions 7 à 9 et 0,7 ml de la solution 10 du tableau 3 à approximativement 900 ml d'eau ultrapure en agitant légèrement entre chaque ajout.
- Compléter le volume à 1 litre et ajuster le pH du milieu final à $6,8 \pm 0,2$ avec une solution de NaOH à 1 N ou de HCl à 1 N.

- Ajouter 15 g/l d'agar au milieu de culture reconstitué et faire chauffer sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète. Autoclaver pendant 15 minutes à 121 °C et 1,06-1,20 kg/cm².
- Verser en asepsie dans des contenants appropriés (tube de verre ou boîte de Petri), couvrir partiellement et laisser refroidir.

Les géloses stériles sont conservées à 4 °C et à l'obscurité pour une période maximale de 6 mois, dans la mesure où aucune trace de dessèchement ou de contamination n'est visible.

6.3 Solutions

6.3.1 Solution isotonique

La solution isotonique peut être achetée dans le commerce ou préparée comme suit dans l'eau ultrapure :

- a) NaCl 9,5 g/l;
- b) Stériliser par filtration sur membrane de 0,22 µm.

Cette solution se conserve à la température ambiante et à l'obscurité. Il est recommandé de filtrer à nouveau la solution avant utilisation pour limiter la présence de particules.

6.4 Toxique de référence

Différents produits peuvent être utilisés comme toxique de référence pour l'essai d'inhibition de la croissance avec l'algue, tels que le sulfate de cuivre, le sulfate de zinc ou le phénol.

7. Organismes biologiques

7.1 Espèces et souches

L'organisme utilisé est l'algue verte unicellulaire d'eau douce *Raphidocelis subcapitata* (anciennement connue sous l'appellation *Pseudokirchneriella subcapitata*), obtenue et certifiée par la Canadian Phycological Culture Collection (CPCC) ou par un organisme de certification équivalent.

La culture « de départ » certifiée peut être entreposée à 4 °C et elle demeure viable pour au moins 6 mois. Il faut renouveler la culture « de départ » après 12 mois.

Les algues doivent être en phase exponentielle de croissance lorsqu'elles sont âgées entre 3 et 7 jours.

7.2 Méthode de culture

L'annexe 1 présente de façon schématisée la procédure de repiquages successifs détaillée plus bas. Les manipulations se font en conditions aseptiques.

7.2.1 Cultures mères liquides

Les cultures mères liquides sont utilisées pour produire des cultures filles liquides qui serviront à la préparation des inoculum pour le départ des essais de toxicité. Les cultures mères liquides sont démarrées au minimum tous les 2 mois. Il est recommandé de planifier le démarrage au moins 2 semaines avant l'échéance des cultures filles actives afin d'avoir en permanence une culture en phase exponentielle de croissance.

- À partir d'une culture « de départ » (souche certifiée, gélose ou liquide) **ou d'une gélose produite au laboratoire (cf. 7.2.2)**, prélever un inoculum à l'aide d'un fil à boucle et transférer dans un erlenmeyer de 500 ml (ou dans un contenant de verre équivalent) contenant **90 ml** du milieu de culture liquide stérile (cf. 6.2.2.).
- Incuber cette culture à $24,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ avec agitation² sous un éclairage continu d'une intensité de $4\,300\text{ lux} \pm 10\%$ ($58\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1} \pm 10\%$), provenant de fluorescents de type « Cool White » **(ou d'un éclairage DEL équivalent)** jusqu'à l'atteinte de la phase exponentielle de croissance. **Cette phase exponentielle devrait être atteinte avant 7 jours.**

7.2.2 Cultures filles liquides

La première culture fille liquide **d'une série de repiquages origine du repiquage d'une culture mère liquide en phase exponentielle de croissance**. Les cultures filles liquides suivantes sont produites par repiquages successifs à partir de la culture fille active en phase exponentielle **(âgée entre 3 et 7 jours)**. Le repiquage successif est actif pour une période maximale de 2 mois après le premier repiquage de la culture mère liquide.

- Pour la première culture fille liquide, prélever 1 ml de la culture mère liquide en phase exponentielle et la transférer dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 90 ml de milieu de culture liquide stérile (cf. 6.2.2.).
- Incuber à $24,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ avec agitation² sous un éclairage continu d'une intensité de $4\,300\text{ lux} \pm 10\%$ ($58\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1} \pm 10\%$), provenant de fluorescents de type « Cool White » **(ou d'un éclairage DEL équivalent)**.
- L'absence de contamination de la première culture fille est démontrée via l'analyse des **bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA)**, **idéalement à 20 °C sur 7 jours**, et par une observation microscopique.
- La première culture fille en phase exponentielle est repiquée sur gélose (cf. 6.2.3) **à l'aide d'un fil à boucle, pour ensuite être ensemencée par épuisement de façon à obtenir des colonies isolées**. La gélose est incubée dans les mêmes conditions que les cultures liquides, jusqu'à la formation de colonies algales. Elle est conservée à 4 °C et à l'obscurité pour **un maximum de 6 mois, dans la mesure où aucune trace de dessèchement ou de contamination n'est visible**.
- Les cultures filles **liquides subséquentes** sont repiquées **puis incubées de la même façon**, une ou deux fois par semaine de façon à disposer, selon le besoin, de cultures en phase exponentielle pour les inoculum servant au départ des essais de toxicité.
- Après 4 semaines de repiquages **successifs**, l'analyse des BHAA et l'observation microscopique sont faites de nouveau sur la culture fille liquide active pour confirmer l'absence de contamination.

² Une agitation orbitale automatique en continu ou manuelle deux fois par jour assure une croissance adéquate des algues.

- La performance de la culture d'algues est évaluée tous les 3 mois en déterminant la courbe de croissance sur une période de 8 à 10 jours. Un volume de culture fille d'algues de 1 ml en phase exponentielle est inoculé dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 90 ml de milieu de culture. La culture est incubée selon les conditions citées plus haut. La phase exponentielle **doit** se situer entre 3 et 7 jours et le plateau devrait être atteint entre 8 et 10 jours.

8. Protocole d'analyse

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie (DR-12-SCA-03)* sont suivies pour s'assurer d'une fréquence d'insertion adéquate en ce qui concerne les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité (groupe contrôle, toxique de référence, etc.). Tous ces éléments d'assurance et de contrôle de la qualité suivent les mêmes étapes du protocole analytique que les échantillons.

8.1 Préparation des échantillons

Avant le début de l'essai, l'échantillon doit être filtré sur une membrane à pores de 0,45 µm **préconditionnée**³. 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 pour éliminer tous les organismes planctonivores, ainsi que les éventuelles interférences qui peuvent nuire à l'utilisation de la technique de comptage au compteur de particules. **Après la filtration, le pH, l'oxygène dissous et la conductivité sont mesurés et notés pour aider à l'éventuelle interprétation des résultats.**

Aucun ajustement de pH n'est effectué sur l'échantillon. Cependant, si le pH est inférieur à 6,5 ou supérieur à 8,5, un essai 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.

À la suite de la filtration, un ajout d'éléments nutritifs doit être effectué dans l'échantillon non dilué pour éviter toute inhibition de croissance qui serait liée à une carence d'azote ou de phosphore. Cet ajout se fait en introduisant du milieu d'enrichissement **frais** dans l'échantillon (cf. 8.1.1).

Après l'ajout du milieu d'enrichissement et avant le début de l'essai, la température de l'échantillon doit être ajustée à 24,0 °C ± 2,0 °C, **puis** la température, le pH **et** la conductivité sont mesurés et notés **de nouveau**.

8.1.1 Milieu d'enrichissement

Afin d'éliminer toute possibilité d'inhibition de croissance causée par une carence en éléments nutritifs, un milieu d'enrichissement est préparé à partir de solutions concentrées d'éléments nutritifs sans EDTA. Ce milieu d'enrichissement est utilisé pour l'échantillon et pour la préparation de l'eau de dilution (cf. 8.1.2). 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. **Le milieu d'enrichissement doit toujours représenter 1 % du volume de la solution finale.**

³ La membrane est rincée avec un petit volume d'échantillon. Le filtrat, avant d'être jeté, sert aussi à conditionner le récipient qui recueillera l'échantillon filtré qui servira à l'essai. Cette exigence ne s'applique pas aux essais sur des substances chimiques.

Le milieu d'enrichissement est préparé comme suit :

- Ajouter 6,25 ml des solutions mères du tableau 1 (1, 2, 3, 4B, 5, 6A et 7) à environ 40 ml d'eau ultrapure. Agiter entre chaque ajout puis jauger à 100 ml.
- Ajouter 10 ml de cette solution à 990 ml d'échantillon (volume final de 1 litre). Cette solution est fraîchement préparée chaque jour où des essais sont mis en route.

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

Tableau 5. Concentrations finales des macroéléments et des microéléments dans les récipients d'essai

Macroéléments	Concentration (mg/l)	Éléments	Concentration (mg/l)
NaNO ₃	15,9	N	2,63
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	7,60	Mg	1,81
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	2,76	Ca	0,75
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	9,19	S	1,19
K ₂ HPO ₄	0,65	P	0,12
NaHCO ₃	9,38	Na	6,88
		K	0,29
		C	1,34

Microéléments	Concentration (µg/l)	Éléments	Concentration (µg/l)
H ₃ BO ₃	116	B	20,3
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	260	Mn	71,9
ZnCl ₂	2,04	Zn	0,98
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0,89	Co	0,22
CuCl ₂ • 2 H ₂ O	0,008	Cu	0,0025
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	4,54	Mo	1,80
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	100	Fe	20,7

8.1.1.1. Milieu d'enrichissement enrichi en phosphore

Pour les effluents industriels ayant un traitement biologique, les effluents municipaux ou tout autre échantillon contenant de fortes concentrations en phosphore, ce nutriment peut masquer une toxicité en induisant un effet de stimulation de la croissance des algues. Pour remédier à cette situation et révéler un effet d'inhibition caché, l'ajout d'un milieu d'enrichissement enrichi en phosphore peut être fait dans l'échantillon non dilué et l'eau de dilution. Cet ajout s'effectue en préparant une solution de milieu d'enrichissement comme il a été mentionné précédemment (cf. 8.1.1), mais en remplaçant la solution 6A par la solution 6B du tableau 1. Ce milieu d'enrichissement sera utilisé tant pour l'eau de dilution que pour l'échantillon. La concentration finale sera alors de 10 mg/l de phosphore dans les récipients d'essai.

8.1.2 Eau de dilution

- Ajouter 10 ml du milieu d'enrichissement à 990 ml d'eau ultrapure (volume final de 1 litre). La concentration finale en macroéléments et microéléments est présentée au tableau 5.
- Agiter adéquatement.

8.1.3 Préparation de l'inoculum

L'inoculum d'algues est préparé au maximum 2 à 3 heures avant le début de l'essai à partir d'une culture fille liquide (cf. 7.2.2) âgées entre 3 et 7 jours (en phase exponentielle de croissance). La culture doit avoir une couleur verte 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 récipients d'essai.

- Centrifuger entre 15 et 40 ml (selon la densité cellulaire) de la culture à 2 000 g pendant 15 minutes.
- Retirer le surnageant et remettre en suspension les cellules dans le même volume d'eau de dilution (cf. 8.1.2) qu'au point précédent.
- Répéter une deuxième fois les étapes de centrifugation et de retrait du surnageant et remettre en suspension les cellules, toujours dans le même volume d'eau de dilution.
- Faire un compte cellulaire de la suspension d'algues ainsi obtenue pour déterminer sa densité (cf. 8.4.6).
- Diluer la suspension d'algues avec de l'eau de dilution afin d'obtenir un inoculum d'une densité cellulaire de 400 000 cellules/ml et vérifier la densité par un décompte cellulaire.
- Calculer le volume (ml) d'inoculum requis de la façon suivante :

$$\text{Volume d'inoculum requis (ml)} = \frac{\text{Nombre de récipients qui seront utilisés} \times \text{Volume de solution par récipient} \times 10\,000 \text{ cell./ml}}{\text{Densité cellulaire (cell./ml) de l'inoculum}}$$

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

8.2 Conditions d'essai

Tableau 6. Résumé des conditions d'essai

1. Type d'essai :	Statique
2. Température :	24,0 °C $\pm$ 2,0 °C
3. Type d'éclairage :	Fluorescent de type « Cool White » (ou éclairage DEL équivalent)
4. Intensité lumineuse :	4 300 lux $\pm$ 10 % (58 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \pm 10 \%$)
5. Photopériode :	Continue
6. Dimension des récipients :	20 ml
7. Volume de solution :	10 ml
8. Densité cellulaire initiale :	10 000 cellules/ml ($\pm 10 \%$)
9. Nombre de répliqua par concentration et pour le contrôle :	3
10. Âge des algues de l'inoculum :	De 3 à 7 jours (en phase exponentielle de croissance)
11. Agitation :	Oui

12. Eau de dilution :	Milieu de culture modifié sans EDTA
13. Nombre de concentrations :	De 7 à 12 , plus le contrôle
14. Facteur de dilution :	Entre 0,5 et 0,8
15. Durée de l'essai :	96 heures ± 2 heures
16. Effet mesuré :	Croissance (compte cellulaire)
17. Expression des résultats :	Cl ₂₅ 96 h et Cl ₅₀ 96 h
18. Acceptabilité de l'essai :	Densité cellulaire des contrôles à l'intérieur de $\pm 2S$ de la moyenne historique; variabilité des contrôles égale ou inférieure à 20 %; toxique de référence à l'intérieur de $\pm 2S$
19. Volume d'échantillon :	500 ml

8.3 Sélection des concentrations d'essai

La gamme de dilutions doit permettre la détermination de la Cl₂₅ 96 h et de la Cl₅₀ 96 h. **Une série de sept concentrations doit minimalement être effectuée en plus du contrôle. Toutefois, il est recommandé d'en effectuer davantage (jusqu'à 10 ou 12 au besoin).** Différents facteurs de dilution peuvent être adéquats, mais le facteur de 0,5 fréquemment appliqué entraîne souvent une gamme de dilutions trop étendue pour obtenir une bonne progression dans les réponses d'inhibition. Une gamme de dilutions plus serrée est recommandée pour obtenir une bonne détermination des paramètres de mesure.

8.4 Réalisation de l'essai

8.4.1 Préparation des dilutions

- Préparer le milieu d'enrichissement et l'eau de dilution conformément aux sections 8.1.1 et 8.1.2.
- Agiter l'échantillon qui a été préparé conformément 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 récipients de façon à assurer la traçabilité des résultats.
- Transférer 9,75 ml de chaque dilution dans chacun des trois récipients (triplicata pour chaque concentration). Pour trois concentrations (une faible, une moyenne et une élevée) et le contrôle, préparer un récipient supplémentaire contenant du milieu d'essai pour le suivi des conditions physico-chimiques au départ de l'essai.

8.4.2 Préparation des contrôles

- Un groupe contrôle est préparé en triplicata en transférant 9,75 ml d'eau de dilution dans trois récipients.
- Les récipients d'essai sont recouverts pour limiter l'évaporation sans toutefois être scellés complètement. **Des couvercles troués permettent généralement un bon échange gazeux tout en limitant l'évaporation.**

8.4.3 Départ de l'essai

- Avant d'inoculer les récipients, il faut s'assurer que leur contenu est à la même température que l'inoculum, soit $24,0\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$.
- Ajouter 0,25 ml d'inoculum contenant 400 000 cell./ml dans chaque récipient et couvrir les récipients. Le volume final est de 10 ml.
- Les récipients sont disposés sur un plateau pour l'incubation. Il est primordial de s'assurer de l'uniformité de la luminosité et de la température dans l'unité d'incubation. Il est souhaitable de disposer les récipients de façon aléatoire. Toutefois, ce n'est pas nécessaire s'il est démontré qu'il n'y a pas de différence de compte cellulaire entre les récipients en fonction de leur positionnement.
- Les récipients sont agités en cours d'essai, idéalement à l'aide d'un agitateur orbital, afin d'éviter la sédimentation des algues et de permettre une croissance adéquate.
- Incuber les récipients d'essai dans une chambre environnementale selon les conditions précisées au tableau 6.

8.4.4 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.

8.4.5 Fin de l'essai

L'essai se termine 96 heures (**± 2 heures**) après l'inoculation. La densité algale dans chacun des récipients est mesurée par un compte cellulaire.

8.4.6 Compte cellulaire

Le compte cellulaire est effectué à l'aide d'un compteur électronique de particules (**ou d'un appareil de comptage cellulaire équivalent**). Une « cellule » d'un diamètre d'ouverture de 70 μm est recommandée. **La procédure décrite plus bas peut être adaptée selon le compteur de particules ou de cellules utilisé.**

- Préparer la solution isotonique telle que décrite à la section 6.3.1.
- Ajouter 19 ml de solution isotonique dans autant de cuvettes de comptage qu'il y a de comptes à faire. Identifier les cuvettes.
- Bien homogénéiser le contenu des récipients d'essai en brassant vigoureusement. Retirer 1 ml de son contenu et le mettre dans la cuvette de comptage correspondante contenant la solution isotonique.
- Effectuer les comptes cellulaires en commençant **par le groupe contrôle afin d'en vérifier la validité.**
- Effectuer un rinçage avec de la solution isotonique propre avant de poursuivre avec les lectures de l'échantillon.

- Effectuer un rinçage avec de la solution isotonique propre entre chaque concentration.
- Généralement, une fenêtre de lecture de 2 à 7 µm est adéquate pour le compte cellulaire.

8.5 Essai avec toxique de référence

Des essais avec toxique de référence doivent être effectués **au moins** deux fois par mois ou une fois par **semaine**, si le laboratoire effectue plus de 10 analyses par deux semaines. **Toutefois, lors de la saison creuse ou si le laboratoire effectue peu d'analyses** (moins d'une analyse par deux semaines), un essai avec toxique de référence par série d'essais est **acceptable**. **Dans ce cas, l'essai avec toxique de référence doit être démarré avec le même lot d'organismes**. Les résultats issus de ces essais sont compilés sous la forme d'un diagramme de contrôle.

Des limites de contrôle inférieures (- 2S et - 3S) et supérieures (+ 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 %) **par le simple fait du hasard**. Un résultat se situant à l'extérieur des limites de $\pm 3S$ doit faire l'objet d'une investigation et les essais qui y sont associés sont rejetés.

Concernant la variation acceptable des résultats, celle-ci peut être en partie dépendante du type de produit utilisé comme toxique de référence. Il importe toutefois de veiller à ce que la variation soit acceptable et permette d'identifier les problèmes de sensibilité éventuelle de l'organisme. Un coefficient de variation d'au plus 30 % est souhaitable. Pour plus de détails, il est recommandé de consulter la section 2.8 du *Document d'orientation sur les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité* produit par Environnement Canada (EC, 2005) et la section 5 du *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence* également produit par Environnement Canada (EC, 1990).

De plus, le laboratoire doit être attentif aux tendances lors de l'étude de ses diagrammes de contrôle. La détection précoce d'une tendance permettrait d'éviter la production de données aberrantes. Une tendance se définit comme la présence, du même côté de la ligne de la moyenne, de cinq points consécutifs ou plus (EC, 1990). Après la détection d'une tendance, une investigation devrait être menée pour en trouver la cause.

9. Calcul et expression des résultats

9.1 Détermination des Cl_p

Lorsque l'inhibition est supérieure à 25 % dans un essai de toxicité, une analyse statistique est effectuée. Les Cl_p (Cl_{25} 96 h et Cl_{50} 96 h) 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 Cl_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 réponse biologique en fonction du logarithme de la concentration (relation dose-réponse). Les principaux modèles 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 statistiques applicables aux essais d'écotoxicité* produit par Environnement Canada (EC, 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 selon un modèle déterminé. Elle présente l'avantage de s'accommoder d'une grande variété de données et permet le calcul de n'importe quelle Cl_p entre 1 et 99. **Cependant, elle devrait être utilisée en dernier recours, lorsqu'aucun modèle de régression ne convient aux données.**

Les Cl_p déterminées par extrapolation ne sont pas acceptables et doivent plutôt être rapportées comme suit : ex. : Cl_{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 répliqua, etc.).

9.2 Détermination du 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 Cl_{25} 96 h et de la Cl_{50} 96 h sont exprimés comme suit avec leur intervalle de confiance à 95 %. Les résultats en pourcentage (% V/V) sont également exprimés en unités toxiques chroniques (UT_c) pour les effluents, soit $100/Cl_{25}$:

- en pourcentage (% V/V);
- pour les produits purs, en P/V.

10. Critères d'acceptabilité

Les critères d'acceptabilité sont définis dans le document [DR-12-SCA-03](#) et appliqués comme suit :

Élément de contrôle	Critères d'acceptabilité
Acceptabilité des groupes de contrôle	La variation entre les répliqua du groupe contrôle d'un essai est égale ou inférieure à 20 %. La densité cellulaire algale moyenne dans les récipients des contrôles, à la fin de l'essai, se situe à l'intérieur des limites de $\pm 2S$ de la moyenne historique des densités cellulaires des contrôles⁴. La densité cellulaire moyenne des contrôles devrait être d'au moins $1,0 \times 10^6$ cell./ml (pour les contrôles réguliers, sans phosphore ajouté). Le coefficient de variation des comptes cellulaires historiques ne devrait pas excéder 25 %.
Conformité du résultat de l'essai avec toxique de référence	Les résultats de l'essai avec toxique de référence effectué selon la fréquence requise se situent à l'intérieur des limites de $\pm 2S$ du diagramme de contrôle. 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.
Qualité de la relation concentration-réponse	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 solution lorsque possible. Toutefois, certains types de contaminants peuvent entraîner une relation concentrations-réponses où, à très faible concentration, l'échantillon provoque une stimulation (hormèse), laquelle est suivie d'une inhibition lorsque la concentration augmente.
État de santé et de conformité de l'organisme	Absence de contamination bactérienne. La culture fille utilisée pour générer l'inoculum doit être en phase de croissance exponentielle entre 3 et 7 jours. La courbe de croissance est vérifiée aux 3 mois (4 fois/an).
Respect des conditions d'essai	Température, luminosité et autres paramètres à l'intérieur des exigences de la méthode.

⁴ 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. L'essai avec phosphore ajouté (cf. 8.1.1.1) doit posséder son propre diagramme de contrôle pour la densité cellulaire moyenne des contrôles.

11. Références bibliographiques

NOTE - Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Lignes directrices concernant les travaux analytiques en toxicologie, DR-12-SCA-03
http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA03_lignes_dir_toxico.pdf

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

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.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT, DE LA LUTTE CONTRE LES CHANGEMENTS CLIMATIQUES, DE LA FAUNE ET DES PARCS. Guides d'échantillonnage à des fins d'analyses environnementales, <https://www.ceaeq.gouv.qc.ca/documents/publications/echantillonnage.htm>

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, 4th édition, Washington, DC, 2002.

Annexe 1. Schématisation de la séquence de repiquage

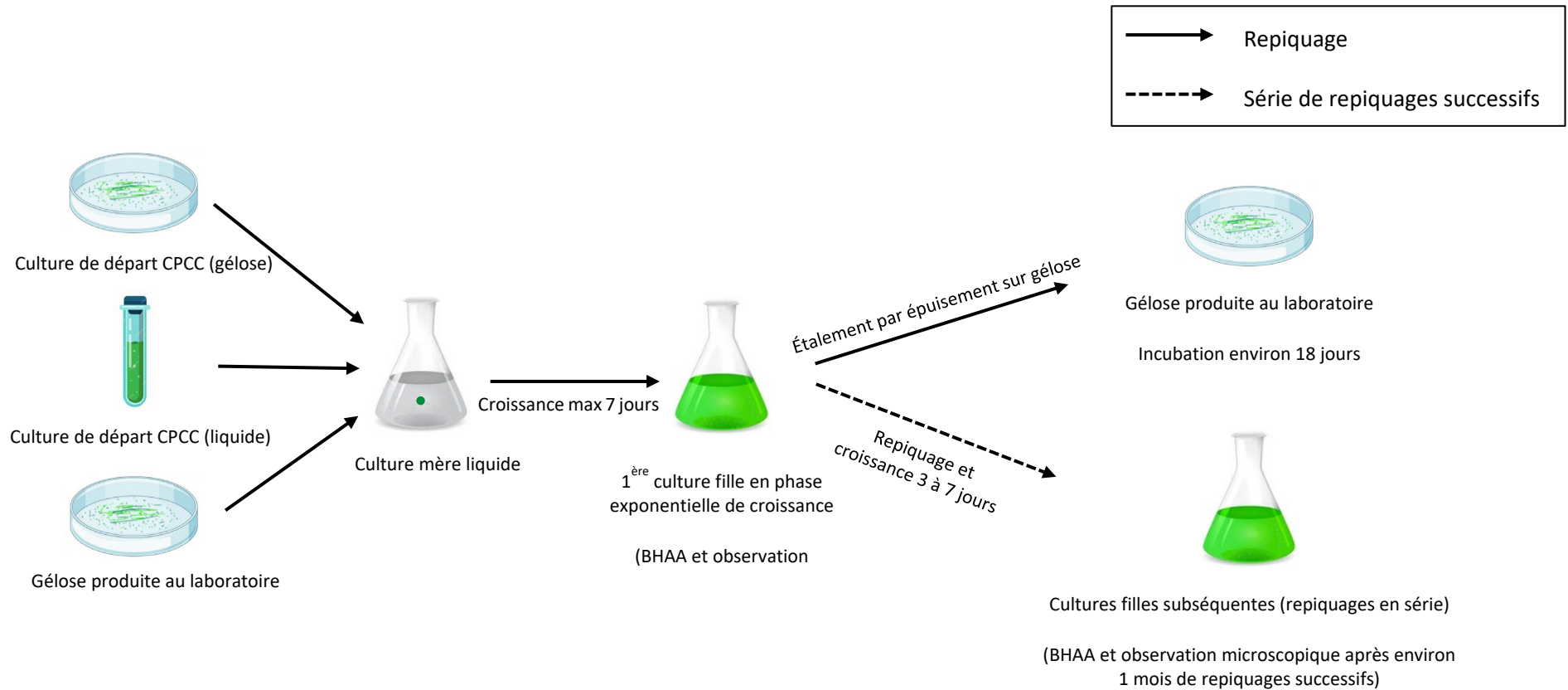


Illustration créée à l'aide de BioRender.com



**Environnement,
Lutte contre
les changements
climatiques,
Faune et Parcs**

Québec 