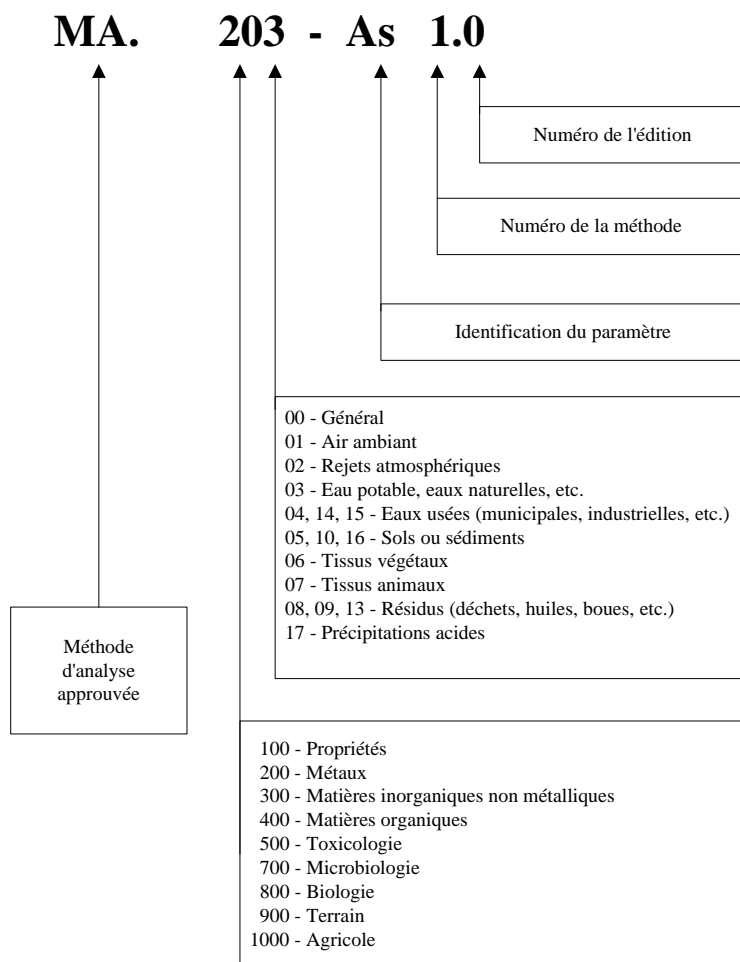


MA. 500 – P.sub 1.0
Édition : 2005-06-01
Révision : 2007-09-18 (1)

Méthode d'analyse

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

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

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. 1, Ministère du
Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2007, 25 p.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	6
3.1. Interférences	6
3.2. Seuil d'effet de la méthode	6
3.3. Fidélité	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	7
4.1. Prélèvement	7
4.2. Conservation	7
5. APPAREILLAGE ET ÉQUIPEMENTS	8
6. RÉACTIFS ET MILIEU DE CULTURE	9
6.1. Réactifs	9
6.2. Milieu de culture	10
6.3. Solution isotonique	12
6.4. Toxique de référence	12
7. ORGANISMES BIOLOGIQUES	12
7.1. Espèces et souche	12
7.2. Méthode de culture	13
8. PROTOCOLE ANALYTIQUE	14
8.1. Préparation de l'échantillon	14
8.2. Milieu d'enrichissement	14
8.3. Eau de dilution	15
8.4. Préparation de l'inoculum	15
8.5. Conditions du test	16
8.6. Choix des dilutions	17
8.7. Essai préliminaire	17
8.8. Essai définitif	18
8.9. Essai avec toxique de référence	20
8.10. Acceptabilité des résultats	20

9.	CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	21
9.1.	Détermination des CI_p et des CSEO-CMEO	21
9.2.	Détermination de pourcentage de stimulation (% S)	22
9.3.	Expression des résultats	22
10.	VOCABULAIRE	22
11.	BIBLIOGRAPHIE	23
	ANNEXE 1 - FEUILLE DE TRAVAIL « INHIBITION DE LA CROISSANCE AVEC L'ALGUE <i>PSEUDOKIRCHNERIELLA</i> »	25

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures concentrées d'algues	10
Tableau 2 :	Concentrations finales des macroéléments et des microéléments dans le milieu de culture	11
Tableau 3 :	Solutions concentrées d'éléments nutritifs pour le maintien des cultures gélosées	11
Tableau 4 :	Solutions concentrées d'éléments traces pour le maintien des cultures gélosées	12
Tableau 5 :	Concentrations finales des macroéléments et des microéléments dans les cuvettes à essai	15
Tableau 6 :	Résumé des conditions d'essai	16

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.

Ce test de toxicité est très utilisé en Amérique du Nord. Le présent protocole est basé sur le test USEPA (1989; 2002) et a été modifié avantageusement de façon à réduire le niveau d'effort en éliminant le lavage de la verrerie et en réduisant les manipulations. Cet essai présente une bonne fiabilité et une grande sensibilité, à un faible coût.

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.

Le test de toxicité avec *Pseudokirchneriella subcapitata* est utilisé au Québec pour le suivi de la toxicité des effluents industriels.

Ce test 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 CI₁₅ peut également être calculée et elle représente le seuil d'effet de la méthode; 15 % d'inhibition est la plus petite valeur d'inhibition significativement détectable. La CI₁₅ peut être utilisée comme alternative préférable à la CSEO (concentration sans effet observable). La CI₅₀ est également calculée.

Toutefois, la CSEO et la CMEO (concentration minimale causant un effet observable) peuvent être déterminées mais certaines restrictions s'appliquent (*cf.* 8.6).

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

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 (azote et phosphore) peut masquer la toxicité et causer une stimulation de la croissance algale.

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.

3.2. SEUIL D'EFFET DE LA MÉTHODE

Le seuil d'effet est le niveau d'inhibition le plus faible qui peut être détecté et qui est significativement différent des groupes contrôles pour un niveau de confiance donné. Il varie selon l'espèce utilisée, la réponse biologique mesurée et le schéma expérimental (nombre de réplicats, durée d'exposition, etc.). Il correspond à la limite de détection (statistique) de la méthode et est basé sur la variabilité des réponses dans les groupes contrôles (Thellen *et al.* 1988).

Il se calcule comme suit :

$$\frac{S_x t}{Moy.} \times 100$$

Où S_x est l'écart type de n valeurs de contrôle recueillies la même journée et exprimées en densité cellulaire, et t est la valeur de la table de Student pour $n-1$ degrés de liberté et $\alpha = 0,05$. Le seuil d'effet doit être déterminé à plusieurs reprises sur des jours différents et une période de temps suffisamment longue, de façon à obtenir un seuil d'effet représentatif de la méthode. La valeur de n doit être égale ou supérieure à 10. Une valeur de n se situant entre 10 et 20 apparaît optimale, puisque la valeur de t diminue rapidement quand l'effectif s'accroît entre 2 et 20 et plus particulièrement entre 2 et 10. Au-delà de 20, la valeur de t ne diminue que très lentement.

Pour l'essai avec *Pseudokirchneriella subcapitata*, le seuil d'effet tel que défini pour une valeur $\alpha = 0,05$ a été déterminé à 13 % d'inhibition, à partir de 24 séries de données de contrôles issues de jours/test différents.

Le seuil d'effet doit être documenté de façon à bien connaître le niveau de signification des réponses d'inhibition. Une CI correspondante au niveau du seuil (ou arrondie) (ex. : CI_{15}) peut être calculée et peut être utilisée en remplacement de la CSEO (NOEC). Il est important de mentionner que le seuil calculé représente un niveau de signification statistique dans des conditions standardisées et ne doit pas être confondu avec un seuil de signification écologique, lequel pourrait le cas échéant être plus faible ou plus élevé. Ce qui est d'ailleurs également vrai

pour la CSEO. Le seuil d'effet devrait être rapporté comme un élément de validation de la méthode. À noter que le paramètre de mesure utilisé dans un contexte réglementaire ou autre peut être différent du seuil d'effet (ex. : CI₂₅).

3.3. FIDÉLITÉ

La fidélité de la méthode d'analyse est déterminée en effectuant de façon régulière des essais avec un toxique de référence.

3.3.1. Répétabilité

La répétabilité d'une série de mesures (n = 23) avec le toxique de référence chlorophénols-acides résiniques a été de : moyenne = 1,25 mg/l ± 0,098 pour la CI₂₅.

La répétabilité d'une série de mesures (n = 23) avec le même toxique de référence a été de : moyenne : 1,55 mg/l ± 0,115 pour la CI₅₀.

3.3.2. Reproductibilité

La reproductibilité globale de 12 séries de mesures (n = 3 ou 4 par série) issues de six études interlaboratoires distinctes pour le toxique de référence chlorophénols-acides résiniques a été de : moyenne : 0,89 mg/l ± 0,14 pour la CI₂₅.

Les données des différentes études ont été regroupées étant donné le faible nombre de laboratoires participants (3 ou 4 selon le cas).

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 se situant entre 1 et 8 °C dans une glacière pendant le transport. L'échantillon doit être acheminé au laboratoire dans le plus court délai possible (< 24 heures) et conserver à 4 °C si l'essai n'est pas démarré immédiatement. 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	MgCl ₂ •6 H ₂ O	6,08 g
3	CaCl ₂ •2 H ₂ O	2,20 g
4	H ₃ BO ₃ MnCl ₂ •4 H ₂ O ZnCl ₂ FeCl ₃ •6 H ₂ O CoCl ₂ •6 H ₂ O Na ₂ MoO ₄ •2 H ₂ O CuCl ₂ •2 H ₂ O Na ₂ EDTA•2 H ₂ 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	MgSO ₄ •7 H ₂ O	7,35 g
6	K ₂ HPO 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 micro-éléments 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 deux mois à 4°C et à l'obscurité.

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 un milieu Bold Basal (Stein, 1973) modifié par Judy Acreman (University of Toronto Culture Collection).

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 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	EDTA + KOH	10 et 6,2 g/l
8	FeSO ₄ •7H ₂ O + H ₂ SO ₄	4,98 g/l 1 ml/l
9	Métaux traces	Voir tableau 4
10	H ₃ BO 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	Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	5,53
2	H ₃ BO ₃	3,80
3	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) • 6H ₂ O	2,34
4	FeCl ₃ • 6H ₂ O	0,16
5	MnSO ₄ • H ₂ O	0,635
6	ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,073
7	CoSO ₄ • 7H ₂ 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 six semaines.

6.3. SOLUTION ISOTONIQUE

Préparer comme suit dans l'eau ultrapure :

- NaCl 10 g/l
- NaN₃ 1 g/l
- Filtration sur filtre 0,22 µm

L'azoture de sodium est ajouté à titre de bactéricide. 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*. Identification taxinomique certifiée par Judy Acreman UTCC (University of Toronto Culture Collection of algal and cyanobacteria).

Les algues doivent être en phase logarithmique de croissance âgées entre 4 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 l'UTCC 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 de 7 à 14 jours jusqu'à l'atteinte de la phase exponentielle de croissance. La culture de départ de l'UTCC 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 de colonies isolées sur la 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, 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 °C ± 2 °C sous un éclairage continu d'une intensité entre 4 300 lux ± 10 %, provenant de trois fluorescents « Cool White » de 40 watt. Une agitation continue à 100 tours/minute assure une disponibilité adéquate en CO₂ et une bonne homogénéité des organismes dans le milieu.

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 4 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 µm. 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 °C ± 2 °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 échantillons soupçonnés de contenir de fortes concentrations en éléments nutritifs et pouvant masquer la toxicité par un effet de stimulation de la croissance des algues, un ajout de phosphore peut être fait de façon à éviter les fausses réponses négatives. Nous recommandons un ajout de 10,0 mg/l de phosphore qui remplacera 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 K₂HPO₄ dans l'eau ultrapure. Cette solution contient 1 000 mg/l de P. Pour un ajout de 10 mg/l de P, ajouter 100 µl 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 •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

Micro-éléments	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

8.3. 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 4 à 7 jours (en phase logarithmique de croissance).

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. 8.8.6).
- Centrifuger entre 15 et 40 ml (selon la densité initiale) de la culture à 1 000 g pendant 12 minutes.
- Décanter 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 DU TEST

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 %
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 :	4 à 7 jours
11. Agitation :	100 tours/minute
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 CI_{25} 96h et de la CI_{50} 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.

Il est essentiel d'avoir une série de concentrations relativement rapprochées dans la zone située au début de la relation concentration-réponse, particulièrement si le calcul est basé sur un test d'hypothèse (ANOVA). Si le niveau de toxicité de l'échantillon est déjà anticipé, il est d'autant plus facile de déterminer une gamme de dilutions adéquate.

Dans le cas de la détermination de la CSEO et de la CMEO, il faut prendre en considération les points suivants :

- Le calcul de la CSEO et la CMEO est très dépendant du schéma expérimental (nombre de concentrations, nombre de réplicats, etc.) et de la variabilité des réponses dans les contrôles.
- La CSEO et la CMEO sont obligatoirement des concentrations testées.
- Aucun intervalle de confiance ne peut être calculé.

En conséquence, il est donc nécessaire de réduire l'écart entre la CSEO et la CMEO par l'utilisation de concentrations rapprochées. De même, il peut être utile d'augmenter le nombre de réplicats de façon à accroître le pouvoir de discrimination statistique. La plus petite différence significative doit être rapportée avec le résultat. Compte tenu des inconvénients liés à la détermination de la CSEO et de la CMEO, il est fortement recommandé d'utiliser la CI_p en remplacement de la CSEO.

Si la CI_p est calculée par la méthode d'interpolation linéaire (IC_p) il est également important d'obtenir des réponses d'inhibition dans la zone du paramètre de mesure. En effet, cette méthode utilise uniquement les deux réponses d'inhibition qui se situent de part et d'autre du paramètre de mesure recherché. Une gamme de dilutions avec moins de concentrations pourrait convenir à condition que les réponses d'inhibition soient bien étalées, par exemple entre 5 et 80 % d'inhibition (à noter que les résultats extrapolés ne doivent pas être utilisés; voir section 9).

8.7. ESSAI PRÉLIMINAIRE

Dans les cas où le niveau de toxicité de l'échantillon est inconnu, il peut être utile de procéder à un essai préliminaire.

L'essai préliminaire peut être effectué sur 48 heures avec un seul réplicat et une gamme de concentrations étendue (100, 10, 1,0 et 0,1). Étant donné la courte durée d'exposition, un inoculum plus concentré (20 000 cell./ml) est utilisé.

8.8. ESSAI DÉFINITIF

8.8.1. 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.
- 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 le grand 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.

8.8.2. 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.

8.8.3. Départ du test

- 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 et une série de cuvettes remplies d'eau sont disposées autour du groupe de cuvettes tests, de façon à éliminer les effets de bordure causés par des variations d'intensité lumineuse selon la position des cuvettes. 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. L'espace utilisé pour un test avec neuf concentrations et un témoin équivaut à 9 po × 10 po.

- Les cuvettes sont agitées en continue à l'aide d'un agitateur orbital ou de tout autre dispositif adéquat de façon à favoriser les échanges gazeux et à limiter l'augmentation du pH.
- Incuber les cuvettes d'essai dans une chambre environnementale selon les conditions précisées dans le tableau 6.

8.8.4. Observations au début et à la fin du test

Les mesures suivantes doivent être effectuées :

- Le pH est mesuré au début et à la fin du test 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 du test.
- La luminosité dans l'enceinte d'incubation est mesurée au début du test.

Un exemple de feuille de travail pour l'enregistrement des données est présenté à l'annexe 1.

8.8.5. Fin du test

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

8.8.6. Compte cellulaire

Le compte cellulaire est effectué à l'aide d'un compteur de particules (Coulter ou autre). 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 test.

8.9. 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 test 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 %).

8.10. ACCEPTABILITÉ DES RÉSULTATS

Les résultats du test sont acceptables si la densité cellulaire algale dans les cuvettes des contrôles à la fin du test se situe entre les limites de $\pm 2S$ de la moyenne historique des densités cellulaires des contrôles¹. La densité cellulaire moyenne des contrôles devrait se situer entre 2,0 et $2,5 \times 10^6$ cell./ml. Le coefficient de variation de ces 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 concentration-réponse. Les résultats devraient être considérés avec réserve dans les cas où la progression des réponses d'inhibition est erratique. 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 concentration-réponse où à très faible concentration l'échantillon provoque une stimulation (hormesis), laquelle est suivie d'une inhibition lorsque la concentration augmente.

Dans le cas où la CSEO et la CMEO sont calculées, les résultats sont acceptables seulement si l'écart entre ces deux paramètres de mesure est limité par l'usage d'une gamme de dilutions suffisamment serrée pour obtenir une bonne progression des réponses d'inhibition, dans la zone de la relation concentration-réponse située entre 0 et 50 % d'effet.

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

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.

9. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

9.1. DÉTERMINATION DES CI_p ET DES CSEO-CMEO

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. Il est également recommandé de tracer le graphique de la relation du logarithme de la concentration en fonction de la réponse de façon à maximiser l'information sur le comportement de l'échantillon.

Le programme d'interpolation linéaire (IC_p ver. 2.0) de Norberg-King (1993) avec calcul des intervalles de confiance par la méthode Bootstrap peut également être utilisé. 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. Par contre, elle exploite mal la relation concentration-réponse en utilisant uniquement les données d'inhibition qui bornent la CI_p calculée. Cette méthode modifie les données, si nécessaire, de façon à assurer la monotonie. Par exemple, dans les cas où la croissance est plus élevée dans la première concentration que dans le groupe contrôle, la moyenne de ces deux valeurs sera utilisée tant pour le contrôle que pour la première concentration. Toutefois, le jugement doit être de rigueur comme il a été mentionné plus haut car si les données de la relation concentration-réponse sont erratiques, il est préférable de reprendre l'essai.

De plus, dans sa version originale les intervalles de confiance étaient sous-estimés par la méthode Bootstrap dans les cas où le nombre de réplicats était inférieur à six. Une modification a été apportée à la version 2.0 du logiciel, laquelle permet le calcul des intervalles de confiance originaux (pour sept réplicats et plus) et étendus (pour six réplicats et moins). Bien entendu, pour le test avec algues, l'intervalle de confiance étendu doit être utilisé. Il est également important de préciser que cette méthode peut déterminer par extrapolation n'importe quelle CI_p si les réponses d'inhibition qui bornent la CI_p en question n'ont pas été déterminées. Les CI_p déterminées par extrapolation ne sont pas acceptables et doivent plutôt être apportées comme suit, ex. : CI_{25} inférieure à la plus faible concentration testée.

La CSEO et la CMEO peuvent être calculées à l'aide de la procédure de Dunnett. Comme il a été mentionné à la section 8.6, cette méthode est très dépendante de certains facteurs et elle n'est pas recommandée. Toutefois, si elle est utilisée, les résultats de la CSEO et de la CMEO doivent être rapportés avec la plus petite différence significative pouvant être déterminée. Si l'écart entre la CSEO et la CMEO est grand à cause d'une gamme de dilutions trop étendue, le test devrait être repris avec une gamme de dilutions plus serrée dans la zone située au début de la relation concentration-réponse.

Une procédure de régression non linéaire peut également être utilisée pour le calcul des CI_p telle que celle proposée par Bruce et Versteeg (1992) et par Bailer et Oris (1997).

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 CI₂₅ 96 h et de la CI₅₀ 96h sont exprimés comme suit avec leur intervalle de confiance à 95 %. La CSEO et la CMEO sont exprimées de la même façon mais aucun intervalle de confiance ne peut être calculé.

- en pourcentage (% V/V).
- pour les produits purs le résultat est exprimé en P/V.

10. VOCABULAIRE

CI₁₅ : concentration qui inhibe 15 % d'une réponse biologique de type quantitative (croissance, bioluminescence, etc.). Pour le test avec l'algue *Pseudokirchneriella*, la CI₁₅ correspond au seuil d'effet de la méthode.

CI₂₅ : concentration qui inhibe 25 % d'une réponse biologique de type quantitative (croissance, bioluminescence, etc.).

CI₅₀ : 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 test 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. Le seuil d'effet de correspond à la limite de détection du test. 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.

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

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 1998.

BAILER, H.J. et ORIS, J.T., Estimating Inhibition Concentrations for Different Response Scales Using Generalized Linear Models, Env. toxicol. chem. 16 (7): 1554 - 1559, 1997.

BRUCE, R.D. et VERSTEEG, D.J., A Statistical Procedure for Modeling Continuous Toxicity Data, Env. toxicol. chem. 11: 1485 - 1492, 1992.

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

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Méthode d'analyse : Recherche et dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies; 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.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms (Fourth edition). Office of Water. Washington DC. EPA-821-R-02-013. USEPA, 2002.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA), Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Cincinnati, 230 p., USEPA, 1989.

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.

THELLEN, C., R. CARDIN, R. LEMIRE et G. JOUBERT, Application des limites de détection et de quantification pour le contrôle de la qualité de biotests conventionnels (Microtox, algues, daphnies), MENVIQ, 15^e Colloque annuel sur la toxicologie aquatique, Montréal, 1988.

