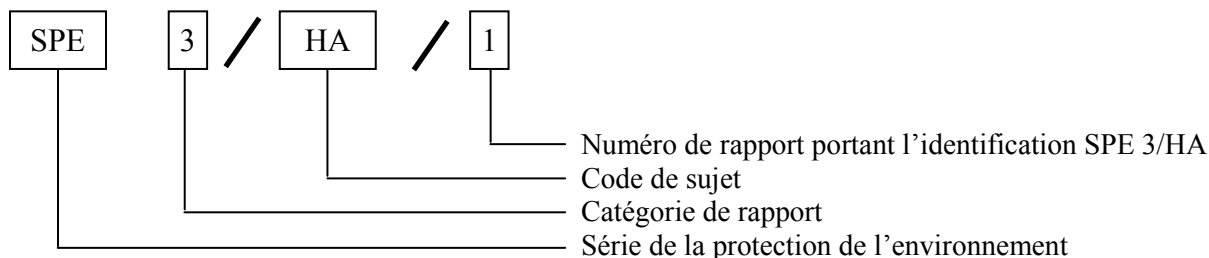


**Méthode d'essai biologique :  
Essai de mesure de l'inhibition  
de la croissance de la plante  
macroscopique dulcicole *Lemna minor***



# SÉRIE DE LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT

## Exemple de numérotation



## Catégories

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

## Sujets

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

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

# **Méthode d'essai biologique : Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole *Lemna minor***

Section de l'élaboration et de l'application des méthodes  
Centre de technologie environnementale  
Environnement Canada  
Ottawa (Ontario)

Rapport SPE 1/RM/37  
Deuxième édition  
Janvier 2007

## Catalogage avant publication de Bibliothèque et Archives Canada

Vedette principale au titre :

Méthode d'essai biologique. Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole *Lemna minor* / Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada. -- 2<sup>e</sup> éd.

(Rapport ; SPE 1/RM/37)

Publ. aussi en anglais sous le titre : Biological test method. Test for measuring the inhibition of growth using the freshwater macrophyte, *Lemna minor*.

Comprend des réf. bibliogr. : p. 56

Comprend un résumé en anglais.

ISBN 0-662-71835-6

N<sup>o</sup> de cat. : En49-7/1-37F

1. Lenticule mineure, Effets de la pollution de l'eau sur la.
2. Lenticule mineure--Croissance--Aspect de l'environnement
3. Toxicité--Méthodologie--Normes--Canada.
4. Eau--Qualité--Essais biologiques.
5. Écotoxicologie.

I. Canada. Environnement Canada

II. Centre de technologie environnementale (Canada). Section de l'élaboration et de l'application des méthodes.

III. Titre : Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole *Lemna minor*

IV. Coll. : Rapport (Canada. Environnement Canada) ; SPE 1/RM/37

QK495.1.52B5014 2007 628.1'61 C2006-980123-1

## Commentaires

---

Adresser les commentaires sur la teneur du présent rapport à :

Richard Scroggins, chef  
Division des méthodes biologiques  
Centre de technologie environnementale  
Environnement Canada  
335, River Road  
Ottawa (Ontario)  
K1A 0H3

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

This report is also available in English from:

Environmental Protection Publications  
Environment Canada  
Ottawa, Ontario  
K1A 0H3

## Avis de révision

---

Le présent document a été révisé par le personnel de la Direction générale de l'avancement des technologies environnementales d'Environnement Canada, et sa publication a été autorisée. La mention d'appellations commerciales ou de produits offerts sur le marché ne constitue ni une recommandation ni une approbation quant à l'emploi de ces produits de la part d'Environnement Canada.



## Résumé

---

*Le présent rapport décrit la méthode d'essai biologique recommandée par Environnement Canada pour les essais toxicologiques mesurant l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique aquatique Lemna minor. Cette deuxième édition de la méthode SPE 1/RM/37 remplace la première édition, publiée en 1999. Elle comporte de nombreuses modifications procédurales, de même que des conseils et des instructions à jour concernant la conduite de la méthode d'essai biologique.*

*L'essai se déroule à  $25 \pm 2$  °C; les récipients d'essai renferment au moins 100 mL de la solution expérimentale et deux plantes à trois thalles. On peut utiliser des concentrations multiples s'il s'agit de déterminer le seuil à partir duquel s'exerce un effet, ou une seule concentration s'il s'agit d'un essai réglementaire à résultat unique (satisfaisant ou non satisfaisant). Au moins trois récipients d'essai de répétition sont utilisés par traitement pour un essai à une seule concentration, et au moins quatre récipients d'essai de répétition par traitement pour un essai à concentrations multiples. Dans le cas d'un essai à concentrations multiples, on peut également avoir recours à un nombre inégal de répétitions par traitement (soit six par traitement pour le ou les témoins, quatre pour chacune des trois à cinq concentrations les plus basses et trois pour chacune des quatre ou cinq concentrations les plus élevées).*

*L'essai peut se dérouler dans des conditions statiques (sans renouvellement de la solution d'essai) ou dans des conditions de renouvellement intermittent. On recommande comme mode opératoire normalisé l'essai en conditions statiques, le renouvellement intermittent étant recommandé quand la concentration de la substance d'essai (ou d'un ingrédient biologiquement actif) risque de diminuer notablement (à >20 %) au cours de l'essai, auquel cas il faut remplacer les solutions au moins tous les trois jours pendant l'essai. Les paramètres à mesurer sont le nombre de thalles et la masse sèche de ces dernières au terme d'un essai toxicologique de 7 jours.*

*Le présent document décrit la méthode de culture de L. minor en laboratoire, de même que les conditions et les modes opératoires généraux ou universels pour mesurer les effets de diverses matières ou substances sur la croissance de cette macrophyte. Le lecteur y trouvera la description des conditions et des modes opératoires propres à la nature des échantillons (substance chimique, effluent, éluviat, lixiviat ou eau réceptrice), de même que des instructions et des exigences sur les éléments suivants : l'appareillage, les installations, la manipulation et l'entreposage des échantillons, la préparation des solutions expérimentales et la mise en route des essais, les conditions précises dans lesquelles se déroulent ces derniers, les observations à faire et les mesures à prendre, les paramètres à mesurer, les méthodes de calcul, la validation des essais, l'emploi de toxiques de référence.*

## Abstract

---

*A biological test method recommended by Environment Canada for performing toxicity tests that measure the inhibition of growth using the aquatic macrophyte, Lemna minor, is described in this report. This second edition of EPS 1/RM/37, published in 2006 supersedes the first edition that was published in 1999. It includes numerous procedural modifications as well as updated guidance and instructions to assist in performing the biological test method.*

*The test is conducted at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  in test vessels containing a minimum of 100 mL of test solution and two, 3-frond plants. The test may be run as a multi-concentration assay to determine the threshold of effect, or with only one concentration as a regulatory or pass/fail test. This test uses  $\geq 3$  replicated test vessels/treatment for a single-concentration test, and  $\geq 4$  replicated test vessels/treatment for a multi-concentration test. A second option for test design in a multi-concentration test includes unequal replicates per treatment (i.e., six per treatment for control(s); four replicates for each of the lowest 3-5 test concentrations; and three replicates for each of the highest 4-5 test concentrations).*

*The test may be performed either as a static (i.e., no renewal) assay or as a static-renewal toxicity test. The static option is recommended as the standard procedure, whereas the static-renewal option is recommended for test solutions where the concentration of the test substance (or a biologically active component) can be expected to decrease significantly (i.e.,  $>20\%$ ) during the test period. If the static-renewal option is chosen, test solutions are replaced at least every three days during the test. The endpoints for the test are frond number and frond dry weight at the end of a 7-day toxicity test.*

*Procedures are given for culturing L. minor in the laboratory. General or universal conditions and procedures are outlined for testing a variety of materials or substances for their effects on Lemna growth. Additional conditions and procedures are stipulated, which are specific for testing samples of chemical, effluent, elutriate, leachate, or receiving water. Instructions and requirements are included on apparatus, facilities, handling and storing samples, preparing test solutions and initiating tests, specific test conditions, appropriate observations and measurements, endpoints, methods of calculation, validation, and the use of reference toxicants.*



## Avant-propos

---

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

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

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

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



## Table des matières

---

Résumé.....	v
Abstract.....	vi
Avant-propos.....	vii
Liste des tableaux.....	xii
Liste des figures.....	xii
Abréviations et formules chimiques.....	xiii
<b>Terminologie.....</b>	<b>xv</b>
Remerciements .....	<b>xxv</b>
 <i>Section 1</i>	
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1 Contexte.....	1
1.2 Description de l'espèce et emplois antérieurs dans les essais.....	3
 <i>Section 2</i>	
<b>Organismes d'essai.....</b>	<b>7</b>
2.1 Espèce et stade .....	7
2.2 Origine .....	7
2.3 Culture.....	8
2.3.1 Généralités .....	8
2.3.2 Installations et <b>appareils</b> .....	11
2.3.3 Milieu de culture.....	12
2.3.4 Éclairage .....	14
2.3.5 Température .....	14
2.3.6 pH.....	14
2.3.7 Entretien des cultures.....	14
2.3.8 Critères de santé .....	15
 <i>Section 3</i>	
<b>Système d'essai.....</b>	<b>17</b>
3.1 Installations et <b>appareils</b> .....	17
3.2 Éclairage .....	17
3.3 Récipients d'essai.....	18
3.4 Eau témoin/de dilution.....	18
 <i>Section 4</i>	
<b>Procédures d'essai universelles.....</b>	<b>20</b>
4.1 Préparation des solutions d'essai .....	20
4.2 Démarrage de l'essai .....	26
4.3 Conditions expérimentales.....	27
4.3.1 pH.....	27
4.4 Observations et mesures au cours de l'essai .....	28
4.5 Paramètres et calculs.....	29
4.5.1 Validité de l'essai.....	30
<b>4.5.2 Essais à concentrations multiples.....</b>	<b>30</b>

4.5.3	Essais à concentration unique	32
4.5.4	Effets stimulants	32
4.5.5	Autres plans d'expérience et utilité de ceux-ci	33
4.6	Toxique de référence	34
4.7	Considérations d'ordre juridique	36

### Section 5

<b>Modes opératoires particuliers pour la mesure de la toxicité de substances chimiques</b>		<b>37</b>
5.1	Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon	37
5.2	Préparation des solutions d'essai	37
5.3	Eau témoin/de dilution	38
5.4	Observations et mesures au cours de l'essai	40
5.5	Paramètres et calculs	41
5.6	Interprétation des résultats	42

### Section 6

<b>Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat</b>		<b>43</b>
6.1	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	43
6.2	Préparation des solutions d'essai	45
6.3	Eau témoin/de dilution	45
6.4	Observations et mesures au cours de l'essai	47
6.5	Paramètres et calculs	47
6.6	Interprétation des résultats	48

### Section 7

<b>Modes opératoires particuliers pour les essais sur des échantillons d'eau réceptrice</b>		<b>49</b>
7.1	Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons	49
7.2	Préparation des solutions d'essai	49
7.3	Eau témoin/de dilution	49
7.4	Observations et mesures	49
7.5	Paramètres et calculs	50

### Section 8

<b>Rapports à produire</b>		<b>51</b>
8.1	Exigences minimales pour le rapport d'essai	51
8.1.1	Substance ou matière d'essai	52
8.1.2	Organismes d'essai	52
8.1.3	Installations et appareils	52
8.1.4	Eau témoin/de dilution	52
8.1.5	Méthode d'essai	52
8.1.6	Conditions expérimentales et modes opératoires	53
8.1.7	Résultats	53
8.2	Exigences supplémentaires	54
8.2.1	Substance ou matière d'essai	54
8.2.2	Organismes d'essai	54

8.2.3	Installations d'essai et appareillage .....	54
8.2.4	Eau témoin/de dilution .....	54
8.2.5	Méthode d'essai .....	55
8.2.6	Conditions expérimentales et modes opératoires.....	55
8.2.7	Résultats de l'essai.....	55
	<b>Références.....</b>	<b>56</b>
<i>Annexe A</i>		
	<b>Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité de l'environnement (en décembre 2006).....</b>	<b>62</b>
<i>Annexe B</i>		
	<b>Administration centrale et bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada.....</b>	<b>64</b>
<i>Annexe C</i>		
	<b>Variantes des méthodes de culture de <i>Lemna</i> spp. et des essais de mesure de l'inhibition de sa croissance, décrites dans les méthodes canadiennes, étatsuniennes et européennes.....</b>	<b>65</b>
<i>Annexe D</i>		
	<b>Milieus de culture et d'essai utilisés dans les essais d'inhibition de la croissance de <i>Lemna</i> spp., selon les méthodes canadiennes, étatsuniennes et européennes .....</b>	<b>85</b>
<i>Annexe E</i>		
	<b>Description générale de <i>Lemna minor</i>.....</b>	<b>99</b>
<i>Annexe F</i>		
	<b>Techniques de culture axénique des <i>Lemna</i> (Acreman, 2006).....</b>	<b>102</b>
<i>Annexe G</i>		
	<b>Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques.....</b>	<b>109</b>
<i>Annexe H</i>		
	<b>Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada.....</b>	<b>110</b>

## Liste des tableaux

---

1.	Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés pour la culture de <i>Lemna minor</i> .....	10
2.	Composition chimique des solutions mères nutritives entrant dans la préparation du milieu E+ Hoagland modifié (SRC, 2003), utilisé pour la culture de <i>Lemna minor</i> .....	13
3.	Liste de contrôle des conditions et des procédures recommandées pour les essais toxicologiques avec <i>Lemna minor</i> .....	21
4.	Composition chimique des solutions mères nutritives entrant dans la préparation du milieu SIS et de l'eau réceptrice enrichie de nutriments, en vue des essais toxicologiques sur des échantillons de substances chimiques avec <i>Lemna minor</i> .....	40
5.	Composition des solutions mères nutritives entrant dans la préparation du milieu APHA modifié et dans l'enrichissement de l'eau usée et de l'eau réceptrice, en vue d'essais toxicologiques sur des échantillons d'effluent, d'éluviat, de lixiviat ou d'eau réceptrice avec <i>Lemna minor</i> .....	46

## Liste des figures

---

1.	Éléments à prendre en compte dans la préparation et l'exécution d'essais toxicologiques avec <i>Lemna minor</i> et divers types de substances ou de matières d'essai .....	2
2.	Aspect général de <i>Lemna minor</i> en bonne santé et en mauvaise santé .....	9

## Abréviations et formules chimiques

ANOVA	analyse de la variance
CaCl <sub>2</sub>	chlorure de calcium
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	nitrate de calcium
CE <sub>50</sub>	concentration efficace médiane
CE <sub>p</sub>	concentration efficace correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)
CMEO	concentration minimale avec effet observé
CSEO	concentration sans effet observé
CI <sub>p</sub>	concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)
cm	centimètre
CoCl <sub>2</sub>	chlorure de cobalt
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	nitrate de cobalt
CuCl <sub>2</sub>	chlorure de cuivre
CuSO <sub>4</sub>	sulfate de cuivre
CV	coefficient de variation
EDTA	acide éthylènediamine-tétracétique (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> )
ET	écart-type
FeCl <sub>3</sub>	chlorure ferrique
g	gramme
g/kg	gramme par kilogramme
g/L	gramme par litre
h	heure
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	acide borique
HCl	acide chlorhydrique
H <sub>2</sub> O	eau
KCl	chlorure de potassium
kg	kilogramme
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	phosphate monopotassique anhydre
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	phosphate dipotassique
KNO <sub>3</sub>	nitrate de potassium
KOH	hydroxyde de potassium
kPa	kilopascal
L	litre
m	mètre
MC	marque de commerce
mg	milligramme
MgCl <sub>2</sub>	chlorure de magnésium
MgSO <sub>4</sub>	sulfate de magnésium
min	minute
mL	millilitre
mm	millimètre
MnCl <sub>2</sub>	chlorure de manganèse
MOPS	acide 4-morpholinepropanesulfonique
mS/m	millisiemens par mètre
N	normal
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonate de sodium
Na <sub>2</sub> EDTA	acide éthylènediamine-tétracétate disodique (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2H <sub>2</sub> O)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	molybdate de sodium
Na <sub>4</sub> EDTA	acide éthylènediamine-tétracétate tétrasodique (C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2H <sub>2</sub> O)
NaCl	chlorure de sodium
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonate de sodium
NaNO <sub>3</sub>	nitrate de sodium

nm	nanomètre
NaOH	hydroxyde de sodium
s	seconde
spp	espèces
SRC	Saskatchewan Research Council
UTCC	Collection de cultures de l'Université de Toronto
v/v	rapport de volume à volume
ZnCl <sub>2</sub>	chlorure de zinc
ZnSO <sub>4</sub>	sulfate de zinc
µg	microgramme
µm	micromètre
µmol/(m <sup>2</sup> · s)	micromole par mètre carré et par seconde
µmhos/cm	micromhos par centimètre
°C	degré Celsius
>	plus de
<	moins de
≥	plus de ou égal à
≤	moins de ou égal à
±	plus ou moins
/	par; peut aussi signifier « ou » (p. ex. eau témoin/de dilution)
~	environ
≅	approximativement égal à
%	pourcentage ou pour cent
‰	parties par millier
% I	pourcentage d'inhibition de la croissance



## Terminologie

---

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

### Verbes auxiliaires

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

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

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

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

### Termes techniques

*Acclimatation* – Adaptation physiologique à une valeur précise d'un ou de plusieurs **facteurs** environnementaux, **comme** la température. **Ce terme** s'applique généralement à des conditions contrôlées en laboratoire.

*Axénique* – Se dit d'un élevage, d'une culture ou d'un organisme totalement **exempts** de cellules ou d'organismes vivants appartenant à une autre espèce.

*Biomasse* – Masse sèche totale d'un groupe de végétaux ou d'animaux.

*Chlorose* – Perte de la chlorophylle (jaunissement) du tissu végétal (p. ex. d'un thalle).

*Clone* – Groupe d'individus se reproduisant végétativement (par mitose) à partir d'un seul ancêtre (**c.-à-d.** un thalle).

*Colonie* – Groupe formé du thalle mère et des thalles filles (habituellement deux à quatre) unis les uns aux autres. **Le terme plante est parfois utilisé pour désigner une colonie.**

*Conductivité* – **Expression numérique de la capacité d'une solution aqueuse de conduire l'électricité.** Cette capacité dépend des concentrations des ions en solution, de leur valence et de leur mobilité ainsi que de la température de la solution. **La conductivité est mesurée à 25 °C et exprimée en millisiemens par mètre (mS/m) ou en micromhos par centimètre (µmhos/cm);**  
**1 mS/m = 10 µmhos/cm.**

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

*Croissance* – Accroissement de la taille **ou de la masse d'un organisme** par suite de la formation de nouveaux tissus. Dans la présente méthode, désigne l'augmentation du nombre de thalles au cours de la période d'essai, de même que **de la masse sèche** des thalles à la fin de **l'essai.**

*Culture* – Stock d'organismes cultivés en laboratoire dans des conditions définies et contrôlées pendant une génération ou plus afin d'obtenir des sujets d'expérience en bonne santé. Ce terme désigne également l'activité visant à produire de tels sujets à partir d'une génération ou plus dans des conditions définies et contrôlées.

*Culture d'essai* – Culture établie à partir d'organismes isolés de la culture mère, pour fournir des végétaux que l'on utilisera dans un essai toxicologique. Dans le présent rapport, désigne les cultures de *Lemna spp.* de 7 à 10 jours, conservées dans un milieu Hoagland modifié et transférées dans de l'eau témoin/de dilution pour une période d'acclimatation de 18 à 24 h.

*Culture fille* – Culture en laboratoire d'un organisme donné, obtenue à partir d'une culture préexistante, telle que la culture mère.

*Culture mère* – Culture permanente, en laboratoire, d'un organisme d'essai donné, dans laquelle on choisit les sujets qui serviront au démarrage de cultures expérimentales distinctes.

*Dispersant* – Substance chimique abaissant la tension superficielle entre l'eau et une substance hydrophobe (p. ex. l'huile), ce qui facilite la dispersion de la substance ou de la matière hydrophobe dans l'eau sous forme d'émulsion.

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

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

*Gibbosité* – Anomalie donnant aux thalles un aspect bosselé ou gonflé.

*Lux* – Unité d'éclairement mesurant l'intensité lumineuse par mètre carré. 1 lux = 0,092 9 pied-bougie et 1 pied-bougie = 10,76 lux. Pour convertir des lux en flux quantique [ $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ ], il faut connaître la qualité spectrale de la source lumineuse. Les conditions de luminosité ou l'irradiance sont exprimées sous forme de flux quantique (débit de fluence photonique) dans la gamme de longueurs d'onde photosynthétiquement efficaces d'environ 400 à 700 nm. Le lien entre flux quantique et lux (ou pied-bougie) varie énormément en fonction de la source lumineuse, du photomètre utilisé, de la disposition géométrique et des réflexions possibles (v. ASTM, 1995). Néanmoins, le facteur de conversion entre flux quantique et lux pour une lumière fluorescente en spectre continu est approximativement donné par la relation  $1 \text{ lux} \cong 0,016 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (Deitzer, 1994; Sager et McFarlane, 1997).

*Méthode de référence* – Protocole conçu spécifiquement pour la mise en œuvre d'un essai de toxicité, c'est-à-dire une méthode d'essai biologique comportant un ensemble explicite de procédures et de conditions d'essai exposé avec précision dans un document écrit et dont sont convenues formellement les parties en cause. Contrairement à d'autres méthodes d'essai biologique polyvalentes (génériques) publiées par Environnement Canada, les méthodes de référence sont souvent réservées aux essais associés à des règlements particuliers.

*Nécrose* – Mort (c.-à-d. apparition de taches brunes ou blanches) du tissu des thalles.

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

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

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

*Précipitation* – Formation d'un solide (le précipité) à partir d'une partie ou de la totalité des constituants dissous d'une solution.

*Prétraitement* – Traitement d'un échantillon ou d'une dilution de cet échantillon avant d'y exposer les organismes d'essai.

*Protocole* – Document exposant avec précision l'ensemble des marches à suivre pendant un essai et dont sont convenues formellement les parties en cause.

*Radicelle* – Partie de *Lemna* spp. structurellement semblable à une racine.

*Repiquage* – Démarrage d'une culture expérimentale distincte, à partir de la culture mère.

*Salinité* – Quantité totale (exprimée en grammes) de matière solide dissoute dans 1 kg d'eau de mer. Elle est déterminée une fois que tous les carbonates ont été convertis en oxydes, que le bromure et l'iodure ont été remplacés entièrement par du chlorure et que toute la matière organique a été oxydée. On peut également mesurer la salinité directement à l'aide d'un salinomètre, d'un conductivimètre ou d'autres moyens (v. APHA et coll., 1989). La salinité est habituellement exprimée en grammes par kilogramme (g/kg) ou en parties par millier (‰).

*Souche* – Groupe qui, à l'intérieur d'une espèce conservée en culture, possède des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou culturelles plus ou moins distinctes.

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

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

*Thalle* – Structure foliacée individuelle de la lenticule mineure (aussi appelée petite lentille d'eau). C'est la plus petite unité (ou individu) capable de se reproduire.

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

*Vitesse de croissance* – Vitesse à laquelle la *biomasse* s'accroît.

## Termes relatifs aux matières ou substances d'essai

*Coefficient de dilution* – Quotient de deux concentrations successives [p. ex.  $0,32 \text{ mg/L} \div 0,1 \text{ mg/L} = 3,2$  (le coefficient de dilution)].

*Eau d'amont* – Eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau ou d'un lac) ne subissant pas l'influence de l'effluent (ou d'une autre matière ou substance d'essai), parce qu'elle en est éloignée en direction opposée au courant ou qu'elle s'en trouve suffisamment loin perpendiculairement au courant.

*Eau de dilution* – Eau ou, dans le présent rapport, milieu expérimental servant à diluer une substance ou une matière d'essai à différentes concentrations aux fins d'un essai toxicologique.

*Eau désionisée* – Eau que l'on a purifiée pour en extraire les ions en solution en la faisant passer dans des colonnes de résine ou dans un système d'osmose inverse.

*Eau distillée* – Eau ayant été traitée dans un appareil de distillation en verre borosilicaté ou autre matériau pour la débarrasser de ses impuretés.

*Eau réceptrice* – Eau de surface (p. ex. d'un cours d'eau ou d'un lac) dans laquelle ont été rejetées ou sont sur le point d'être rejetées des matières résiduelles (p. ex. elle est immédiatement en amont du point de rejet). Il faut en donner une description étoffée pour préciser ce dont il s'agit.

*Eau réceptrice enrichie de nutriments* – Échantillon d'eau réceptrice à laquelle on a ajouté, dans les mêmes concentrations, les nutriments servant à préparer le milieu expérimental (p. ex. l'eau réceptrice destinée à servir d'eau témoin/de dilution au cours des essais sur les effluents est enrichie à l'aide des solutions mères nutritives APHA modifiées, désignées par les lettres A, B et C, à raison de 10 mL par 1 000 mL d'eau réceptrice) avant la préparation des solutions d'essai.

*Eau témoin/de dilution* – Eau ou, dans le présent rapport, milieu expérimental servant à préparer le traitement témoin et/ou à diluer la matière ou substance d'essai.

*Eau usée* – Terme général englobant les effluents, les lixiviats et les éluviats.

*Eau usée enrichie de nutriments* – Échantillon d'eau usée à laquelle on a ajouté, dans les mêmes concentrations, les nutriments servant à préparer le milieu expérimental (p. ex. l'effluent est enrichi à l'aide des solutions mères nutritives APHA modifiées, désignées par les lettres A, B et C, à raison de 10 mL par 1 000 mL d'effluent) avant la préparation des solutions d'essai.

**Échantillon pour essai** – Échantillon aqueux soumis à un essai. Il peut provenir de solutions mères ou être prélevé dans des effluents, des éluviats, des lixiviats ou des eaux réceptrices.

*Effluent* – Tout déchet liquide (p. ex. industriel, urbain) rejeté dans le milieu aquatique.

*Élutriat* – Solution aqueuse obtenue après addition d'eau à une substance ou une matière solides (p. ex. sol ou sédiment contaminés, stériles, boues de forage, matières draguées), par brassage du mélange, par centrifugation et filtration de celui-ci ou par décantation du surnageant.

*Essai toxicologique de référence* – Essai effectué à l'aide d'un toxique de référence parallèlement à un essai de toxicité afin d'évaluer la sensibilité des organismes et/ou la précision et la fiabilité des résultats obtenus par le laboratoire pour cette substance chimique au moment où l'on évalue la matière ou la substance d'essai. Toute déviation par rapport à une plage normale préétablie indique que la sensibilité des organismes d'essai ainsi que le rendement et la précision de l'essai sont suspects.

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

*Matière* – Substance dont est faite une chose. Ses caractéristiques seraient plus ou moins uniformes. Un effluent, un lixiviat, un élutriat ou une eau de surface sont des matières. Habituellement, une matière renferme un nombre plus ou moins grand de substances.

*Milieu* – Eau désionisée ou distillée sous verre (eau de type 1 de l'ASTM) à laquelle on a ajouté des substances chimiques de qualité réactif. L'eau douce artificielle ainsi obtenue est exempte de contaminants.

*Milieu d'essai* ou *milieu expérimental* – Milieu synthétique complet de culture (dans le cas qui nous occupe, milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié) qui permet la croissance des végétaux d'essai pendant leur exposition à la substance d'essai. Cette dernière est normalement mélangée avec le milieu d'essai ou diluée dans celui-ci.

*Produit chimique* – V. substance chimique

*Solution d'essai* – Solution aqueuse consistant en une concentration particulière d'un échantillon pour essai. Dans la présente méthode, la substance d'essai ou l'eau usée est diluée dans le milieu d'essai ou dans l'eau réceptrice d'amont enrichie avant d'être soumise à l'essai.

*Solution mère* – Solution aqueuse concentrée de la substance ou de la matière d'essai, ou encore des substances chimiques utilisées pour préparer le milieu de croissance/d'essai. On ajoute des quantités mesurées d'une solution mère à l'eau de dilution pour préparer les concentrations voulues de la solution d'essai ou du milieu expérimental.

*Substance* – Matière particulière ayant des propriétés plus ou moins uniformes. Le terme a un sens plus restreint que *matière* et pourrait désigner une substance chimique (p. ex. un élément) ou un produit chimique donnés.

*Substance chimique* – Dans le présent rapport, tout élément, composé, préparation ou mélange d'une substance qui pourraient se trouver associés à l'eau, y être mélangés ou y être déposés.

*Témoin* – Dans une enquête ou une étude, variante expérimentale reproduisant toutes les conditions et tous les facteurs qui pourraient influencer sur les résultats, sauf la condition particulière étudiée. Dans un essai de toxicité, le témoin doit reproduire toutes les conditions du ou des traitements d'exposition, mais il ne doit pas renfermer de matière ou de substance d'essai contaminée. Le témoin sert à vérifier l'absence de toxicité attribuable aux conditions de base de l'essai (p. ex. la qualité de l'eau de dilution, la santé des organismes d'essai ou les effets dus à la manipulation de ces derniers).

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

## Termes relatifs aux statistiques et à la toxicologie

*À renouvellement intermittent* – Se dit d'un essai toxicologique au cours duquel les solutions d'essai sont renouvelées (remplacées) périodiquement (p. ex. à des intervalles donnés) pendant la durée de l'essai. Syn. : à renouvellement périodique.

*Aigu* – Qui se manifeste à l'intérieur d'une période d'exposition relativement courte (secondes, minutes, heures, quelques jours) par rapport à la durée de vie de l'organisme d'essai. Un effet toxique aigu serait provoqué et observable au cours de cette période.

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

*CE<sub>50</sub>* ou *concentration efficace médiane* – Concentration d'une matière dans une eau (exprimée en mg/L, p. ex.), un sol ou un sédiment (exprimée en mg/kg, p. ex.), qui est censée avoir un effet toxique défini chez 50 % des organismes d'essai. Dans la plupart des cas, la CE<sub>50</sub> et ses limites de confiance à 95 % sont dérivées de l'analyse statistique des pourcentages d'organismes chez lesquels un effet donné se fait sentir à diverses concentrations expérimentales, après une période fixe d'exposition. La durée de l'exposition doit être précisée (p. ex. CE<sub>50</sub> 72 h). La CE<sub>50</sub> sert à décrire des effets quantiques, létaux ou sublétaux, et non des effets quantitatifs (v. CI<sub>p</sub>). D'autres pourcentages pourraient être utilisés; v. CE<sub>p</sub>.

*CE<sub>p</sub>* ou *concentration efficace correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)* – Terme défini de la même façon que CE<sub>50</sub>, sauf que le « p » peut prendre diverses valeurs, lesquelles doivent être précisées dans le cas d'essais ou de circonstances particuliers. Des responsables d'essai et certains organismes européens et internationaux, notamment, ont utilisé par erreur la CE<sub>p</sub> pour désigner la CI<sub>p</sub>, mais la distinction est importante et devrait être maintenue.

*Chronique* – Qui se produit à l'intérieur d'une période d'exposition relativement longue (semaines, mois ou années), habituellement une partie appréciable (p. ex. 10 % ou plus) de la durée de vie d'un organisme. Un effet toxique chronique pourrait ne devenir observable qu'au bout d'une bonne partie de la durée de vie de l'organisme, bien qu'il puisse être provoqué par une exposition aiguë ou chronique à une substance toxique.



**CI<sub>p</sub>** ou *concentration inhibitrice correspondant à un pourcentage d'effet (précisé)* – Estimation ponctuelle de la concentration d'une substance ou d'une matière d'essai qui provoque un pourcentage donné d'atteinte à une fonction biologique quantitative, comme la croissance. Par exemple, la CI<sub>25</sub> pourrait être la concentration estimative à laquelle la masse sèche des thalles sera inférieure de 25 % à celle des thalles témoins, à la fin de l'essai. Ce terme devrait être employé pour tout essai toxicologique visant à mesurer un effet quantitatif ou un rythme d'évolution, comme la masse sèche à la fin de l'essai. (Le terme CE<sub>50</sub>, ou concentration efficace médiane, ne convient pas à ce type d'essai du fait qu'il est réservé aux mesures *quantiques*, c.-à-d. le nombre de sujets exposés chez lesquels un effet particulier est observé.)

**CMEO** ou *concentration minimale avec effet observé* – Concentration la plus faible d'une matière ou d'une substance d'essai à laquelle des organismes sont exposés, qui provoque chez ces organismes des effets nocifs observables et statistiquement significatifs. Par exemple, ce pourrait être la concentration minimale à laquelle la masse sèche des organismes exposés présente, à la fin de l'essai, un écart significatif par comparaison avec le témoin.

*Coefficient de variation (CV)* – Écart-type (ET) d'un ensemble de données divisé par la moyenne de l'ensemble de données, exprimé sous forme de pourcentage. Il est calculé selon la formule suivante :

$$CV (\%) = 100 \times (ET \div \text{moyenne})$$

**CSEO** ou *concentration sans effet observé* – Concentration la plus élevée d'une matière ou d'une substance d'essai à laquelle les organismes sont exposés et qui ne cause aucun effet nocif observable et statistiquement significatif. Par exemple, ce pourrait être la concentration la plus élevée à laquelle une variable observée, comme la masse sèche ou le nombre de thalles à la fin de l'essai, ne présente pas d'écart significatif par comparaison avec le témoin.

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

*Essai sans renouvellement des solutions* – Essai toxicologique au cours duquel les solutions d'essai ne sont pas renouvelées pendant la durée de l'essai. Dans la présente méthode, on emploie parfois l'expression « en conditions statiques » pour désigner ce type d'essai.

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

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

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

**Identification des agents toxiques** – Prétraitement systématique d'un échantillon (p. ex. rajustement du pH, filtration, aération), suivi d'essais toxicologiques. Une telle procédure permet d'identifier, dans un mélange complexe, l'agent ou les agents responsables au premier chef de la toxicité. L'essai toxicologique peut être létal ou subléthal.

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

**Moyenne géométrique** – Moyenne de mesures répétées, calculée logarithmiquement. Elle a pour avantage d'atténuer l'influence qu'exercent les valeurs extrêmes sur la moyenne, comme lorsqu'une moyenne arithmétique est établie. On peut calculer la moyenne géométrique comme étant la racine  $n$  ième du produit de « n » valeurs et, aussi, comme l'antilogarithme de la moyenne des logarithmes des « n » valeurs.

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

**Paramètre** – Mesure ou valeur (il peut y en avoir plus d'une) caractérisant les résultats de l'essai (p. ex.  $CI_p$ ). La réaction des organismes d'essai (p. ex. nombre de thalles ou masse sèche des thalles) constitue également un paramètre.

**Précision** – Degré de rapprochement des données recueillies au cours de mesures répétées de la même quantité. La précision décrit le degré de certitude entourant un résultat ou le rapprochement des valeurs d'un paramètre dérivées d'une analyse statistique, comme la  $CI_p$ .



*Quantique* – Adjectif utilisé dans des expressions comme données quantiques et essai quantique. Un effet quantique est un effet auquel chaque organisme d'essai réagit ou ne réagit pas. Par exemple, un animal peut soit vivre, soit mourir, ou encore se développer normalement ou anormalement. En général, l'effet quantique est exprimé sous forme de nombre ou de pourcentage.

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

*Répétition (traitement de, récipients d'essai de)* – Enceinte expérimentale individuelle renfermant un nombre prescrit d'organismes ainsi qu'une concentration de la matière ou de la substance identique à celle du ou des traitements témoins ou des traitements de référence. Comme il s'agit d'une unité expérimentale indépendante, tout transfert d'organisme ou de matière d'essai d'un récipient d'essai à un autre invaliderait l'analyse statistique fondée sur la répétition.

*Toxicité* – Capacité propre d'une substance ou d'une matière de provoquer des effets nocifs chez les organismes vivants. Ces effets peuvent être létaux ou sublétaux.

*Toxicité chronique* – Effets à long terme habituellement liés à des changements de métabolisme, de croissance, de reproduction et d'aptitude à la survie, notamment.

*(Toxicité) sublétale* – Qui a un effet néfaste sur l'organisme, mais en deçà de la concentration ou du niveau de contamination causant directement la mort au cours de l'essai.

*Toxicologie* – Science qui étudie la toxicité des substances, des matières ou des conditions d'un milieu. Cette science fait appel à une gamme illimitée de disciplines scientifiques, d'outils de laboratoire ou de terrain, d'études à divers niveaux d'organisation allant de la molécule à une espèce individuelle, à des populations ou à des communautés. La toxicologie appliquée se propose normalement de définir la marge de sécurité de l'emploi d'une substance chimique ou d'autres agents.

*Toxique* – Synonyme de substance toxique. Une substance ou matière toxique peut avoir des effets nocifs sur des organismes si elle se trouve en quantité suffisante, au bon endroit.

*Traitement* – En règle générale, intervention ou procédure dont l'effet doit être mesuré. Plus précisément, dans un essai toxicologique, un traitement est une condition ou une procédure que le responsable de l'essai applique aux organismes d'essai afin de mesurer les effets d'une substance ou d'une matière sur ces organismes. Le traitement peut consister en une concentration donnée d'une matière ou d'une substance potentiellement toxique. Il peut aussi s'agir d'une matière d'essai en particulier (p. ex. un échantillon d'effluent, d'élutriat, de lixiviat, d'eau réceptrice ou d'eau témoin).



## Remerciements

La première édition de la présente méthode d'essai biologique, publiée en mars 1999, a été rédigée par Jennifer A. Miller [Miller Environmental Sciences Inc., Stroud (Ont.)]. Elle s'inspirait d'une méthode élaborée par Mary Moody et Hans Peterson, du Saskatchewan Research Council (1997), à partir de l'essai toxicologique intitulé *8211 Duckweed (Proposed)* (APHA et coll., 1995). Elle intégrait aussi les modifications décrites dans des documents et des rapports d'orientation (publiés ou inédits) décrivant les modes opératoires et les conditions employés aux États-Unis, au Canada et en Europe pour la culture de *Lemna minor* et pour la réalisation d'essais toxicologiques avec cette macrophyte dulcicole.

R.P. Scroggins [Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.)], en sa qualité d'autorité scientifique, a apporté une aide technique et orienté les travaux. Nous sommes particulièrement reconnaissants à l'endroit de chacun des membres du Comité consultatif scientifique d'Environnement Canada, qui ont été chargés de l'examen des versions initiale et finale de la première édition du présent rapport et qui ont formulé de nombreuses observations et suggestions utiles : G. Gilron [ESG International Inc., Guelph (Ont.)]; E. Jonczyk [Beak International Inc., Brampton (Ont.)]; D.J. McLeay [McLeay Environmental Ltd., Victoria (C.-B.)]; M. Moody [Saskatchewan Research Council, Saskatoon (Sask.)]; J. Rathbun [ASCI Corporation, Livonia (MI)]; J. Staveley [ARCADIS Geraghty & Miller, Inc., Raleigh (NC)]; L. Taylor [Université McMaster, Hamilton (Ont.)]; P. Whitehouse (WRc, Marlow, Bucks, Royaume-Uni).

Outre la contribution des membres de ce comité à l'élaboration de la première édition de la méthode, de nombreuses observations et suggestions judicieuses ont été formulées par les personnes suivantes, qui ont examiné l'ébauche finale de la première édition : J. Acreman [UTCC, Université de Toronto, Toronto (Ont.)]; J. Amato [ASCI Corporation, Duluth (MN)]; R. Baudo (CNR Istituto Italiano di Idrobiologia, Verbania Pallanza, Novare, Italie); C. Boutin [Environnement Canada, Gatineau (Qué.)]; D. Forrow (National Centre for Ecotoxicology and Hazardous Substances, Waterlooville, Hants, Royaume-Uni); P. Gnemi (Groupe bioscience des laboratoires et cliniques, Calleretto Giacosa, Toscane, Italie); B. Greenberg [Université de Waterloo, Waterloo (Ont.)]; J. Hoberg [Springborn Laboratories, Inc., Wareham (MA)]; J. Kranzfelder [ABC Laboratories, Columbia (MO)]; J.D. Madsen [CEWES-ES-P, Vicksburg (MS)]; R. Morcock [USEPA, Washington (DC)]; E. Öhlén (Kemi, Solna, Suède); B. Péntzes (Laboratoire d'hydrobiologie, Százhalombatta, Hongrie); R. Roshon [Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, Ottawa (Ont.)]; J. Schroeder [Beak International Inc., Brampton (Ont.)]; E. Schultz (Institut finlandais de l'environnement, Helsinki, Finlande).

Nous remercions sincèrement M. Moody [SRC, Saskatoon (Sask.)] pour ses nombreuses contributions techniques et son soutien. Nous exprimons notre reconnaissance à J. Acreman [UTCC, Toronto (Ont.)], qui nous a fait profiter de son expérience des méthodes de culture de *Lemna* spp. Nos remerciements les plus sincères s'adressent à D. McLeay [McLeay Environmental Ltd., Victoria (C.-B.)] pour son apport et ses compétences d'ordre technique et rédactionnel. A. Stomp et son équipe technique [Université d'État de la Caroline du Nord, Raleigh (NC)], de même que E. Landolt (Geobotanisches Institut ETH, Zurich, Suisse), nous ont apporté une aide précieuse dans le domaine de la taxinomie et des caractéristiques de *L. minor* et de ses clones. Enfin, nous remercions les membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité de l'environnement (v. l'annexe A) pour leur soutien technique.

La présente édition (la deuxième) a été préparée par J.A. Miller [Miller Environmental Sciences Inc., King (Ont.)], avec l'aide et les conseils de L. Taylor (gestionnaire, Section de l'élaboration et de l'application des méthodes), de R. Scroggins (chef, Division des méthodes biologiques) et de L. Van der

Vliet (Section de l'élaboration et de l'application des méthodes) du Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.), de même que M. Moody [Saskatchewan Research Council, Saskatoon (Sask.)]. Elle comporte de nombreuses mises à jour, comme celles visant les milieux de culture et d'essai modifiés et l'utilisation des analyses de régression des données relatives aux paramètres quantitatifs. Le personnel de laboratoires canadiens mettant en œuvre la méthode d'essai toxicologique décrite ici a fait parvenir à la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes de nombreuses observations et suggestions ayant trait aux modifications à apporter à la première édition; elles ont été prises en compte pendant la préparation de cette deuxième édition du rapport SPE 1/RM/37. Ont également été intégrées les procédures décrites dans la version provisoire de l'essai d'inhibition de la croissance de *L. minor* publiée par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) en 2005. De nombreuses modifications ont été apportées aux modes opératoires à l'issue des recherches effectuées par M. Moody.

Les photographies accompagnant la présente méthode ont été fournies par M. Moody [SRC, Saskatoon (Sask.)].

## Section 1

# Introduction

## 1.1 Contexte

Au Canada et ailleurs dans le monde, les *essais toxicologiques* en milieu aquatique servent à déterminer et à surveiller les effets *toxiques de substances* ou de *matières susceptibles* d'être nocives pour la vie aquatique. On *peut* se fonder sur les résultats de ces essais à diverses fins, notamment pour établir la nécessité de réglementer les rejets et d'entreprendre des recherches, de même que pour fixer des normes relatives à la qualité des effluents. Reconnaisant qu'une seule méthode d'essai ou un seul organisme d'essai ne peut répondre aux besoins d'une démarche globale visant la conservation et la protection de l'environnement, Environnement Canada et le Groupe intergouvernemental sur la toxicité de l'environnement (annexe A) ont proposé de mettre au point un ensemble d'essais toxicologiques normalisés pour le milieu aquatique, qui serait d'un emploi généralement acceptable au Canada. Il a été décidé qu'il fallait disposer d'une batterie de méthodes d'essai biologique approuvées par les autorités fédérales pour mesurer les différents effets toxiques *aigus* et *chroniques* à l'aide de diverses substances ou matières d'essai et de divers organismes représentant les différents niveaux trophiques et groupes taxinomiques (Sergy, 1987). Dans le cadre de ce projet permanent, on a recommandé de normaliser un essai toxicologique permettant de déterminer l'effet inhibant de contaminants sur la *croissance* de la plante macroscopique aquatique *Lemna minor*. Les laboratoires régionaux d'Environnement Canada (annexe B), de même que des laboratoires provinciaux et privés, ont utilisé la première édition de cette méthode aux fins de l'application du *Règlement sur les effluents des mines de métaux* et pour satisfaire aux autres exigences du ministère en matière d'essais. La présente édition (la deuxième) comporte de nombreuses améliorations procédurales, des mises à jour et

des conseils plus explicites, de même que des instructions sur les méthodes statistiques (c.-à-d. les analyses de régression) à utiliser dorénavant pour le calcul de l'inhibition de la croissance, qui constitue un *paramètre* d'essai.

Le présent rapport décrit les *procédures universelles* et les conditions de réalisation des essais toxicologiques en milieu aquatique mesurant l'inhibition de la croissance de *L. minor*. Il expose aussi des ensembles particuliers de conditions et de modes opératoires exigés ou recommandés pour les essais visant à évaluer différents types de substances ou de matières (p. ex. des échantillons de *substances chimiques*, d'*effluents*, d'*eaux réceptrices*, de *lixiviats* ou d'*élutriats*) (voir la figure 1). Les notes en bas de page expliquent certains détails de la méthode.

La méthode a été mise au point après examen des variantes des *méthodes* de culture et d'essai relevées dans les méthodes canadiennes, *étatsuniennes* et européennes existantes<sup>1</sup>, qui décrivent comment préparer et réaliser des essais phytotoxicologiques avec des macrophytes du genre *Lemna* (ci-après, « *Lemna* » ou « lenticules »). L'annexe C présente un sommaire des modes de culture et d'essai, tandis que l'annexe D renferme une brève description de divers milieux utilisés pour la culture des *Lemna* et la conduite d'essais faisant appel à ces espèces, tant dans les méthodes actuelles qu'antérieures.

<sup>1</sup> Parmi les documents qui ont servi à inventorier les variantes des méthodes de culture et d'essai (v. les annexes C et D), on compte des guides pratiques publiés, des modes opératoires normalisés mais inédits qu'utilisent des laboratoires, de même que des rapports provisoires. Les annexes C et D renvoient d'abord à l'organisme d'origine de la méthode, puis à l'auteur ou aux auteurs, le cas échéant. Les références formelles y sont indiquées.

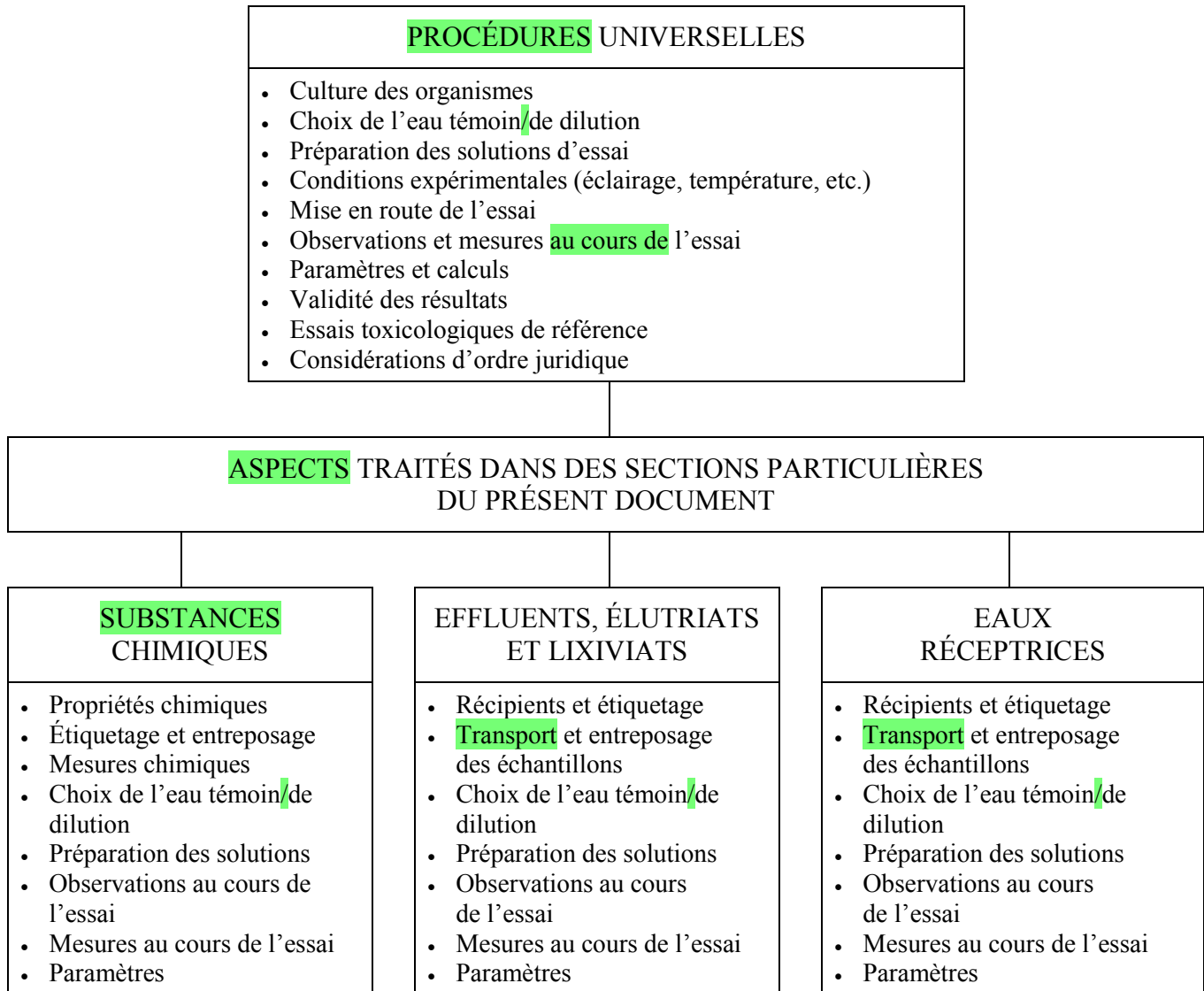


Figure 1. **Éléments à prendre en compte dans la préparation et l'exécution d'essais toxicologiques avec *Lemna minor* et divers types de substances ou de matières d'essai**

Les paramètres biologiques de la méthode décrite ici sont : a) l'augmentation du nombre de thalles au cours de l'essai de 7 jours; b) la masse sèche (indicateur de la croissance) à la fin de l'essai<sup>2</sup>.

La méthode d'essai vise à évaluer les échantillons suivants :

- 1) les substances chimiques simples, les produits commerciaux ou les mélanges connus de substances chimiques;
- 2) les éluviats, les lixiviats ou les effluents industriels ou urbains constitués d'eau douce;
- 3) les eaux de surface ou les eaux réceptrices.

En formulant le présent mode opératoire, on s'est efforcé de trouver le juste milieu entre les coûts et les considérations scientifiques et pratiques, tout en s'assurant que les résultats seraient assez précis et exacts pour la plupart des situations auxquelles ils s'appliqueraient. On suppose que l'utilisateur connaît dans une certaine mesure les essais toxicologiques en milieu aquatique. Les orientations fournies concernent les différentes possibilités et applications entourant les essais. Le présent document ne renferme pas d'instructions explicites qui pourraient être exigées dans un protocole réglementaire, bien

<sup>2</sup> On peut utiliser diverses méthodes pour mesurer ou estimer la croissance. La plus connue et la plus simple (mais indirecte) est le dénombrement des plantes ou des thalles (ASTM, 1991). Elle est en outre rapide et non destructive (pouvant donc avoir lieu pendant l'essai); cependant, elle ne dit rien sur la taille ou la biomasse des thalles (Wang, 1990). Wang (1990) fait observer que, dans une situation de stress d'origine toxique, de petits bourgeons pourraient se former et passer pour des thalles individuels. Un petit bourgeon pourrait équivaloir à moins de 5 % de la biomasse d'un thalle en santé dans le groupe témoin; cependant, on assimile un petit bourgeon à un thalle durant le dénombrement. La toxicité pourrait donc être grandement sous-estimée si seuls les thalles sont dénombrés. En outre, le dénombrement des thalles ne comporte aucune distinction nette entre thalles vivants et thalles morts. Cowgill et Milazzo (1989) ont constaté que la masse sèche est le plus objectif et le plus reproductible des paramètres possibles (p. ex. nombre de thalles, nombre de plantes, nombre de radicelles, allongement total des radicelles, pourcentage d'azote Kjeldahl, chlorophylles *a* et *b*).

qu'il soit conçu comme un guide utile pour des applications de ce type, notamment.

On trouvera dans le rapport d'Environnement Canada (EC, 1999a) des indications sur la mise en œuvre de la présente méthode et d'autres méthodes biologiques, de même que sur l'interprétation et l'application des données relatives aux paramètres mesurés.

## 1.2 Description de l'espèce et emplois antérieurs dans les essais

*Lemna minor*, appelée couramment lenticule mineure ou lentille d'eau, est une macrophyte aquatique vasculaire de petite taille appartenant à la famille des lemnacées. Les membres de cette famille sont des angiospermes monocotylédones flottant à la surface des eaux calmes ou juste au-dessous (Hillman, 1961). On en compte quatre genres (*Spirodela*, *Lemna*, *Wolffiella* et *Wolffia*) et, dans le genre *Lemna* (c.-à-d. les lenticules), quarante espèces dans le monde entier (Wang, 1990). Les deux espèces ordinairement utilisées dans les essais toxicologiques, *L. minor* et *L. gibba*, sont bien représentées dans les zones tempérées (OCDE, 1998, 2002).

Ubiquiste, *L. minor* est présente dans les eaux douces relativement dormantes (étangs, lacs, eaux stagnantes et cours d'eau calmes) et les estuaires des zones tropicales à tempérées (APHA et coll., 1992). C'est une espèce cosmopolite dont la répartition est presque mondiale (Godfrey et Wooten, 1979). En Amérique du Nord, *L. minor* est l'une des lenticules les plus communes et les plus répandues (Arber, 1963; APHA et coll., 1992). Ses thalles croissent séparément ou en petites grappes (de 3 à 5), sont plats et largement obovales à presque ovales, atteignent de 2 à 4 mm de longueur, sont verts à vert lime et possèdent une radicelle unique qui prend naissance au centre de la face inférieure de la feuille (Hillman, 1961; Godfrey et Wooten, 1979; Newmaster et coll., 1997). La croissance végétative des *Lemna* se fait par bourgeonnement latéral; elle est plus rapide que celle des autres plantes vasculaires et à fleurs (Hillman, 1961;



APHA et coll., 1992). L'annexe E renferme plus de précisions sur la taxinomie, la description, la répartition, l'écologie et la biologie de la reproduction de cette espèce.

Les lenticules sont utilisées dans les essais de détection de la phytotoxicité depuis les années 1930. Elles ont fait partie des espèces qui ont servi à déterminer les effets des premiers herbicides dérivés de l'acide phénoxyacétique (Blackman et Robertson-Cumminghame, 1955). En 1979, la United States Environmental Protection Agency (USEPA) a proposé de considérer *L. minor* comme une macrophyte aquatique « représentative », utile à l'évaluation de l'innocuité de substances chimiques pour l'environnement (Federal Register, 1979, dans Bishop et Perry, 1981). Ces dernières années, on s'est intéressé de plus en plus à l'utilisation des plantes vasculaires à des fins de surveillance et d'évaluation environnementales, y compris pour les essais phytotoxicologiques en laboratoire (Wang et Freemark, 1995). En plus d'être un composant essentiel des écosystèmes aquatiques<sup>3</sup>, les macrophytes aquatiques jouent un rôle clé dans l'évaluation, au moyen d'essais phytotoxicologiques, des effets des herbicides sur la végétation aquatique (Wang et Freemark, 1995).

Bon nombre de lois et de lignes directrices importantes élaborées par différents pouvoirs publics désignaient les essais phytotoxicologiques parmi les moyens de surveillance et d'évaluation environnementales (Wang et Freemark, 1995). L'USEPA exige ces essais en vertu de la *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act*, y compris un essai de mesure de la croissance de la lenticule. L'essai peut aussi être exigé sous le régime de la *Toxic Substances Control Act*, dont l'application

<sup>3</sup> Les macrophytes et le phytoplancton constituent une fraction majeure de la biomasse totale des organismes photosynthétiques des milieux aquatiques. On a besoin de plantes supérieures, représentées par des individus caractérisés et uniformisés, dans les études sur la salubrité des écosystèmes aquatiques, de même que pour les études sur le développement des animaux et sur les microbes (Wang, 1990; Greenberg et coll., 1992).

relève de l'USEPA, et il est facultatif pour les permis du National Pollution Discharge Elimination System (NPDES) en vertu de la *U.S. Water Quality Act* de 1987 (Wang et Freemark, 1995).

Un essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la lenticule mineure, élaboré pour l'Organisation de coopération et de développements économiques (OCDE, 1998, 2002), a été soumis à une validation interlaboratoires (Sims et coll., 1999) internationale à laquelle ont participé 37 laboratoires d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Extrême-Orient. On a évalué les caractéristiques clés de performance de la méthode d'essai provisoire, notamment la conformité aux critères de qualité essentiels, la répétabilité intralaboratoire et la reproductibilité interlaboratoires. D'après les résultats de l'essai interlaboratoires, dans lequel on a utilisé deux espèces de lenticule (*L. minor* et *L. gibba*), les exigences précisées par l'OCDE dans ses lignes directrices provisoires concernant l'inhibition de la croissance de ces espèces ont été respectées dans la plupart des ensembles de données soumis (Sims et coll., 1999). D'autres constatations issues de l'essai interlaboratoires s'appliquent à l'emploi du 3,5-dichlorophénol et du dichromate de potassium comme toxiques de référence.

Les méthodes d'essai avec des lenticules employées en Amérique du Nord et à l'étranger comprennent celles de l'American Public Health Association et coll. (APHA et coll., 1995), de l'American Society for Testing and Materials (ASTM, 1991), de l'USEPA (1996), de l'Association française de normalisation (AFNOR, 1996), de l'Institut des normes de Suède (SIS, 1995), de l'Institut de recherche environnementale appliquée (ITM, 1990). Plus récemment, l'Organisation internationale de normalisation (ISO) a aussi mis au point une méthode d'essai visant l'inhibition de la croissance de *L. minor* (ISO, 2005).

Les lenticules possèdent de nombreuses qualités propices aux essais toxicologiques en laboratoire



et à l'évaluation de la qualité de l'eau des réseaux hydrographiques dulcicoles, notamment :

- une petite taille<sup>4</sup>;
- une structure relativement simple;
- une croissance rapide<sup>5</sup> (Hillman, 1961; Smith et Kwan, 1989).

Plusieurs caractéristiques les rendent irremplaçables pour les essais toxicologiques :

- leur multiplication végétative et leurs populations génétiquement homogènes permettent l'emploi de colonies clonales pour toutes les expériences et suppriment les effets dus à la variabilité génétique (Hillman, 1961; Bishop et Perry, 1981; Smith et Kwan, 1989);
- on peut désinfecter et cultiver les lenticules en milieu liquide de même que sur gélose, de façon autotrophe ou hétérotrophe (Hillman, 1961);
- elles peuvent croître indéfiniment en laboratoire, et les conditions contrôlées de température, d'éclairage et de nutrition sont beaucoup plus faciles à maintenir que pour la plupart des autres angiospermes (Hillman, 1961; Wang, 1987);
- leur ratio superficie/volume est élevé, et elles sont presque dépourvues, sinon totalement dépourvues de cuticule sur la face inférieure du thalle qui entre en contact avec la solution d'essai (Bishop et Perry, 1981);

<sup>4</sup> Suffisamment petites pour que l'on n'ait pas besoin de vastes installations de laboratoire, les lenticules sont par ailleurs suffisamment grosses pour que les effets soient visibles à l'œil nu (ASTM, 1991).

<sup>5</sup> Cultivée dans des conditions favorables et bien contrôlées de laboratoire, *L. minor* double de biomasse tous les deux jours (ITM, 1990), conformément aux résultats d'une étude de 18 mois (Wang, 1987) durant laquelle les thalles de *L. minor* doubaient en 1,3 à 2,8 jours. La valeur moyenne et l'écart-type étaient de 1,9 et de 0,36 jour, respectivement (Wang, 1987). Le doublement de la biomasse en près de 24 h est, d'après SRC (1997), la vitesse maximale de croissance.

- les lenticules pouvant biomobiliser facilement un certain nombre d'éléments métalliques, elles constituent de bonnes candidates pour la surveillance de la qualité de l'eau, les essais toxicologiques et les essais de biomobilisation en laboratoire (Jenner et Janssen-Mommen, 1989; Smith et Kwan, 1989);
- elles sont particulièrement sensibles aux substances tensio-actives, aux composés hydrophobes et aux substances semblables qui se concentrent à l'interface air-eau (Taraldsen et Norberg-King, 1990; ASTM, 1991);
- contrairement aux solutions utilisées dans les essais toxicologiques avec des algues, les solutions sont renouvelables et l'on peut utiliser des échantillons d'eau usée ou d'eau réceptrice colorées ou troubles (Taraldsen et Norberg-King, 1990; Forrow, 1999).

Comme les *Lemna* ont d'abord été employées dans des études comparatives de la phytotoxicité, on a déjà décrit un certain nombre de modes opératoires. Leur croissance a été quantifiée au moyen de diverses méthodes, dont la détermination des éléments suivants : nombre de thalles, masse sèche, vitesse de croissance, temps de doublement de la biomasse, pourcentage d'inhibition, superficie des thalles, longueur de la radicule, teneur en chlorophylle, photosynthèse (Lockhart et Blouw, 1979; Bishop et Perry, 1981; Cowgill et Milazzo, 1989; Wang, 1990; Greenberg et coll., 1992; Huang et coll., 1997). Parmi les espèces ayant été utilisées à des fins expérimentales, on compte *L. aequinoctialis*, *L. major*, *L. minor*, *L. gibba*, *L. paucicostata*, *L. perpusilla*, *L. trisulca* et *L. valdiviana* (OCDE, 1998, 2002). De nombreuses variantes expérimentales, notamment la durée de l'essai, le régime (sans renouvellement, à renouvellement intermittent ou continu), le milieu d'essai et de culture, l'intensité lumineuse et la température, ont été examinées et ont fait l'objet de synthèses (v. les annexes C et D).

L'essai d'inhibition de la croissance de *L. minor*, mis au point par la section de la qualité de l'eau du Saskatchewan Research Council (SRC, 1997), est une modification du mode opératoire de mesure de la toxicité publié par l'APHA et coll. (1995) sous le titre *8211 Duckweed (Proposed)*. Les principaux changements concernent la composition du milieu (ajout de potassium, stabilisation du pH, élimination de l'EDTA), les méthodes de préculture et l'emploi de cultures axéniques, de même que l'exigence d'une augmentation plus forte de la biomasse au cours de l'essai. La méthode mise au point par le SRC a permis d'évaluer des solutions d'un seul métal ainsi que les eaux usées de mines de métaux (SRC, 1997).

La précision de l'essai semble satisfaisante. Le SRC a montré que les coefficients de variation (CV) intralaboratoire du pourcentage moyen d'inhibition de la biomasse par un toxique de référence, le chrome (Cr), étaient inférieurs à 10 % (Moody, 1998).

L'objet de la présente méthode est d'offrir une méthode canadienne « normalisée » pour l'estimation de la toxicité de diverses substances ou matières présentes dans l'eau douce à l'aide de *L. minor*. Si les autres méthodes publiées (v. l'annexe C) pour la réalisation de cet essai ont pu être limitées à certains types de substances ou

matières, la présente méthode est destinée à l'évaluation de la toxicité sublétales de substances chimiques, d'effluents, de lixiviats, d'élutriats et d'eaux réceptrices. Les conditions générales de culture et d'essai ainsi que les modes opératoires généraux correspondent en grande partie à ceux élaborés par le SRC (1997); on a procédé à des modifications utiles et à une harmonisation avec les méthodes de l'OCDE (OCDE, 1998, 2002), de l'ISO (2005) et d'autres méthodes. Le document donne la justification du choix de certaines approches.

La méthode est destinée à être utilisée avec *L. minor* acclimatée à l'eau douce, avec de l'eau douce comme eau de dilution et eau témoin, de même qu'avec des effluents, des lixiviats ou des élutriats qui sont essentiellement constitués d'eau douce (c.-à-d. d'une salinité d'au plus 10 g/kg) ou qui sont salés mais destinés à être rejetés dans l'eau douce. Son application peut prendre diverses formes, mais elle comprend des cas où l'effet ou les effets réels ou potentiels de substances ou de matières sur le milieu dulcicole font l'objet d'un examen. D'autres essais, au moyen d'autres espèces acclimatées à l'eau de mer, peuvent servir à évaluer l'effet ou les effets réels ou potentiels de substances ou de matières dans les milieux estuariens ou marins ou à évaluer une eau usée dont la salinité est supérieure à 10 g/kg.

## Section 2

# Organismes d'essai

## 2.1 Espèce et stade

*Lemna minor* Linné (Arales : Lemnaceae) doit être utilisée avec la présente méthode d'essai biologique. Les clones recommandés sont Landolt 8434 et 7730<sup>6</sup>. L'annexe E donne une description générale de *L. minor* et des caractéristiques qui la distinguent d'espèces semblables.

La culture d'essai, qui est constituée de plantes isolées exclusivement en vue de l'obtention d'organismes d'essai, doit être axénique et doit servir à l'inoculation dans tous les récipients d'un essai donné<sup>7</sup>. Les inoculum à utiliser doivent avoir de 7 à 10 jours, être constitués de jeunes colonies<sup>8</sup> en croissance rapide, sans lésion visible (v. la figure 2)<sup>9</sup>.

<sup>6</sup> Le clone Landolt 8434 provient de la péninsule de Niagara, en Ontario (1977), et a été isolé de cultures axéniques, à Zurich, en Suisse. Le clone Landolt 7730 provient du lac Elk, en Colombie-Britannique (1973), et a été isolé de cultures axéniques, à Zurich également. Les deux peuvent être obtenus de la collection de cultures de l'Université de Toronto (v. 2.2).

<sup>7</sup> Pour une normalisation plus poussée, une culture provenant d'une seule plante isolée peut être inoculée dans toutes les fioles utilisées dans un essai donné (USEPA, 1992; 1996).

<sup>8</sup> Les cultures de qualité se distinguent par la forte incidence de plantes comptant au moins deux thalles (deux à quatre). Un grand nombre de thalles uniques relativement petits (avec ou sans deux thalles rachitiques) révèle un stress dû au milieu, par exemple une carence nutritive, et le matériel végétal issu de ces cultures ne doit pas servir aux essais. En pleine période de croissance (jeunes plantes), *L. minor* est de couleur plus claire, présente des racelles plus courtes et compte deux ou trois thalles de tailles différentes (ITM, 1990; OCDE, 1998, 2002).

<sup>9</sup> Selon les courbes de croissance établies dans SRC (1995), la croissance la plus intense de *L. minor* en milieu E+ Hoagland modifié se situe entre les jours 7 et 10. L'USEPA (1992, 1996) et l'AFNOR (1996) recommandent d'utiliser un inoculum de cultures de moins de deux semaines.

## 2.2 Origine

Tous les organismes utilisés dans un essai doivent être issus d'une même souche. Les plantes exigées pour établir les cultures peuvent provenir de collections de cultures, de laboratoires publics ou privés cultivant *L. minor* en vue d'essais toxicologiques, ou encore de fournisseurs commerciaux de matériel biologique. Au moment du démarrage des cultures d'organismes provenant de sources extérieures, il faut demander à un taxinome compétent connaissant les macrophytes aquatiques de confirmer et d'étayer l'identité de l'espèce<sup>10</sup>. Il importe également d'identifier le clone (si possible), car il a été démontré que différents clones de la même espèce peuvent afficher des sensibilités différentes (Cowgill et Milazzo, 1989; SRC, 2003, 2005)<sup>11</sup>. Il est

<sup>10</sup> La taxinomie des *Lemna* est compliquée par l'existence de nombreux phénotypes. En outre, les clés taxinomiques se fondent surtout sur les caractéristiques des fleurs et des fruits des *Lemna* et elles renferment relativement peu de caractéristiques végétatives utiles au diagnostic. Comme on observe rarement la floraison et la fructification chez les *Lemna*, l'identification certaine peut être extrêmement difficile. Ainsi, on ne peut différencier avec certitude *L. minor* de *L. turionifera*, deux espèces étroitement apparentées, que par l'absence de turions d'hivernage et l'absence de taches d'anthocyanine rougeâtres sur la face ventrale de *L. minor*. Or, ces caractéristiques ne se manifestent que lorsque les conditions de culture sont substantiellement différentes de celles que l'on utilise ordinairement pour les *Lemna*, en laboratoire.

<sup>11</sup> Cowgill et Milazzo (1989) ont soumis quatre clones de *L. minor*, dans un milieu Hoagland modifié, à diverses concentrations de sélénium (Se), de vanadium (V), de cobalt (Co) et d'étain (Sn), afin de déterminer les concentrations optimales de ces éléments dans un milieu de culture pour la croissance des plantes. Ils ont constaté que la réaction des clones variait. Le clone 6591 n'a connu aucune hausse de croissance après l'ajout de Sn et de Co, tandis que sa biomasse (masse sèche) a culminé à 8,4 µg de Se/L et à 12,8 µg de V/L. Le clone 7102 a atteint une biomasse maximale après l'ajout de 8,4 µg de Se/L, 685 µg de Sn/L et 10,2 µg de Co/L. Le clone 7101 a réagi de même à l'ajout des mêmes quantités de Se et de Sn, mais n'a pas

également conseillé de vérifier périodiquement (p. ex. annuellement) l'appartenance taxinomique de la culture du laboratoire ou de remplacer la culture (c.-à-d. la renouveler) par une culture d'une collection reconnue, afin de s'assurer qu'elle n'a pas été contaminée par d'autres *Lemna* ou d'autres clones, plus particulièrement si le laboratoire maintient plusieurs cultures différentes de *Lemna*.

On peut obtenir des cultures axéniques ou non axéniques de *L. minor* auprès de la source canadienne suivante :

Collection de cultures de l'Université de Toronto<sup>12</sup>  
 Département de botanique, Université de Toronto  
 25, rue Willcocks, Toronto (Ont.)  
 Canada, M5S 3B2

Téléphone : (416) 978-3641  
 Télécopieur : (416) 978-5878  
 Courriel : [jacreman@eeb.utoronto.ca](mailto:jacreman@eeb.utoronto.ca)

---

réagi à celui de V et de Co. Quant au clone 7136, sa croissance a été supérieure sans ajout de ces quatre éléments au milieu.

Dans des études plus récentes (SRC, 2003, 2005), la sensibilité de divers clones de *L. minor* (UTCC 490, 492 et 620) variait en fonction du toxique auquel ils étaient exposés et de la méthode utilisée. Les valeurs de la CI<sub>25</sub> pour le zinc (Zn), le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) et le nickel (Ni) n'étaient pas significativement différentes entre les souches UTCC 490 et 492 (SRC, 2003). De plus, aucune différence significative de la CI<sub>25</sub> n'a été observée dans le cas des souches UTCC 490, 492 et 620 exposées au chlorure de potassium (KCl) (SRC, 2005). Dans le cas du Ni, la CI<sub>25</sub> établie d'après le nombre de thalles était cependant quatre fois plus élevée pour la souche UTCC 620 que pour la souche UTCC 492 au moyen de la méthode d'Environnement Canada (SPE 1/RM/37), tandis qu'elle ne présentait aucun écart significatif entre ces deux souches au moyen des méthodes décrites dans la norme provisoire de l'ISO (SRC, 2005).

<sup>12</sup> Lors de l'acquisition de la culture de *Lemna*, on devrait obtenir un certificat de confirmation taxinomique à titre d'information et comme preuve de l'intégrité de la culture.

Site Web : <http://www.botany.utoronto.ca/utcc>  
*Lemna minor* : UTCC 490<sup>13</sup> et 492<sup>14</sup>

## 2.3 Culture

### 2.3.1 Généralités

Le tableau 1 résume les conditions et les modes opératoires recommandés ou exigés pour la culture de *L. minor* exposés ici. Ces renseignements visent à permettre une certaine souplesse, d'un laboratoire à l'autre, dans la normalisation des conditions qui, si elles n'étaient pas régies, pourraient influencer sur la santé et le comportement des organismes d'essai. La sous-section 2.3 s'inspire en grande partie de SRC (1997) et de OCDE (1998, 2002).

Si les plantes proviennent d'un laboratoire ou d'une collection de cultures de l'extérieur, elles doivent être cultivées au laboratoire pendant au moins trois semaines avant de servir.

On perpétue les cultures mères axéniques par repiquage hebdomadaire d'une plante dans des tubes à essai de 25 × 150 mm contenant environ 25 mL de milieu stérile E+ Hoagland modifié (SRC, 2003) et obturés au moyen de capsules Kimcaps<sup>MC</sup>. On transfère les *Lemna* en asepsie dans des tubes à essai renfermant le milieu E+ Hoagland modifié fraîchement préparé et on les laisse incuber, inclinées, sous éclairage et à température contrôlés.

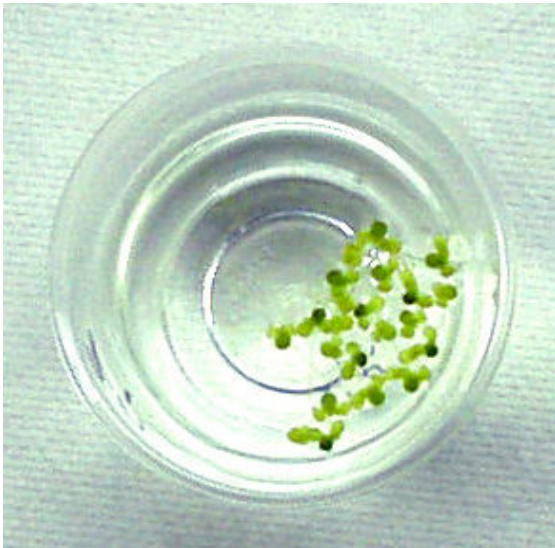
L'apparition d'un trouble dans le milieu d'une culture mère de *Lemna* dénote une contamination bactérienne, tandis qu'une contamination par les moisissures peut ne pas être évidente tant que de vastes colonies n'apparaissent pas dans le milieu ou qu'une pellicule biologique ne se forme pas sur les parois du récipient. Les cultures contaminées (p. ex. par des algues, des protozoaires, des champignons microscopiques ou des bactéries) doivent être éliminées ou stérilisées (v. 2.3.7).

---

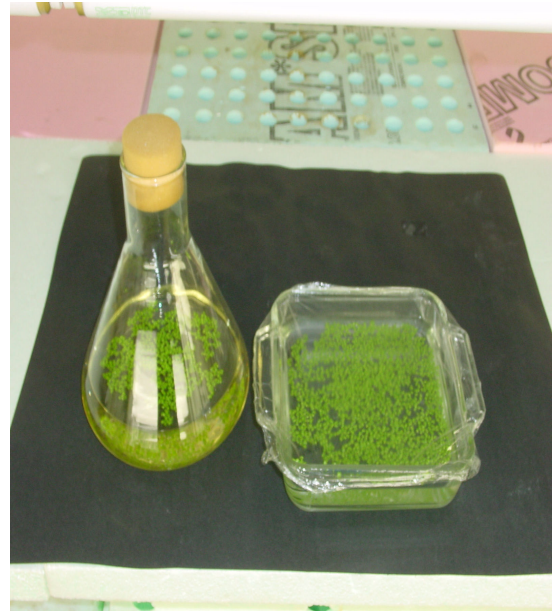
<sup>13</sup> UTCC 490 : Culture axénique; clone Landolt 8434; péninsule de Niagara (Ontario), Canada.

<sup>14</sup> UTCC 492 : Culture axénique; clone Landolt 7730; lac Elk (Colombie-Britannique), Canada.

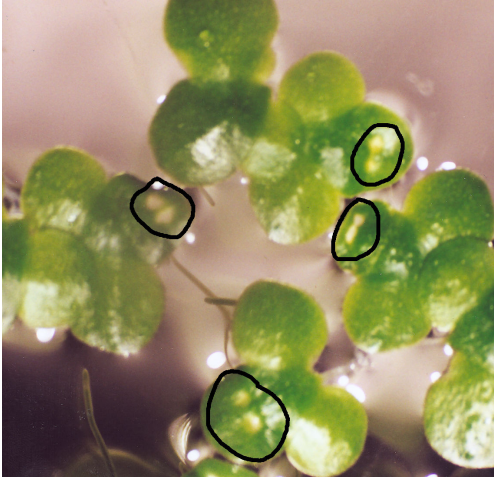




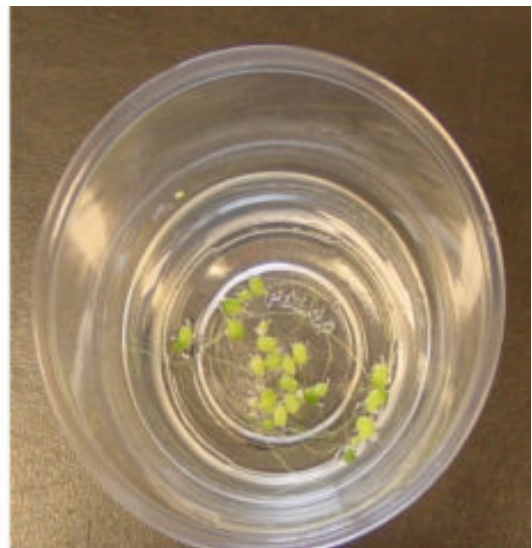
a)



b)



c)



d)

**Figure 2. Aspect général de *Lemna minor* en bonne santé et en mauvaise santé**

a) Croissance normale du témoin dans des gobelets d'essai en plastique contenant le milieu APHA modifié, les thalles affichant diverses nuances de vert. b) Culture expérimentale dans un milieu Hoagland (à gauche) et acclimatation d'une culture dans le milieu APHA modifié (à droite), toutes deux clairsemées. c) Colonies affichant des lésions sous forme de « morsure de serpent » attribuables à des carences à long terme en fer lorsqu'elles sont cultivées dans le milieu E+ Hoagland d'origine (EC, 1999b). d) Cultures présentant une chlorose (perte de chlorophylle/jaunissement) des thalles dans des gobelets d'essai en plastique.

**Tableau 1. Liste de contrôle des conditions et modes opératoires recommandés pour la culture de *Lemna minor***

Origine	– collection de cultures, fournisseurs de matériel biologique, laboratoires gouvernementaux ou privés; confirmation taxinomique de l'espèce et identification (si possible) du clone
Milieu de culture	– milieu E+ Hoagland modifié (v. le tableau 2); repiquage hebdomadaire dans un milieu frais
Température	– dans la gamme de $25 \pm 2$ °C
pH	– 4,4 à 4,8
Éclairage	– ininterrompu, lampe fluorescente à spectre continu ou l'équivalent; 64 à $90 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ à la surface du milieu de culture; dans l'ensemble de la zone de culture, écart maximal de 15 % du débit de fluence photonique choisi
Milieu d'essai	– 5 à 10 plantes repiquées d'une culture en tube d'une semaine dans le milieu stérile E+ Hoagland modifié et mises à incuber 7 à 10 jours dans les conditions d'essai
Acclimatation	– plantes de 7 à 10 jours provenant de la culture d'essai, repiquées dans un milieu d'essai frais 18 à 24 h avant l'essai
Critères de santé	– pour que la culture devant servir à l'essai soit acceptable, le nombre de thalles de départ doit être au moins 8 fois plus élevé (c.-à-d. $\geq 24$ thalles) le jour 7 dans une culture préparée pour surveiller l'état de santé des organismes; les plantes de la culture d'essai doivent sembler en bonne santé

Les cultures utilisées dans les essais toxicologiques (c.-à-d. les cultures d'essai) devraient être entreprises 7 à 10 jours avant le démarrage de l'essai. Pour optimiser la récolte de plantes possédant 2 ou 3 thalles, préparer une ou plusieurs cultures d'essai. Prélever 5 à 10 plantes dans un tube d'essai renfermant des cultures âgées d'une semaine et les transférer en asepsie dans une boîte de Petri de 150 mm de diamètre (ou tout autre récipient peu profond et stérile) renfermant au moins 1 à 1,5 cm ( $\geq 100$  mL) de milieu stérile E+ Hoagland et laisser incuber dans les conditions de l'essai. Les plantes des cultures d'essai ne devraient pas être en surnombre à la fin de l'incubation de 7 à 10 jours. On considère qu'il y a surnombre (encombrement) si les plantes couvrent plus des deux tiers de la superficie du milieu de croissance.

Pour déterminer si la culture d'essai satisfait aux critères de santé exposés en 2.3.8, on prépare chaque fois que l'on entreprend une culture d'essai un ou plusieurs récipients renfermant

environ 100 mL du milieu d'essai (milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié, selon celui qui sera utilisé dans l'essai).

On devrait préparer des cultures filles multiples d'une culture axénique de *Lemna* afin de s'assurer que l'on dispose d'au moins une culture stérile en cas de contamination<sup>15</sup>. Le maintien de la propreté du laboratoire, le recours à de bonnes techniques stériles et l'utilisation adéquate d'une hotte à flux laminaire sont des éléments essentiels de la culture axénique de *L. minor* (Acreman, 2006; voir l'annexe F).

On dépose une seule *Lemna* à trois thalles dans chaque récipient. En supposant que les cultures semblent saines (v. la note 8 et la figure 2), on considère qu'elles sont acceptables pour l'essai si

<sup>15</sup> On peut employer de plus grands récipients (p. ex. des flacons Erlenmeyer de 250 ou de 125 mL renfermant 100 ou 50 mL, respectivement, d'un milieu E+ Hoagland modifié) pour cultiver des plantes en santé, pourvu que les conditions stériles soient maintenues.

le nombre de thalles de départ (ou le nombre moyen de thalles si l'on utilise plusieurs récipients) dans le ou les récipients préparés pour surveiller l'état de santé de la culture est au moins 8 fois plus élevé (c.-à-d.  $\geq 24$  thalles) le jour 7 (v. 2.3.8).

Les cultures de plus de 10 jours deviennent encombrées et les plantes sont plus petites; on ne devrait pas les utiliser pour les essais. La culture d'essai se contamine facilement si elle est exposée à de l'air ou à du matériel non stériles. Si le milieu se trouble — signe de contamination bactérienne —, on ne peut pas utiliser les *Lemna* et il faut les remplacer par une culture non contaminée (v. 2.3.7).

La veille de la mise en route de l'essai, on rince deux fois dans le milieu d'essai (v. 3.4) un nombre suffisant de *L. minor* (culture non encombrée de 7 à 10 jours en milieu E+ Hoagland modifié), en remplaçant le milieu utilisé (milieu E+ Hoagland modifié) par du milieu d'essai frais (milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié). On devrait ensuite transférer les *Lemna* dans un récipient peu profond renfermant au moins 2 cm de milieu d'essai frais<sup>16</sup>. Les cultures ne devraient pas être encombrées (en d'autres termes, les *Lemna* ne devraient pas se chevaucher et au moins le tiers de la superficie du milieu devrait être exempt de thalles). Laisser incuber ces cultures d'acclimatation, dans les conditions de l'essai, pendant 18 à 24 h avant de les utiliser. Bien que l'on conserve les cultures mères de *Lemna* en asepsie, l'acclimatation et les essais n'ont pas lieu en milieu stérile. On recommande donc de

<sup>16</sup> Le SRC (1995) a tenté de prolonger l'acclimatation dans un milieu APHA modifié (milieu d'essai), mais a observé une dégradation accrue de la croissance des témoins avec l'allongement de la période de culture dans le milieu, notamment à la densité de chargement des plantes utilisée dans l'essai. Il a pu obtenir des plantes de bonne qualité jusqu'à 7 jours, mais leur qualité s'est dégradée par la suite et leur croissance a été faible au cours de l'essai. Il en a conclu qu'il est préférable de cultiver les *Lemna* dans un milieu « riche » tel que le milieu E+ Hoagland modifié, puis de les soumettre à une période définie de préculture dans le milieu expérimental avant l'essai en milieu « pauvre ».

prendre des précautions raisonnables pour éviter la contamination de la culture par les algues et manipuler les *Lemna* sous une hotte à flux laminaire (v. l'annexe F).

### 2.3.2 Installations et appareils

On doit cultiver les *Lemna* dans des installations à température et sous éclairage contrôlés (pièce, incubateur ou enceinte environnementale à température constante)<sup>17</sup>. La zone de culture devrait être bien ventilée pour empêcher des hausses locales de la température sous les rampes d'éclairage (ITM, 1990), tandis que l'air du système d'alimentation devrait être exempt d'odeurs et de poussières. Idéalement, l'installation de culture devrait être isolée de celle des essais afin de réduire le risque de contamination des cultures par les substances ou matières d'essai. On devrait aussi isoler les cultures des secteurs du laboratoire servant à la préparation des solutions mères ou des solutions expérimentales, à l'entreposage des effluents ou d'autres matières ou substances et au nettoyage de l'équipement.

Les récipients et les accessoires entrant en contact avec les cultures de *Lemna* et les milieux de culture doivent être faits d'un matériau non toxique et chimiquement inerte et, si nécessaire, ils devraient être stériles. Les matériaux tels que le verre borosilicaté (p. ex. Pyrex<sup>MC</sup>), l'acier inoxydable, la porcelaine, le nylon, le polystyrène haute densité ou le plastique de polyéthylène perfluoré (p. ex. Téflon<sup>MC</sup>) peuvent être utilisés pour réduire au minimum la lixiviation et la sorption. On peut utiliser des récipients en plastique uniquement si les *Lemna* n'adhèrent pas aux parois<sup>18</sup> et que la sorption de la substance d'essai sur le plastique n'excède pas la sorption sur le verre (ASTM, 1991). Les matériaux ou substances tels que le cuivre, le laiton, les métaux galvanisés, le plomb et le caoutchouc naturel ne

<sup>17</sup> Les bains d'eau ne sont pas acceptables, car ils entravent l'éclairage des récipients de culture (ASTM, 1991).

<sup>18</sup> Les gobelets en plastique peuvent être trempés dans de l'eau propre avant usage afin de diminuer la charge statique et, par conséquent, le risque d'adhésion des plantes aux parois.



doivent pas entrer en contact avec les récipients ou les milieux de culture, les *échantillons pour essai*, les récipients d'essai, l'*eau de dilution* ou les solutions *expérimentales*.

Les articles faits d'un matériau ou d'une substance autres que ceux mentionnés ici ne devraient pas être utilisés à moins que l'on ait démontré que leur emploi n'altère pas la qualité des cultures de *Lemna*. On devrait nettoyer et rincer à fond tous les récipients et accessoires de culture avec l'eau utilisée dans les cultures, avant de les employer à nouveau. Il faut nettoyer chimiquement et stériliser, avant emploi, la verrerie neuve et celle qui a déjà été utilisée (EC, 1992a). Tous les récipients de culture et d'essai devraient être dotés d'un couvercle transparent adéquat afin d'éviter l'empoussièrement et de réduire l'évaporation au minimum (v. 3.3).

L'équipement recommandé pour le maintien des cultures axéniques de *Lemna* comprend les éléments suivants : des anses d'inoculation jetables pour le transfert des *Lemna* en aseptie; un autoclave pour stériliser la verrerie et les milieux; une hotte stérile (à flux laminaire) pour maintenir les conditions axéniques pendant les transferts (v. l'annexe F)<sup>19</sup>.

### 2.3.3 Milieu de culture

Il faut utiliser le milieu E+ Hoagland modifié (SRC, 2003) pour cultiver les spécimens de *L. minor* qui serviront aux essais sur des eaux usées (p. ex. des effluents, des élutriats et des

<sup>19</sup> On recommande aux laboratoires dépourvus de telles hottes de manipuler et/ou de transférer les *Lemna* dans un petit espace préalablement stérilisé, où le débit de l'air est minime. On peut, à cette fin, construire une hotte en Plexiglass<sup>MC</sup> opaque dotée d'une lampe UV pour la stérilisation préalable du plan de travail. On peut laisser la lumière allumée lorsque la hotte ou la pièce servant aux transferts ne sont pas employées, mais il faut l'éteindre quand on emploie la hotte (les UV sont très dangereux pour la peau et les yeux). Il faut disposer d'un bec Bunsen et d'une source de gaz (ou d'un brûleur Bunsen portatif) pour appliquer les techniques de culture en aseptie (c.-à-d. passer à la flamme l'embouchure des tubes des cultures d'essai, les récipients de milieux de culture, etc.). On devrait manipuler le moins possible les plantes et les transférer le plus rapidement possible (Acreman, 1998).

lixiviats) ou des eaux réceptrices<sup>20</sup>. On donne au tableau 2 la composition chimique de ce milieu.

Pour préparer 1 L de milieu E+ Hoagland modifié, on ajoute les ingrédients suivants à 900 mL d'*eau désionisée* distillée sous verre (ou l'équivalent) :

Solution A	20 mL
Solution B	1 mL
Solution C	20 mL
Solution D	10 mL
Solution E	1 mL
Sucrose	10 g
Extrait de levure	0,10 g
Tryptone (bactotryptone) <sup>21</sup>	0,6 g

Les substances utilisées doivent être de qualité réactif. Le milieu est agité jusqu'à dissolution complète du contenu. On rajuste le pH pour qu'il se situe entre 4,4 et 4,8 au moyen de NaOH ou de HCl, puis on porte le volume à 1 L avec de l'*eau distillée*. Le milieu est autoclavé pendant 20 min à 121 °C et à 124,2 kPa (1,1 kg/cm<sup>2</sup>). On devrait conserver les solutions mères dans l'obscurité (c.-à-d. dans des bouteilles ambrées ou recouvertes) en raison de leur photosensibilité potentielle. Chaque solution mère (A, B, C, etc.)

<sup>20</sup> Le SRC (1995) a constaté que l'on peut obtenir des *Lemna* de la meilleure qualité à partir de cultures à croissance rapide dans le milieu E+ Hoagland de Cowgill et Milazzo (1989). Ce milieu est riche en nutriments organiques et inorganiques ainsi qu'en métaux traces. À l'issue de recherches menées ultérieurement, le SRC (2003) a apporté d'autres modifications au milieu E+ Hoagland (lequel est maintenant recommandé pour la méthode décrite ici) afin d'améliorer à long terme la santé des cultures de *L. minor*. Ces modifications incluent le remplacement de solutions distinctes de fer (Fe) et d'EDTA par une solution combinée (solution mère C) renfermant des concentrations plus élevées de Fe et d'EDTA (SRC, 2003). Le milieu APHA modifié n'est exigé qu'à titre de milieu d'essai du fait qu'il donne des thalles d'excellente qualité à court terme; il ne convient cependant pas pour la culture à long terme des *Lemna* (SRC, 1995).

<sup>21</sup> La peptone BDH 7213 trypsique de caséine constitue une solution de rechange acceptable à la bactotryptone (SRC, 1997).



**Tableau 2. Composition chimique des solutions mères nutritives entrant dans la préparation du milieu E+ Hoagland modifié (SRC, 2003), utilisé pour la culture de *Lemna minor***

Solution mère	Substance	Concentration	
		Solution mère (g/L)	Milieu <sup>a</sup> (mg/L)
A <sup>b</sup>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	59,00	1 180,0
	KNO <sub>3</sub>	75,76	1 515,2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00	680,0
B	Acide tartrique	3,00	3,00
C <sup>c</sup>	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,21	24,20
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O <sup>d</sup>	3,35	67,00
D	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50,00	500,0
E	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	2,86
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,22	0,22
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,12	0,12
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,08	0,08
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3,62	3,62
----	Sucrose	----	10,00 g/L
----	Extrait de levure	----	0,10 g/L
----	Bactotryptone	----	0,60 g/L

<sup>a</sup> Concentration de la substance dans le milieu.

<sup>b</sup> Ajouter 6 mL de HCl 6 N à la solution mère A.

<sup>c</sup> Ajouter 1,2 mL de KOH 6 N à la solution mère C.

<sup>d</sup> On peut employer le Na<sub>4</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O plutôt que le Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O. Dans un tel cas, les concentrations dans la solution mère et le milieu d'essai sont de 3,75 g/L et de 75 mg/L, respectivement, et le KOH ne devrait pas être ajouté à la solution mère C (v. la note c supra).

peut se garder un mois au réfrigérateur (4 °C), à la condition d'être isolée des solvants ou d'autres contaminants possibles. Une fois autoclavé, le milieu E+ Hoagland modifié que l'on a préparé peut être entreposé jusqu'à un mois à la température ambiante, dans l'obscurité<sup>22</sup>.

On peut utiliser d'autres milieux riches en nutriments (milieu SIS ou milieu Steinberg, p. ex.) pour conserver les cultures de *L. minor* qui seront utilisées pour les essais sur des substances chimiques seulement, pourvu que ces cultures soient conformes aux critères de santé des organismes à utiliser dans l'essai (v. 2.3.8).

### 2.3.4 Éclairage

Les organismes cultivés devraient être soumis à un éclairage fluorescent en spectre continu sans interruption ou à un éclairage équivalent<sup>23</sup>. Le débit de fluence photonique, mesuré au niveau du milieu de culture, devrait se situer entre 64 et 90  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (environ 4 000 à 5 600 lux)<sup>24</sup>. Étant donné que l'intensité lumineuse a tendance à varier dans un espace donné, on devrait la

<sup>22</sup> On peut préparer un lot important de milieu E+ Hoagland modifié, l'autoclaver en aliquotes plus petites (c.-à-d. en bouteilles de 1 L) et l'entreposer pour un usage ultérieur. Chaque aliquote devrait être employée peu de temps après son ouverture (elle ne doit pas être entreposée de nouveau pour un usage ultérieur) afin de réduire le risque de contamination du milieu. On ne devrait pas utiliser les solutions mères ou les milieux préparés qui renferment des précipités ou des algues ou qui montrent des signes de dégradation.

<sup>23</sup> On a utilisé des lampes fluorescentes blanc chaud et blanc froid pour la culture de *L. minor* (annexe C). L'éclairage en spectre continu, qui est recommandé pour la culture et les essais selon la présente méthode, est plus représentatif des conditions naturelles d'éclairage que les lampes blanc froid et il est de plus en plus utilisé dans les essais avec des plantes photosynthétiques (SRC, 1995).

<sup>24</sup> Aux fins de cette conversion des  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  en lux, on a supposé une longueur d'onde moyenne de 550 nm, qui est celle de nombreuses sources d'éclairage communément utilisées en laboratoire en lumière visible (p. ex. lampes fluorescentes blanc froid). Cependant, si la source lumineuse possède une qualité spectrale non centrée à 550 nm (soit à l'extérieur de la plage de 400 à 700 nm), la longueur d'onde supposée pour la conversion des  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  en lux devra être rajustée en conséquence (v. ASTM, 1995).

mesurer en plusieurs points dans la zone servant aux cultures (au niveau du milieu de culture) et elle ne devrait pas s'écarter de plus de  $\pm 15\%$  du débit de fluence photonique choisi.

### 2.3.5 Température

On devrait cultiver *L. minor* à  $25 \pm 2$  °C<sup>25</sup>. Si les cultures sont maintenues à l'extérieur de cette plage, la température doit être rajustée graduellement ( $\leq 3$  °C/jour) et gardée à l'intérieur de cette plage pendant au moins deux semaines avant le début de l'essai. Si la température dans les récipients de culture (ou dans un ou deux récipients supplémentaires servant à la surveillance de la température de l'eau) est fondée sur celle relevée dans l'incubateur ou la pièce à température contrôlée, à proximité des récipients de culture, par exemple, il faut établir et vérifier périodiquement le rapport entre les lectures et la température dans les récipients pour s'assurer que les plantes sont cultivées dans la plage de températures souhaitée.

### 2.3.6 pH

Le pH des cultures devrait se situer entre 4,4 et 4,8. Le pH du milieu E+ Hoagland modifié est de 4,6 environ, de sorte que les *Lemna* seront à ce pH lorsqu'elles seront transférées dans le milieu frais. Cependant, le pH dérive vers 7–8 à mesure que la culture vieillit pendant 7 à 10 jours dans le milieu E+ Hoagland modifié (Moody, 1998). On ne devrait pas rajuster le pH des cultures de *Lemna*.

### 2.3.7 Entretien des cultures

Chaque semaine, on devrait préparer plusieurs cultures mères dans le milieu E+ Hoagland modifié pour conserver la culture mère du laboratoire dans un état de croissance rapide (v. 2.3.1). Les cultures de *Lemna* qui n'ont pas

<sup>25</sup> Pour réduire la fréquence de l'entretien des cultures, par exemple lorsqu'on ne prévoit pas d'essai avec des *Lemna* pour un certain temps, on peut garder les plantes sous éclairage réduit et au frais (4–10 °C). Les repiquages peuvent alors être moins fréquents : une fréquence pouvant aller jusqu'à trois mois s'est révélée acceptable (OCDE, 1998, 2002). Selon la méthode suédoise (ITM, 1990), on peut garder les cultures mères à 8–10 °C sous éclairage tamisé (p. ex. 2 tubes fluorescents blanc chaud de 10 W).

été repiquées hebdomadairement doivent l'être en milieu frais au moins deux fois au cours des 14 jours précédant immédiatement l'essai, pour qu'elles reviennent à leur vitesse de croissance rapide. On devrait repiquer les *Lemna* chaque fois que l'on met sur pied un essai, et ce, afin de disposer d'un nombre convenable d'organismes acclimatés.

On devrait éviter, si possible, la stérilisation des cultures de *Lemna* contaminées (par des algues, des protozoaires, des champignons microscopiques et des bactéries, p. ex.). Il est fortement recommandé de jeter les cultures montrant des signes de contamination plutôt que de les traiter. Il est possible de procéder de cette façon si l'on maintient plusieurs cultures séparées. Si l'on ne peut pas éviter l'emploi de cultures stérilisées, il faut attendre au moins huit semaines après la stérilisation. On doit conserver un registre (notamment sur la date de la stérilisation, la méthode, les agents et la quantité employés, de même que les motifs du traitement) sur toutes les cultures que l'on aura décontaminées<sup>26</sup>.

<sup>26</sup> Si une culture mère contaminée (p. ex. par les algues) doit être stérilisée, un traitement de surface peut éliminer les organismes contaminants. On prélève un échantillon des plantes contaminées et on sépare les unes des autres les grappes de clones. Chaque plante devrait ensuite être trempée dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (v/v) pendant au moins 1 min. On peut utiliser un agent de blanchiment pour traiter les plantes pendant un laps de temps variable pour s'assurer qu'au moins une culture est à la fois stérile et vivante. On rince ensuite plusieurs fois les plantes dans une eau ou un milieu stériles, puis on les transfère dans un milieu de culture frais. Beaucoup de thalles mourront, plus particulièrement si leur exposition a été longue, mais certaines des plantes qui auront survécu seront sans doute exemptes de contamination. Les plantes dont la stérilisation est adéquate présentent une petite bande verte dans la zone de bourgeonnement, le long du centre du thalle. On peut utiliser les plantes survivantes pour l'inoculation de nouvelles cultures (v. l'annexe F) (AFNOR, 1996; OCDE, 1998, 2002; Acreman, 2006).

### 2.3.8 Critères de santé

Les cultures de *L. minor* à utiliser dans les essais toxicologiques doivent satisfaire aux critères de santé suivants :

- le nombre de thalles dans le ou les récipients préparés pour surveiller la santé des cultures doit être au moins 8 fois plus élevé au bout de 7 jours pour que les cultures expérimentales puissent servir dans un essai (en d'autres termes, le nombre moyen de thalles par récipient doit être d'au moins 24 après 7 jours).

À cette fin, on peut préparer des récipients d'essai<sup>27</sup> individuels contenant chacun 100 mL du milieu expérimental (milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié) qui servira dans un essai donné, chaque fois qu'une culture d'essai est mise en route (v. 2.3.1). De la culture mère, on transfère une seule *Lemna* à trois thalles dans chaque récipient et on laisse incubé 7 jours. On compte alors les thalles dans chaque récipient et, si le nombre moyen est au moins 8 fois plus élevé qu'au départ (c.-à-d.  $\geq 24$  thalles), la culture est considérée comme acceptable pour l'essai. Ces individus témoins ne doivent pas servir dans l'essai toxicologique.

L'aspect général de la culture d'essai (dans le milieu E+ Hoagland modifié) doit également être pris en compte. La culture doit être constituée de colonies jeunes, en croissance rapide, sans lésions visibles (v. 2.1, la note 8 et la figure 2). On doit utiliser pour l'essai des plantes qui semblent saines. Des thalles vert vif et l'absence de zones décolorées constituent des caractéristiques indicatives du bon état de santé des plantes.

Un laboratoire qui effectue régulièrement des essais toxicologiques devrait procéder tous les

<sup>27</sup> Différents types de récipients d'essai (gobelets en plastique, flacons Erlenmeyer et béchers, p. ex) donnent des résultats passablement différents dans le cas des témoins. Les laboratoires peuvent évaluer tant la pertinence de leur choix en matière de récipient d'essai que la santé de la culture si le récipient d'essai utilisé pour évaluer la santé de la culture est le même que celui qui sera employé pour les essais sur des substances ou des matières.

mois à des *essais toxicologiques de référence* avec la ou les cultures de *Lemna* dans les conditions et selon les modes opératoires exposés en 4.6. Il devrait aussi effectuer un essai toxicologique de référence en même temps que

l'essai toxicologique. Les critères connexes servant à juger de la santé et de la sensibilité de la culture, selon les conclusions de cet essai toxicologique de référence et des essais antérieurs de référence, sont énoncés à la sous-section 4.6.

## Section 3

# Système d'essai

### 3.1 Installations et appareils

L'essai d'inhibition de la croissance de *L. minor* doit se dérouler dans une pièce, un incubateur, une enceinte environnementale ou une installation équivalente maintenus à température constante, dotés d'une bonne commande de la température et d'un éclairage acceptable (v. 3.2). L'installation doit pouvoir maintenir la température moyenne quotidienne de toutes les solutions expérimentales à  $25 \pm 2$  °C (v. 4.3). Les conditions de l'essai (p. ex. qualité de l'éclairage, débit de fluence photonique et température) devraient être uniformes dans la totalité de l'enceinte environnementale. L'installation devrait être bien ventilée et être à l'abri des perturbations physiques ou de tous contaminants susceptibles d'avoir une incidence sur les organismes d'essai. Elle devrait aussi être isolée du local de culture des *Lemna*. Il faudrait réduire au minimum l'empoussièrément et les émanations dans les installations d'essai et de culture.

Aucun matériau de construction ni aucune pièce d'équipement susceptible d'entrer en contact avec les matières et les solutions d'essai et avec l'eau témoin/de dilution ne doit contenir de substance ou de matière pouvant être lixiviée dans les solutions à des concentrations qui pourraient être toxiques ou qui pourraient accroître la sorption des substances ou matières d'essai (v. 2.3.2). Le laboratoire doit être doté d'instruments pour mesurer les paramètres fondamentaux de la qualité de l'eau (température, conductivité, teneur en oxygène dissous, pH) et il devrait être en mesure de procéder à l'analyse rapide et précise d'autres paramètres tels que la dureté, l'alcalinité, la teneur en ammoniacque et en chlore résiduel.

Tous les instruments servant aux mesures courantes des paramètres physicochimiques et biologiques fondamentaux doivent être l'objet

d'un entretien convenable et d'un étalonnage régulier.

Les installations d'élimination devraient pouvoir accepter les déchets de laboratoire et toute matière contaminée (revêtement des bancs de travail, vêtements de laboratoire, etc.) (USEPA, 1996).

### 3.2 Éclairage

Les conditions d'éclairage auxquelles on soumet les organismes d'essai devraient être les mêmes que celles définies en 2.3.4. On recommande le recours à un éclairage fluorescent en spectre continu ou l'équivalent (v. la note 23). L'éclairage doit être maintenu pendant toute la durée de l'essai, et le débit de fluence photonique doit se situer entre 64 et 90  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$  (environ 4 000 à 5 600 lux; v. la note 24] à la hauteur où se trouvent les *Lemna* dans le milieu d'essai<sup>28</sup>. Le débit de fluence photonique, mesuré en plusieurs points de la zone d'essai au niveau du milieu d'essai, ne devrait pas varier de plus de  $\pm 15$  % de la valeur choisie<sup>29</sup>.

<sup>28</sup> Le type de photorécepteur utilisé pour mesurer le débit de fluence photonique peut influencer sur les résultats. Les photorécepteurs sphériques (qui réagissent à la lumière diffuse et réfléchie provenant de tous les angles au-dessous et au-dessus du plan mesuré) et les photorécepteurs hémisphériques (qui réagissent uniquement à la lumière au-dessus du plan mesuré) sont préférables aux récepteurs unidirectionnels et ils prêtent une valeur plus élevée aux sources lumineuses non ponctuelles (AFNOR, 1996).

<sup>29</sup> Pour les végétaux, l'intensité lumineuse et sa régulation peuvent être aussi importantes, sinon plus importantes, que le réglage du pH et de la température. On devrait vérifier le débit de fluence photonique dans l'ensemble de la zone d'essai avant le début de l'essai. On peut, au moyen d'étamine, atténuer l'éclairement dans certaines zones de l'installation expérimentale, afin d'obtenir les conditions lumineuses convenables (Staveley, 1998). On peut aussi délimiter la surface du milieu d'essai qui se trouve dans l'intervalle de  $\pm 15$  % du débit choisi de fluence photonique

### 3.3 Récipients d'essai

Il est recommandé d'utiliser des gobelets jetables en polystyrène ou des fioles Erlenmeyer. Des cristallisoirs, des boîtes de Petri et des béciers en verre peuvent aussi être employés<sup>30</sup>; cependant, on devrait utiliser le même type et la même taille de récipient dans tout le laboratoire<sup>31</sup>. Des récipients en verre devraient être utilisés pour les essais sur les substances chimiques (section 5). Les récipients doivent être suffisamment larges pour permettre la croissance des thalles dans les récipients témoins, sans qu'ils se recouvrent à la fin de l'essai. Le fait que les radicelles touchent le fond du récipient n'a pas d'importance, mais il est conseillé de prévoir une profondeur minimale de 4 cm de solution. Le récipient doit contenir au moins 100 mL de solution au cours de l'essai, et l'on recommande 150 mL<sup>32</sup>.

On devrait couvrir les récipients d'essai pour éviter l'éventuelle contamination des milieux par l'air ainsi que la perte des constituants volatils. On recommande d'utiliser des couvercles en polystyrène qui s'ajustent sur les gobelets en plastique, ou encore des couvercles ou fonds de boîte de Petri qui couvrent le dessus des flacons Erlenmeyer; d'autres couvercles peuvent également convenir<sup>33</sup>. Dans un essai donné, les

---

pour exclure la surface où ce paramètre ne convient pas (Moody, 1998).

<sup>30</sup> Il faudrait faire preuve de prudence dans le cas des béciers, car ils ont eu des effets négatifs importants sur le nombre et la santé des thalles au cours d'essais faisant appel à ce type de récipients (SRC, 2003).

<sup>31</sup> Les variations de taille des récipients peuvent avoir un effet sur les résultats de l'essai en influant sur la profondeur et la surface relatives de la solution d'essai ou sur d'autres variables, par des voies encore non élucidées.

<sup>32</sup> Jonczyk et Gilron (1996) ont établi que des récipients d'essai plus volumineux (100 mL) favorisaient davantage la croissance que les petits (50 mL).

<sup>33</sup> Les couvercles transparents permettent l'éclairage des organismes, tout en réduisant au minimum l'évaporation de la solution et en atténuant les risques de contamination de cette dernière. Cependant, il n'est pas recommandé d'utiliser des verres de montre comme couvercles en raison d'une perte excessive de milieu d'essai par le biais de l'évaporation et de la hausse possible de la réflexion de la lumière (SRC, 2003).

récipients d'essai et les couvercles (c.-à-d. leur type, leur taille et leur forme), de même que la profondeur et le volume des solutions, doivent tous être identiques.

Les récipients d'essai devraient être placés sur un fond noir antireflet (p. ex. un carton noir pour affiche) pendant toute la durée de l'essai<sup>34</sup>. Il convient d'évaluer tout nouveau système expérimental (p. ex. récipients, couvercles, conditions d'éclairage et de température) au moyen d'un essai non toxicologique dans lequel seul le milieu d'essai est utilisé dans tous les récipients. À la fin de cet essai, le coefficient de variation (CV) du nombre de thalles et de la masse sèche des thalles devrait être inférieur à 20 %.

### 3.4 Eau témoin/de dilution

Dans un essai donné, la même eau doit servir à préparer les dilutions des échantillons et les témoins. Le choix de l'eau témoin/de dilution dépend de la substance ou de la matière d'essai, des objectifs de l'essai ainsi que de la logistique, des considérations pratiques et des coûts du prélèvement des échantillons (v. les sections 5 à 7). Ces facteurs pourraient donc mener au choix du type précis d'eau témoin/de dilution qui convient le mieux à la situation. On recommande pour cela le milieu d'essai, qui est constitué d'eau désionisée ou distillée sous verre à laquelle on a ajouté des produits chimiques de qualité réactif (c.-à-d. des nutriments pour la croissance des *Lemna*).

On recommande trois milieux d'essai pour la présente méthode; le choix de ces milieux est

---

<sup>34</sup> Dans une série d'études visant à déterminer l'incidence des écarts méthodologiques entre la norme provisoire de l'ISO et la méthode d'essai d'Environnement Canada faisant appel à *L. minor*, Moody a établi qu'il y avait amélioration de l'aspect des thalles et de leur état de santé en général (c.-à-d. le nombre, la couleur et l'uniformité) lorsque les récipients étaient placés sur un fond noir pendant la durée de l'essai. Un fond noir réduit la quantité de lumière réfléchissante à laquelle les thalles sont exposés, ce qui permet de recourir à des intensités lumineuses plus élevées (c.-à-d. celles recommandées par l'ISO) (SRC, 2003).



fonction de la nature de la substance d'essai. Dans le cas d'une eau usée (v. 6.3) et d'une eau réceptrice (v. 7.3), il faut utiliser comme eau témoin/de dilution un milieu de croissance APHA modifié (SRC, 1997)<sup>35</sup>. En ce qui concerne les substances chimiques, les produits commerciaux ou les mélanges connus (v. 5.3), on devrait utiliser le milieu de croissance de l'Institut des normes de Suède (SIS) modifié (OCDE, 1998, 2002) ou le milieu de croissance Steinberg modifié (ISO, 2005)<sup>36</sup>.

On peut aussi utiliser comme eau témoin/de dilution un échantillon d'eau réceptrice ou d'eau d'amont (prélevé près de la source de contamination, mais en retrait de cette dernière ou en amont de la source), enrichie des mêmes nutriments de qualité réactif et à la même concentration que ceux ayant servi à constituer le milieu de croissance APHA modifié (eau réceptrice enrichie de nutriments), pour les essais sur les effluents (v. 6.3) ou les eaux réceptrices

<sup>35</sup> Le milieu APHA modifié diffère du milieu décrit dans la méthode d'essai avec *L. minor* de l'American Public Health Association (APHA et coll., 1992) (SRC, 1995). Notamment, on ajoute du KCl, on omet l'EDTA et on stabilise le pH par aération (SRC, 1995) (v. l'annexe D, tableau 9).

L'ajout de KCl a à peu près doublé la teneur en potassium du milieu APHA d'origine, ce qui a accéléré la croissance des thalles et entraîné une reproductibilité plus grande tant de la croissance des thalles que des résultats obtenus avec les toxiques de référence. L'EDTA est omis puisqu'il est susceptible d'interagir avec certaines substances ou matières (p. ex. les métaux) présentes dans les échantillons pour essai et de modifier ainsi la toxicité. La dérive du pH, observée dans le milieu APHA d'origine, a été supprimée (stabilisation du pH) par l'inclusion d'une période d'aération de 1–2 h après la préparation du milieu (SRC, 1995).

<sup>36</sup> Dans la version provisoire de l'essai de l'OCDE mesurant l'inhibition de la croissance de *Lemna*, il est recommandé d'utiliser le milieu de croissance SIS pour les essais sur des substances avec *L. minor* (OCDE, 1998, 2002). Dans la version provisoire de l'essai de l'ISO mesurant également l'inhibition de la croissance de *L. minor*, on recommande l'emploi du milieu Steinberg modifié pour les essais sur des substances ou des matières qui ne sont pas constituées de métaux principalement.

(v. 7.3)<sup>37</sup>. Si l'on souhaite évaluer l'effet toxique d'un produit ou d'un composé chimiques précis sur une eau réceptrice donnée, on peut utiliser comme eau témoin/de dilution l'eau réceptrice à laquelle on a ajouté la même concentration de nutriments que celle ayant servi à la préparation du milieu SIS ou du milieu Steinberg modifié (v. 5.3). Dans un cas comme dans l'autre, si l'on utilise de l'eau réceptrice enrichie de nutriments, il faut d'abord la passer sur des filtres en fibre de verre (à ouvertures d'environ 1 µm, p. ex. filtre Whatman GF/C) pour réduire la possibilité de contamination du milieu d'essai par les algues, puis on peut la passer sur des filtres à ouvertures de 0,22 µm pour supprimer tout risque résiduel de contamination bactérienne ou algale (SRC, 1997). Les conditions de prélèvement, de transport et d'entreposage de l'eau de surface devraient être conformes à celles décrites en 6.1.

Le milieu d'essai ou l'eau réceptrice enrichie de nutriments (servant d'eau témoin et d'eau de dilution) doivent être préparés selon les indications des sections 5, 6 et 7 et être réglés à la température de 25 ± 2 °C avant emploi (v. 4.1).

<sup>37</sup> On peut utiliser de l'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution si l'on souhaite obtenir des renseignements sur l'emplacement précis où s'exercent l'effet ou les effets toxiques d'un effluent, d'un éluat ou d'un lixiviat sur une eau réceptrice particulière. L'eau d'amont peut servir d'eau témoin/de dilution des échantillons d'eau réceptrice prélevés à proximité d'un point de rejet, d'un lieu de déversement de produits chimiques ou de toute autre source ponctuelle de contamination.

## Section 4

### Procédures d'essai universelles

Les procédures énoncées dans la présente section s'appliquent à chacun des essais toxicologiques prévus pour des échantillons de substances chimiques, d'eau usée ou d'eau réceptrice décrits aux sections 5, 6 et 7. Tous les aspects du système d'essai présenté à la section 3 doivent être intégrés dans les procédures d'essai universelles. Le tableau 3 décrit, sous forme de liste de contrôle, les procédures universelles recommandées pour la réalisation d'essais d'inhibition de la croissance de *L. minor*, de même que les conditions et procédures applicables à des types précis de substances ou de matières.

On décrit les procédures universelles pour la réalisation d'un essai toxicologique de 7 jours selon les deux options suivantes :

- 1) un essai sans renouvellement des solutions;
- 2) un essai à renouvellement intermittent des solutions, au moins tous les trois jours, au cours de l'essai.

Pour les solutions expérimentales dans lesquelles la concentration de la substance d'essai (ou d'un constituant biologiquement actif) risque de diminuer notablement au cours de l'essai<sup>38</sup>, du fait de facteurs tels que la volatilisation, la photodégradation, la précipitation ou la

biodégradation, on recommande la seconde option (ITM, 1990; OCDE, 1998, 2002)<sup>39</sup>.

Les paramètres biologiques mesurés sont l'augmentation du nombre de thalles au cours de l'essai, de même que la masse sèche de ces derniers à la fin de l'essai.

#### 4.1 Préparation des solutions d'essai

Il faut nettoyer et rincer à fond tous les récipients, les dispositifs de mesure, les agitateurs, les appareils de transfert (p. ex. les anses d'inoculation) et toutes les autres pièces d'équipement, conformément aux modes opératoires normalisés (v. EC, 1992a, pour ce qui concerne le nettoyage de la verrerie). Au dernier rinçage, on devrait utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour les articles à utiliser immédiatement dans les préparatifs de l'essai. Si ces articles doivent être rangés, il faudrait les rincer dans l'eau distillée ou désionisée, les sécher à l'étuve et les recouvrir pour éviter leur contamination avant emploi.

Dans un essai donné, il faut utiliser la même eau témoin/de dilution (milieu d'essai) pour préparer les solutions témoins et toutes les concentrations d'essai. On devrait préparer cette eau de la façon exposée en 5.3, 6.3 ou 7.3 selon que l'essai porte sur des substances chimiques, une eau usée ou une eau réceptrice, respectivement.

<sup>38</sup> La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur, de même que d'autres renseignements utiles recueillis sur la substance d'essai (v. 5.1), aideront à déterminer si, au cours de l'essai, les pertes de la substance sont susceptibles d'être importantes et s'il y a lieu de prendre des mesures pour les limiter (OCDE, 1998, 2002). Les données recueillies antérieurement (c.-à-d. les renseignements sur les échantillons d'eau usée) peuvent servir à déterminer si l'essai à renouvellement intermittent doit être privilégié.

<sup>39</sup> Wang (1991) a montré la valeur et la pertinence de l'essai à renouvellement intermittent dans le cas de l'évaluation de substances instables avec *L. minor*. Il a constaté que l'azote ammoniacal non ionisé n'inhibait pas la croissance des *Lemna* jusqu'à la concentration de 8,85 mg/L au cours d'essais sans renouvellement; cependant, dans les essais à renouvellement quotidien, les concentrations supérieures à 3,0 mg/L ont entravé la croissance de cette plante d'au moins 20 %, tandis qu'une concentration de 7,16 mg/L a réduit sa croissance de 50 % (CI<sub>50</sub>).



**Tableau 3. Liste de contrôle des conditions et des procédures recommandées pour les essais toxicologiques avec *Lemna minor***

<b>Essai universel</b>	
Type d'essai	– essai sans renouvellement ou à renouvellement intermittent; essai de 7 jours
Renouvellement des solutions	– tous les trois jours au moins, uniquement dans l'essai à renouvellement intermittent
Eau témoin/de dilution	– milieu d'essai (milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié); eau réceptrice enrichie de nutriments (les mêmes que ceux utilisés pour le milieu d'essai) afin d'évaluer l'effet toxique à un emplacement donné (dans ce cas, il faut un témoin supplémentaire, constitué du milieu d'essai)
Organismes d'essai	– <i>L. minor</i> provenant d'une culture de 7–10 jours (culture d'essai), acclimatées pendant 18–24 h dans le milieu d'essai; 2 plantes à 3 thalles par répétition
Nombre de concentrations	– au moins 7, plus le ou les témoins; il est recommandé d'en utiliser un plus grand nombre (c.-à-d. au moins 8), plus le ou les témoins
Nombre de répétitions	essai à concentration unique : – ≥3 répétitions par traitement  essai à concentrations multiples : – ≥4 répétitions par traitement pour un essai avec un nombre identique de répétitions; ou – pour un modèle de régression, nombre de répétitions variable selon les traitements : • 6 répétitions pour le ou les témoins • 4 répétitions pour les 3–5 concentrations d'essai les plus basses • 3 répétitions pour les 4–5 concentrations d'essai les plus élevées
Récipients et solution	– gobelets jetables en polystyrène ou fioles Erlenmeyer de préférence; des cristallisoirs, des boîtes de Petri ou des bécchers en verre peuvent aussi être utilisés; à la fin de l'essai, chez les témoins, les thalles de <i>Lemna</i> ne doivent pas se chevaucher; volume d'au moins 100 mL, de préférence 150 mL; récipients couverts – de préférence, récipients d'essai placés sur un fond noir antireflet pendant la durée de l'essai
Température	– moyenne quotidienne de $25 \pm 2$ °C tout au long de l'essai
Filtration	– aucune pour les échantillons d'eau usée, sauf si des algues sont présentes; on doit passer les échantillons d'eau réceptrice ou les échantillons d'eau usée mêlés à de l'eau réceptrice sur un filtre en fibre de verre (taille des pores ~1 µm); passage supplémentaire facultatif sur filtre à ouvertures de 0,22 µm
Enrichissement au moyen de nutriments	– enrichissement des échantillons pour essai avec les mêmes nutriments et aux mêmes concentrations que le milieu d'essai; les échantillons d'eau réceptrice ou d'eau usée contenant des algues sont enrichis après filtration (si la filtration de l'échantillon est exigée)

Tableau 3. (suite)

Aération	– aération préalable des échantillons d'eau usée et d'eau réceptrice, à débit lent (p. ex. 100 bulles/min), pendant 20 min, avant la mise en route de l'essai ou le renouvellement des solutions
pH	– aucun rajustement si le pH de la solution d'essai se trouve dans la plage de 6,5 à 9,5 pour les essais en milieu APHA modifié, de 6,0 à 8,0 pour ceux en milieu SIS et de 5,0 à 8,0 pour ceux en milieu Steinberg modifié; si le pH se situe à l'extérieur de cette plage, un deuxième essai pourrait être exigé ou pourrait convenir (avec rajustement du pH)
Éclairage	– en spectre continu (lampes fluorescentes ou l'équivalent); l'éclairage doit être ininterrompu et le débit choisi de fluence photonique doit être de 64 à 90 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ à la surface de la solution d'essai; dans toute la zone d'essai, ce débit devrait se situer à $\pm 15\%$ de l'intensité choisie d'éclairage
Observations	– nombre de thalles et aspect des plantes au début de l'essai et à la fin (jour 7); masse sèche à la fin de l'essai; dénombrement facultatif des thalles en deux autres occasions au cours de l'essai, pour calculer la vitesse de croissance
Mesures	– mesure quotidienne de la température dans des récipients représentatifs; dans un essai sans renouvellement, mesure du pH au début et à la fin de l'essai dans des concentrations représentatives; dans un essai à renouvellement intermittent, mesure du pH au début et à la fin de l'essai, de même qu'avant et après chaque renouvellement de la solution d'essai, dans des concentrations représentatives; mesure du débit de fluence photonique en plusieurs points de la zone d'essai, une fois au cours de l'essai
Paramètres	– croissance des plantes, d'après l'augmentation du nombre de thalles au cours de l'essai et la masse sèche à la fin de l'essai; $CI_p$ s'il s'agit d'un essai à concentrations multiples
Toxique de référence	– Ni ou KCl; essai de 7 jours pour déterminer la $CI_p$ (croissance) réalisé dans les 14 jours de la période d'essai, selon la même procédure (milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié) que dans l'essai définitif
Validité de l'essai	– essai invalide si, à la fin de la période d'essai de 7 jours, le nombre de thalles chez les témoins n'est pas au moins 8 fois plus élevé qu'au départ (en d'autres termes, le nombre moyen de thalles par récipient témoin est supérieur à 48 à la fin de l'essai)
<b>Substances chimiques</b>	
Solvants	– seulement dans des circonstances spéciales; concentration maximale de 0,1 mL/L; un deuxième témoin avec solvant est nécessaire
Concentration	– essai sans renouvellement : mesures recommandées au début et à la fin de l'exposition, aux concentrations élevée, médiane et faible, de même que chez le ou les témoins; essai à renouvellement intermittent : au début et à la fin de chaque période de renouvellement des solutions, aux concentrations élevée, médiane et faible, de même que chez le ou les témoins
Eau témoin/de dilution	– milieu SIS ou milieu Steinberg modifié; milieu APHA si l'essai porte sur des métaux; on peut utiliser de l'eau réceptrice enrichie de nutriments s'il s'agit d'évaluer des effets toxiques locaux

Tableau 3. (suite)

<b>Effluents, éluviats et lixiviats</b>	
Échantillons exigés	– pour un essai sans renouvellement réalisé hors site, prélèvement (ou préparation s'il s'agit d'un éluviat) d'un seul échantillon; pour un essai à renouvellement intermittent réalisé hors site, soit 3 sous-échantillons d'un seul prélèvement ou au moins 3 échantillons distincts prélevés (ou préparés s'il s'agit d'un éluviat), puis manipulés de la façon indiquée en 6.1; pour les essais réalisés sur place, on prélève les échantillons tous les 3 jours et on les utilise dans les 24 h; volumes d'au moins 1 L (essai à concentration unique) ou d'au moins 4 L (essai à concentrations multiples)
Transport et entreposage	– si l'échantillon est chaud ( $>7$ °C), il faut le refroidir à $1-7$ °C avec de la glace ordinaire (et non de la glace sèche) ou avec des sachets congelés, dès le prélèvement; transport dans l'obscurité à $1-7$ °C (de préférence $4 \pm 2$ °C), en employant de la glace ordinaire ou des sachets congelés, au besoin; l'échantillon ne doit pas geler durant le transport ou l'entreposage; garder dans l'obscurité à $4 \pm 2$ °C; utiliser dans les essais le plus tôt possible après le prélèvement et, obligatoirement, dans les 3 jours suivant le prélèvement de l'échantillon ou l'extraction de l'éluviat
Eau témoin/de dilution	– milieu APHA modifié; on peut utiliser de l'eau réceptrice enrichie de nutriments pour la surveillance et la conformité
<b>Eau réceptrice</b>	
Échantillons exigés	– comme sous la rubrique « Effluents, éluviats et lixiviats »
Transport et entreposage	– comme sous la rubrique « Effluents, éluviats et lixiviats »
Eau témoin/de dilution	– milieu APHA modifié; eau réceptrice d'amont enrichie de nutriments s'il s'agit d'évaluer l'effet ou les effets locaux

Les caractéristiques de l'eau témoin/de dilution utilisée tout au long de l'essai devraient être uniformes. Dans le cas d'un essai à renouvellement intermittent, on améliore l'uniformité dans l'échantillon si l'on entrepose

convenablement un volume suffisant d'eau témoin/de dilution pour parachever l'essai et si l'on en utilise des aliquotes pour le renouvellement périodique des solutions d'essai (sous-section 4.3).

Si l'on utilise comme eau témoin/de dilution de l'eau réceptrice ou de l'eau d'amont afin de simuler les conditions locales — comme un rejet d'effluent, un déversement de produits chimiques ou une pulvérisation de pesticides —, il faut préparer une deuxième solution témoin à l'aide du milieu d'essai (milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié; v. 5.3, 5.6, 6.3 et 6.6). On ne peut pas utiliser d'eau d'amont ou d'eau réceptrice s'il est évident que cette eau est toxique et qu'elle entraîne des résultats invalides chez le témoin, selon les critères de la présente méthode<sup>40</sup>. Dans ce cas, on devrait utiliser le milieu d'essai comme eau témoin/de dilution.

<sup>40</sup> Les contaminants déjà présents dans l'eau réceptrice pourraient ne pas influencer par eux-mêmes sur les témoins, mais ils pourraient modifier la toxicité de la substance ou de la matière d'essai. Dans ce cas, de l'eau de dilution non contaminée (milieu d'essai) donnerait une estimation plus précise de la toxicité individuelle de la substance ou de la matière d'essai, mais pas nécessairement de la totalité de l'effet toxique local.

Si l'essai vise à déterminer l'effet d'une substance ou d'une matière sur une eau réceptrice donnée, on devrait utiliser cette dernière comme eau témoin/de dilution, sans égard au fait que cette eau atténue la toxicité (p. ex. par la présence d'acides humiques) ou l'accroît (p. ex. par les effets additifs du toxique dans l'eau réceptrice). Si un surcroît de toxicité est imputable à l'eau réceptrice, il conviendrait d'inclure dans l'essai, à tout le moins, un deuxième témoin du milieu d'essai de laboratoire et, au plus, une autre série de concentrations utilisant ce milieu d'essai non pollué comme eau de dilution.

Si l'essai vise à déterminer dans quelle mesure une eau réceptrice donnée peut modifier la toxicité d'une matière ou d'une substance d'essai en raison de ses caractéristiques physicochimiques (p. ex. dureté, pH, turbidité, teneur en acide humique ou en acide fulvique) et/ou de la présence d'autre contaminants, le responsable de l'essai pourrait choisir d'utiliser l'eau d'amont pour préparer les concentrations expérimentales et en tant que solution d'essai parmi d'autres. La comparaison des résultats obtenus avec cette eau et avec les témoins maintenus dans l'eau de laboratoire permettra de cerner les réponses toxiques susceptibles d'être attribuables à l'eau d'amont. Pour mieux comprendre l'influence qu'exerce chaque type d'eau témoin/de dilution sur la toxicité de la matière ou de la substance d'essai, on peut effectuer une comparaison parallèle des effets toxiques en utilisant chaque eau témoin/de dilution pour préparer une série de concentrations expérimentales.

Il faut rajuster, au besoin, la température de l'eau témoin/de dilution et celle de l'échantillon ou de chaque solution expérimentale à  $\pm 2$  °C de la température d'essai, avant le début de l'essai. On peut rajuster la température de l'échantillon ou des solutions d'essai par chauffage ou refroidissement dans un bain d'eau, mais on ne doit pas utiliser un thermoplongeur, car cela pourrait altérer la composition chimique et la toxicité.

S'il faut filtrer un échantillon (d'eau réceptrice ou d'eau usée renfermant des algues, p. ex.), on le passe sur un filtre en fibre de verre (taille des pores d'environ 1  $\mu\text{m}$ , p. ex. filtre Whatman GF/C) avant l'essai (v. 6.2 et 7.2). On enregistre ensuite le pH de l'échantillon. On ajoute à l'échantillon d'eau usée ou d'eau réceptrice une aliquote de chacune des solutions mères nutritives utilisées pour préparer le milieu APHA modifié (c.-à-d. des solutions mères A, B et C), à raison de 10 mL d'aliquote par 1 000 mL d'échantillon. L'échantillon est ainsi dilué à 97 % de sa valeur initiale, ce qui représente la concentration maximale d'eau usée ou d'eau réceptrice (ou de tout autre échantillon exigeant une dilution de volume à volume) que l'on peut soumettre à l'essai. Les concentrations nominales des solutions corrigées en fonction du volume de solution mère nutritive (ou, dans le cas des substances chimiques, les concentrations mesurées; v. 5.4) sont adoptées comme concentrations d'essai.

Il faut ensuite aérer les échantillons d'effluent, d'éluviat, de lixiviat ou d'eau réceptrice avant de les employer pour préparer les solutions d'essai. L'aération préalable des échantillons d'eau usée et d'eau réceptrice enrichis permet d'équilibrer ceux-ci avec les nutriments ajoutés et d'en stabiliser le pH, après ajout des solutions mères nutritives. On devrait fournir l'air comprimé (exempt d'huile) par un flexible à embout jetable en verre ou en plastique (p. ex. tube capillaire ou pipette à cône d'Eppendorf) percé d'un petit orifice (p. ex. 0,5 mm de diamètre intérieur). Son

débit ne devrait pas excéder 100 bulles/min<sup>41</sup>, et sa durée doit être de 20 min<sup>42</sup>.

On pourrait devoir rajuster le pH de l'échantillon ou des solutions (v. 4.3.1). Il faudrait normalement utiliser à cette fin de l'acide chlorhydrique (HCl) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH)  $\leq 1 N$ . Dans certains cas (p. ex. échantillons d'effluents fortement tamponnés), on pourrait devoir utiliser des solutions plus concentrées d'acide ou de base.

Pour tout essai visant à estimer la  $CI_p$  (v. 4.5), il faut préparer au moins 7 concentrations plus une solution témoin (100 % de milieu d'essai); on recommande de préparer un nombre plus grand ( $>8$ , plus un témoin) pour augmenter la probabilité que chaque paramètre visé soit encadré. Les dilutions convenables peuvent suivre une progression géométrique, chaque concentration successive étant la moitié moins élevée que celle qui précède (p. ex. 100, 50, 25, 12,5, 6,3, 3,1 et 1,6 ou, dans le cas d'échantillons d'eau usée et d'eau réceptrice, 97, 48,5, 24,3, 12,1, 6,1, 3,0 et 1,5). On peut choisir les concentrations d'essai dans une autre série de dilutions convenable (p. ex. 100, 75, 56, 42, 32, 24, 18, 13, 10 et 7,5; v. la colonne 7 à l'annexe G). Habituellement, un rapprochement des concentrations supérieur à une dilution de 50 % n'améliore pas beaucoup la précision de l'essai. Dans les essais courants, le coefficient de dilution ne devrait pas être inférieur à 0,3, parce que cela mène à une estimation peu précise du paramètre ultime de mesure de la toxicité. Si l'incertitude entourant les concentrations toxiques est considérable, on devrait utiliser un plus grand nombre de concentrations pour obtenir un plus

<sup>41</sup> Une aération plus vigoureuse pourrait entraîner les constituants volatils de l'échantillon ou accélérer leur oxydation et dégradation en d'autres substances ou matières. C'est pourquoi on utilise un débit minimal (100 bulles/min) et une durée minimale (20 min) pour l'aération préalable des échantillons d'eau usée et d'eau réceptrice.

<sup>42</sup> Le débit et la durée de l'aération préalable sont en harmonie avec ceux d'autres méthodes d'essai biologique d'Environnement Canada (EC 1992b, 1992c).

grand étalement plutôt que d'utiliser un coefficient de dilution plus faible pour espacer davantage les concentrations.

Les dilutions peuvent être préparées directement dans les récipients d'essai. On transfère d'abord à la pipette les volumes convenables d'eau témoin/de dilution dans chaque récipient d'essai. On ajoute ensuite dans chaque récipient d'essai l'échantillon préalablement aéré enrichi de nutriments, puis on mélange bien le tout pour obtenir les concentrations d'essai recherchées. On peut aussi préparer les dilutions d'essai dans des fioles jaugées, puis les répartir dans les récipients de répétition. Ces récipients sont laissés à la température ambiante pendant 1 h pour permettre l'équilibrage du milieu et du toxique.

Lorsque l'incertitude au sujet de la toxicité d'un échantillon est appréciable, il est avantageux de réaliser un essai préliminaire dans le seul but de choisir les concentrations à utiliser dans l'essai définitif. Les conditions et procédures de l'essai préliminaire devraient être identiques à celles de l'essai définitif; cependant, le plan expérimental pourrait différer. Une large gamme de concentrations (p. ex. au moins deux ordres de grandeur) devrait faciliter le choix des concentrations de l'essai définitif.

Pour les essais à concentration unique menés à des fins réglementaires (p. ex. satisfaisant ou non satisfaisant), on ferait normalement appel à un effluent, un lixiviat, une eau réceptrice ou un éluviat non dilués (ou, dans le cas de la présente méthode, à 97 % de sa concentration d'origine) ou à une concentration arbitraire ou prescrite de substance chimique. Pour les témoins, on appliquerait le même principe que pour les essais à concentrations multiples. La présente méthode ne décrit pas spécifiquement les essais à concentration unique, mais les modes opératoires sont évidents et tous les éléments s'appliquent, sauf que l'essai n'emploie qu'une seule concentration et un seul témoin.

Pour un essai à concentration unique, il faut prévoir au moins trois récipients de répétition et



autant de récipients témoins. Pour un essai à concentrations multiples, on peut avoir recours à un nombre égal ou inégal de répétitions pour tous les traitements. Si l'on opte pour un nombre égal, il faut prévoir au moins quatre récipients de répétition pour chaque traitement. Par ailleurs, on peut utiliser un nombre inégal de répétitions pour tous les traitements (modèle de régression) lorsqu'on dispose de données historiques et/ou que le laboratoire a acquis de l'expérience en ce qui a trait aux mesures de la dose-réponse<sup>43</sup>. Si l'on opte pour un nombre inégal de répétitions pour tous les traitements, il faudrait préparer six récipients de répétition pour le ou les témoins, quatre récipients pour les trois à cinq concentrations d'essai les plus basses et trois récipients pour les quatre ou cinq concentrations les plus élevées.

## 4.2 Démarrage de l'essai

On devrait entreprendre l'essai après avoir préparé les solutions et apporté les ajustements autorisés ou nécessaires à la température, au pH et aux filtrations (v. 4.1, 6.2 et 7.2).

Les thalles de *Lemna* doivent provenir de cultures satisfaisant aux exigences énoncées en 2.3 et aux critères de santé exposés en 2.3.8. Pour les essais à concentrations multiples, on choisit dans la culture acclimatée des plantes à trois thalles, de taille et d'état identiques (ou aussi identiques que possible)<sup>44</sup>. On peut transférer directement les plantes de la culture acclimatée dans les gobelets qui serviront aux essais; on peut aussi les déposer dans un plat peu profond renfermant du milieu d'essai frais avant de les transférer dans les gobelets. Cette dernière façon de faire est

<sup>43</sup> Le plan non équilibré du modèle de régression (c.-à-d. un nombre inégal de répétitions pour les différents traitements) n'exige pas d'efforts supplémentaires, mais permet de mettre davantage l'accent, au besoin, sur la courbe dose-réponse.

<sup>44</sup> Pour l'essai, il faut utiliser des plantes qui semblent en bon état. Des thalles vert vif, sans zone décolorée ni ébauche supplémentaire de thalles, constituent des caractéristiques indicatives du bon état de santé des plantes (v. la figure 2).

particulièrement utile, car on peut ainsi s'assurer que le nombre de *Lemna* convient et que les plantes sont de qualité identique avant le démarrage de l'essai (Moody, 1998).

On doit mettre un nombre identique de thalles dans chaque récipient d'essai. Pour démarrer l'essai, on attribue au hasard deux *Lemna* à trois thalles à chaque récipient d'essai et on les y transfère (pour un total de six thalles par récipient) à l'aide d'une anse d'inoculation stérile en plastique jetable. On immerge brièvement les plantes dans la solution d'essai. On doit veiller à ne pas contaminer les *Lemna* désignées pour l'essai pendant le transfert dans les gobelets individuels. Si les plantes sont choisies directement à même la culture acclimatée ou dans un seul plat de *Lemna* rincées désignées pour l'essai (voir ci-dessus), on devrait utiliser une anse distincte pour chaque plante ou on devrait rincer l'anse dans de l'eau distillée/désionisée avant de la plonger de nouveau dans le plat de *Lemna* rincées. On peut aussi déposer un nombre suffisant de *Lemna* dans un plat peu profond rempli de milieu d'essai en vue de les répartir entre les répétitions d'une même concentration (essai à concentration unique). On peut utiliser la même anse pour transférer les *Lemna* dans chaque gobelet d'une concentration donnée. On doit veiller à ce que la plante n'adhère pas aux parois du gobelet et à ce que les racinelles soient à l'intérieur de ce dernier. Toute plante dont des parties se détachent au cours du transfert doit être remplacée.

Pendant ces manipulations, on doit procéder à une répartition aléatoire formelle des organismes dans les différents récipients. Le groupe de récipients de répétition réservé à un traitement donné (p. ex. une concentration expérimentale particulière) doit également être réparti en des endroits choisis au hasard dans l'enceinte environnementale ou la zone d'essai. On doit coder ou étiqueter les récipients pour bien identifier l'échantillon et sa concentration. Il faut enregistrer la date et l'heure du démarrage de l'essai sur des feuilles distinctes, prévues spécialement pour l'essai.

Les transferts de *Lemna* devraient se dérouler dans un endroit propre, à l'abri des courants d'air, le plus rapidement possible, pour réduire au minimum le risque de contamination des colonies. Dès que les plantes ont été mises dans les récipients d'essai, on devrait veiller à ne pas agiter ou à ne pas faire tourbillonner ces derniers afin que les plantes n'adhèrent pas aux parois. La première journée d'exposition des *Lemna* aux solutions est dite jour 0. En conséquence, le jour 7 correspond à la fin de l'essai.

### 4.3 Conditions expérimentales

L'essai d'inhibition de la croissance de *L. minor* dure 7 jours. Il peut s'agir d'un essai ne comportant aucun renouvellement des solutions pendant la durée de l'essai, ou, dans le cas de substances, matières ou produits chimiques dégradables, d'un essai à renouvellement intermittent des solutions.

Dans un essai à renouvellement intermittent, il faut remplacer chaque solution expérimentale tous les 3 jours (c.-à-d. aux jours 3 et 5), au moins, pendant l'essai (v. 5.2 et 6.1)<sup>45</sup>. On devrait préparer les solutions de remplacement et les récipients d'essai conformément aux indications fournies en 4.1. On doit transférer avec soin les colonies de *Lemna* dans leurs récipients respectifs de solution fraîche, en veillant à réduire au minimum leur contamination. Ce transfert doit se faire aléatoirement, d'une répétition à l'autre d'une concentration donnée et il faudrait se conformer aux procédures décrites en 4.2 pour la manipulation des plantes. On devrait déterminer les caractéristiques physicochimiques des vieilles solutions (v. 4.4), puis se débarrasser de ces dernières (en respectant les règlements provinciaux et fédéraux) ou les conserver si des déterminations chimiques supplémentaires sont nécessaires (v. 5.4).

<sup>45</sup> Des renouvellements plus fréquents des solutions expérimentales peuvent être exigés pour les essais sur des substances chimiques afin de maintenir la substance d'essai à 80 % de sa concentration initiale (USEPA, 1996; OCDE, 1998, 2002).

On utilise pour les essais 2 *Lemna* par volume de 100 mL (ou de 150 mL) de solution expérimentale dans chacun des récipients d'essai de répétition (v. 3.3 et 4.1).

L'essai doit se dérouler à une température moyenne quotidienne de  $25 \pm 2$  °C. L'éclairage doit être conforme aux indications fournies en 3.2. Les solutions d'essai ne doivent pas être aérées au cours de l'essai et ce dernier doit prendre fin au bout de 7 jours.

L'essai doit être considéré comme invalide si, à la fin de la période d'essai, le nombre moyen de thalles chez les témoins n'est pas au moins 8 fois plus élevé qu'au départ (en d'autres termes, le nombre moyen de thalles par récipient témoin doit être d'au moins 48 pour que l'essai soit valide).

#### 4.3.1 pH

Normalement, les essais toxicologiques ne devraient pas exiger le rajustement du pH. Cependant, si l'échantillon de la substance d'essai déplace le pH à l'extérieur de la plage de 6,5 à 9,5 pour les essais en milieu APHA modifié, de 6,0 à 8,0 pour ceux en milieu SIS et de 5,0 à 8,0 pour ceux en milieu Steinberg modifié, et si l'on évalue la toxicité de la substance d'essai plutôt que les effets nocifs ou l'influence du pH, on devrait rajuster le pH des solutions d'essai ou de l'échantillon, ou encore effectuer en parallèle un deuxième essai à pH rajusté. Pour ce deuxième essai, on peut neutraliser le pH initial de l'échantillon, des solutions d'essai ou de chaque solution fraîche avant le renouvellement des solutions (essais à renouvellement intermittent), selon les objectifs de l'essai (réglage à pH 7,0) ou le rajuster à moins de  $\pm 0,5$  unité de pH de celui de l'eau témoin/de dilution, avant l'exposition des *Lemna*. Une autre méthode acceptable pour ce deuxième essai consiste à rajuster le pH de l'échantillon à l'intérieur de la plage de 5,0 à 7,0 (si le pH de l'échantillon est inférieur à 5,0 ou si ce dernier a abaissé le pH à cette valeur) ou à 9,0–9,5 (si le pH de l'échantillon est supérieur à 9,5 ou si ce dernier a haussé le pH à cette valeur). On devrait

normalement utiliser, pour tous les rajustements du pH, des solutions de HCl ou de NaOH 1 N ou moins. Certains échantillons (p. ex. échantillons d'effluent fortement tamponnés) pourraient exiger des solutions plus concentrées d'acide ou de base.

S'il faut rajuster le pH de l'échantillon, on le fait après addition des solutions mères nutritives et après aération préalable (v. 4.1). S'il faut rajuster le pH de plus de 0,5 unité, on recommande encore 30 min d'aération suivies d'un autre rajustement du pH (SRC, 1997). Abernethy et Westlake (1989) donnent des indications utiles sur le rajustement du pH. On devrait laisser reposer les aliquotes d'échantillon ou de solution d'essai dont on rajuste le pH pour que l'équilibre se fasse après chaque addition d'acide ou de base. Le temps d'équilibrage dépend de la capacité tampon de la solution ou de l'échantillon. Pour les échantillons d'effluent, on recommande une période de 30 à 60 min pour le rajustement du pH (Abernethy et Westlake, 1989). Dès la mise en route de l'essai, on surveille le pH de chaque solution, mais sans le rajuster. Il faut noter les volumes des solutions nutritives ajoutées, de même que ceux de NaOH et de HCl utilisés pour rajuster le pH, et s'en servir pour calculer la concentration nominale de la substance au début de l'essai.

Si l'objet de l'essai toxicologique est d'élucider la nature des toxiques présents dans la substance d'essai, on utilise souvent le rajustement du pH au même titre que d'autres techniques (p. ex. oxydation, filtration, entraînement à l'air, ajout d'un agent chélateur) pour caractériser et identifier les agents toxiques de l'échantillon. Ces techniques d'identification des agents toxiques constituent, pour les responsables des essais, des moyens utiles pour évaluer la nature physicochimique du ou des toxiques et leur sensibilité à la détoxification (USEPA, 1991a, 1991b).

#### 4.4 Observations et mesures au cours de l'essai

Il faut observer et dénombrer les thalles dans chaque récipient au début et à la fin de l'essai (jours 0 et 7)<sup>46</sup>. Les solutions témoins doivent être traitées de façon identique. Pour faciliter l'observation des plantes, on peut utiliser une loupe, un microscope à dissection ou tout autre moyen de grossissement, la lumière étant dirigée vers le côté ou le fond du récipient.

À chaque observation, il faut relever et enregistrer le nombre de thalles dans chaque récipient. Le dénombrement doit englober tous les thalles<sup>47</sup> et tous les bourgeons visiblement saillants. On devrait aussi observer et noter les phénomènes suivants dans chaque récipient : chlorose (dépigmentation); nécrose (mort du tissu des thalles par endroit, d'aspect brun ou blanc); thalles jaunes ou d'une taille anormale; gibbosité (aspect bosselé ou gonflé des thalles); destruction de la colonie (thalles simples); destruction des radicules; réduction de la flottabilité (v. la figure 2).

Il faut surveiller la température durant l'essai et la mesurer au moins tous les jours dans des récipients représentatifs (c.-à-d. au moins dans les concentrations élevée, médiane et faible, de même que dans les solutions témoins s'il s'agit d'un essai à concentrations multiples). On peut préparer des récipients supplémentaires pour y mesurer la température de l'eau. Si la mesure se fait dans d'autres récipients que les récipients

<sup>46</sup> Au cours de l'essai, il faudrait effectuer deux autres observations du nombre de thalles dans chaque récipient (p. ex. les jours 3 et 5), si l'on souhaite calculer la vitesse précise moyenne de croissance (ou vitesse relative de croissance; d'après l'évolution du nombre de thalles déterminé au cours des 7 jours d'exposition chez les témoins et dans chaque groupe exposé) et/ou l'aire sous la courbe (d'après le nombre de thalles chez les témoins et dans chaque groupe exposé, intégré en fonction de la période d'exposition) (v. 4.5.5).

<sup>47</sup> On compte tous les thalles, sans égard à leur couleur ou à leur état, et l'on tient compte du résultat dans le calcul du paramètre.



d'essai (c.-à-d. dans l'incubateur ou dans une pièce à température contrôlée à proximité des récipients d'essai), il faut établir le rapport qui existe entre ces lectures et la température à l'intérieur des récipients. Sont acceptables l'enregistrement continu ou la mesure quotidienne des températures maximale et minimale.

Qu'il s'agisse d'un essai sans renouvellement ou à renouvellement intermittent des solutions, il faut mesurer le pH au début de l'essai, avant le transfert des *Lemna* ainsi qu'à la fin de l'essai, au moins dans les récipients où se trouvent les concentrations élevée, médiane et faible ainsi que dans le ou les témoins. Pour les essais à renouvellement intermittent des solutions, il faut aussi mesurer le pH immédiatement avant et immédiatement après chaque renouvellement (c.-à-d. dans les solutions fraîches et dans celles qu'il faut jeter) au moins dans les concentrations élevée, médiane et faible ainsi que dans le ou les témoins.

Il faut mesurer le débit de fluence photonique au moins une fois au cours de l'essai en des points situés à peu près à la même distance de la source lumineuse que les thalles des *Lemna* et en plusieurs endroits dans la zone d'essai.

On devrait prendre note de l'aspect général des échantillons pour essai et de tout changement survenant au cours de la préparation des solutions expérimentales, de même que de tout changement d'aspect de ces solutions au cours de l'essai (v. 5.4, 6.4 et 7.4).

On enregistre le nombre de thalles dans chaque répétition du témoin et dans les diverses concentrations de la substance d'essai, au début et à la fin des 7 journées d'exposition. On devrait exclure de l'essai les récipients d'où l'on a retiré accidentellement des thalles et des colonies ou dont les thalles et les colonies adhèrent aux parois (et ont séché) et ne pas les faire entrer dans le calcul du paramètre.

Une fois dénombrés, les thalles de *Lemna* sont séchés et pesés. Dans chaque récipient de solution d'essai, on détermine la masse sèche collective des thalles. On recueille les colonies présentes dans les récipients respectifs (y compris les radicules), on les éponge jusqu'à siccité<sup>48</sup> et on les fait sécher immédiatement à l'étuve, dans de petites nacelles tarées et numérotées, soit à 100 °C pendant 6 h, soit à 60 °C pendant 24 h. Au sortir de l'étuve, il faut porter immédiatement les nacelles au dessiccateur. Ensuite, en les choisissant au hasard, on récupère les nacelles individuellement et on les pèse sur une balance dont la précision à 0,01 mg près est constante. Pour éviter l'absorption excessive et erratique de vapeur d'eau, il faut procéder rapidement et consacrer le même temps à chaque nacelle. On devrait récupérer les nacelles au hasard pour leur pesée; la première nacelle devrait être remise dans le dessiccateur, puis pesée de nouveau à la fin de toutes les pesées pour vérifier l'absorption d'eau par les dernières nacelles pesées. L'écart avec la première masse obtenue ne devrait pas être supérieur à 5 %. Sinon, il faudrait remettre à sécher les nacelles pendant 1 ou 2 h puis les peser de nouveau. On devrait tarer quelques nacelles, les faire sécher et les peser, sans plantes, et les résultats devraient être conformes aux normes de contrôle de la qualité du laboratoire. Il faut déterminer la masse sèche totale des thalles dans chaque récipient (c.-à-d. dans chaque répétition de chaque concentration et dans le ou les témoins).

#### 4.5 Paramètres et calculs

Les paramètres se fondent sur les effets néfastes des matières ou substances d'essai sur la croissance de *L. minor*, évalués par comparaison avec les témoins. L'essai comporte deux

<sup>48</sup> On peut recueillir les plantes dans une boîte de Petri couverte d'un filet fin ou pourvue d'un fond constitué d'un tamis fin. On devrait les rincer à l'eau désionisée (à l'aide d'un flacon pulvérisateur). On éponge l'eau en excès en pressant du papier absorbant contre le filet ou le tamis de la boîte de Petri. On peut ensuite transférer les plantes dans les nacelles en renversant la boîte de Petri au-dessus de la nacelle (ITM, 1990).

paramètres biologiques, le premier étant une augmentation moindre du nombre de thalles par rapport au témoin, et le deuxième, une masse sèche finale des thalles inférieure à celle du témoin. On calcule l'augmentation du nombre de thalles en soustrayant le nombre initial de thalles dans un récipient d'essai donné du nombre final de thalles dans le même récipient. Pour déterminer la réduction de la masse sèche des thalles, on compare la masse sèche totale des thalles de *Lemna* à celle du témoin à la fin de l'essai (jour 7). Il s'agit essentiellement d'une mesure de la croissance, sauf que la masse initiale n'est pas déterminée.

#### 4.5.1 Validité de l'essai

Si l'on suppose que toutes les conditions et tous les modes opératoires recommandés sont respectés<sup>49</sup>, le nombre moyen de thalles chez les témoins doit être au moins 8 fois plus élevé qu'au départ, à la fin de l'essai de 7 jours, pour que ce dernier soit valide (en d'autres termes, le nombre moyen de thalles chez les témoins doit être d'au moins 48 par récipient à la fin de l'essai).

#### 4.5.2 Essais à concentrations multiples

Dans un essai à concentrations multiples, le paramètre statistique exigé pour les données sur la croissance (nombre de thalles, masse sèche des thalles) est une  $CI_p$ <sup>50, 51</sup> et ses limites de

confiance à 95 %. Il faut calculer une  $CI_p$  distincte et sa limite de confiance à 95 % pour chacun des deux paramètres biologiques (soit l'augmentation moindre du nombre de thalles et la réduction de la masse sèche totale). À cette fin, on utilise directement les paramètres *quantitatifs* (c.-à-d. l'augmentation du nombre de thalles et la masse sèche totale). On trouvera dans EC (2005) des explications et des conseils pour le calcul de la  $CI_p$ , y compris des diagrammes de décision pour orienter le choix des tests statistiques pertinents. Tous les tests statistiques utilisés pour calculer les paramètres exigent que les concentrations soient exprimées sous forme de logarithmes et, le cas échéant, qu'elles soient corrigées pour tenir compte du volume de solution nutritive utilisé (c.-à-d. une dilution à 97 %).

Il est vivement recommandé de tracer un diagramme initial des données brutes (augmentation du nombre de thalles, masse sèche) en fonction du logarithme de la concentration afin d'obtenir une représentation visuelle des données, d'une part, et de vérifier si les résultats obtenus sont raisonnables en regard des calculs statistiques ultérieurs, d'autre part<sup>52</sup>.

---

autre) (sous-section 7.1 dans EC, 2005). Compte tenu de ces inconvénients, la  $CI_p$  constitue le paramètre statistique requis pour les données sur la croissance obtenues dans un essai à concentrations multiples avec *L. minor*.

<sup>49</sup> Plus précisément, on suppose que : toutes les composantes de l'appareillage et toutes les matières ou substances d'essai étaient identiques dans chaque répétition; toutes les concentrations ont été réparties au hasard entre les répétitions; tous les organismes ont été répartis au hasard entre les répétitions; l'essai n'a pas pris fin de façon prématurée; toutes les variables physicochimiques à surveiller l'ont été comme il se devait; toutes les variables biologiques à surveiller l'ont été comme il se devait.

<sup>50</sup> Par le passé, les responsables des essais ont souvent analysé les paramètres sublétaux *quantitatifs* associés à des essais à concentrations multiples en calculant la *concentration sans effet observé (CSEO)* et la *concentration minimale avec effet observé (CMEO)*. Ces paramètres statistiques comportent des inconvénients, notamment leur dépendance à l'égard des concentrations expérimentales choisies et l'incapacité de fournir une quelconque indication de la *précision* (en d'autres termes, il est impossible d'établir la limite de confiance à 95 % ou

<sup>51</sup> La  $CI_p$  est la *concentration inhibitrice* correspondant à un *pourcentage* d'effet précisé. Le « p » représente un pourcentage fixe de réduction choisi par le responsable de l'essai. En règle générale, sa valeur est établie à 25 % ou à 20 %.

<sup>52</sup> Plutôt que de porter les données brutes sur un diagramme, le responsable de l'essai peut choisir de calculer le pourcentage d'inhibition associé à chaque concentration expérimentale et de porter ce pourcentage sur un diagramme; la valeur obtenue correspond à l'écart entre la réponse moyenne dans le témoin et la réponse dans le traitement (réponse moyenne dans le témoin, moins réponse moyenne dans le traitement pour le numérateur), divisé par la réponse moyenne dans le témoin (dénominateur), exprimé sous forme de pourcentage (multiplié par 100 %). La valeur obtenue pour chaque traitement est portée sur le diagramme en fonction de la concentration; voir ASTM (1991) pour de plus amples détails. L'axe des x représente la concentration

Tout écart important entre le graphique de la  $CI_p$  approximative et la  $CI_p$  calculée à l'aide d'un programme informatique doit être expliqué. Le graphique permettrait aussi de déterminer si un lien logique a été obtenu entre la concentration logarithmique (ou, dans certains cas, la concentration) et l'effet, ce qui est souhaitable dans tout essai valide (EC, 2005).

L'analyse de régression constitue la principale méthode statistique à utiliser pour calculer la  $CI_p$ . Un certain nombre de modèles permettent d'évaluer les données sur la croissance (à l'aide d'un test statistique quantitatif) au moyen d'une analyse de régression. Pour que les méthodes de régression puissent être utilisées, les données doivent satisfaire aux hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité*. Des techniques de pondération peuvent être appliquées pour réaliser l'hypothèse d'*homoscédasticité*. Il convient aussi d'examiner les données afin de détecter les valeurs aberrantes à l'aide d'une des méthodes recommandées (v. 10.2 dans EC, 2005). Toute analyse statistique dont sont exclues les valeurs aberrantes devrait aussi être effectuée en incluant ces valeurs. Il faut signaler les valeurs aberrantes et, le cas échéant, justifier leur suppression. Enfin, il faut choisir le modèle présentant le meilleur ajustement<sup>53</sup> pour déterminer la  $CI_p$  et

---

logarithmique ou, dans certains cas, la concentration, selon les préférences et les objectifs du responsable de l'essai. Par exemple, l'utilisation d'une échelle logarithmique permettra d'apparier les échelles de données de régression, mais le rapport final sera peut-être plus clair avec la valeur de la concentration. Afin d'améliorer l'utilité d'un diagramme pour représenter visuellement les données, le responsable de l'essai pourrait choisir d'inclure tant la courbe de régression que les données brutes.

<sup>53</sup> Comme il est indiqué à la sous-section 6.5.8 de EC (2005), les directives actuelles d'Environnement Canada concernant les méthodes statistiques applicables aux essais d'écotoxicité précisent qu'il faut utiliser les cinq modèles suivants d'analyse de régression pour établir la  $CI_p$  estimative : modèle linéaire, modèle logistique, modèle de Gompertz, modèle exponentiel et modèle d'hormèse (modèle logistique adapté pour tenir compte de l'effet d'hormèse à de faibles doses). Le document d'orientation précité fournit également (en 6.5.8 et à l'annexe O) les expressions mathématiques propres à chaque modèle, dont des exemples détaillés associés à un progiciel de

ses limites de confiance à 95 %. Les paramètres calculés au moyen d'une analyse de régression doivent être encadrés par les concentrations d'essai; l'extrapolation des paramètres au-delà de la concentration expérimentale maximale ne constitue pas une pratique acceptable.

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

Si les données ne se prêtent pas à une analyse de régression, on peut avoir recours à une interpolation linéaire (p. ex. le programme ICPIN; v. 6.4.3 dans EC, 2005) en vue de calculer une  $CI_p$ . Le même processus décisionnel concernant l'analyse statistique doit être appliqué séparément à chacun des deux paramètres mesurés dans les essais avec *L. minor* (c.-à-d. augmentation du nombre de thalles et masse sèche des thalles). Par exemple, si l'augmentation du nombre de thalles ne peut faire l'objet d'une analyse de régression et que l'analyste s'en remet par défaut au programme ICPIN, il faut tout de même essayer d'effectuer une analyse de régression des données sur la masse sèche des thalles. Le fait que le premier paramètre examiné soit analysé au moyen du programme ICPIN n'empêche pas l'analyse de régression du deuxième paramètre.

Les calculs suivants doivent être effectués et enregistrés pour chaque concentration d'essai

---

statistiques courant. Plus d'un modèle doit être ajusté aux données. Pour déterminer le meilleur ajustement, il est recommandé d'utiliser la plus faible erreur quadratique moyenne résiduelle, laquelle est fournie dans le tableau ANOVA pour tous les modèles.

comportant un ou des traitements témoins : (i) la moyenne ( $\pm$  ET) de l'augmentation du nombre de thalles dans chaque traitement, y compris le ou les témoins, d'après le dénombrement effectué à la fin de l'essai; (ii) la moyenne ( $\pm$  ET) de la masse sèche des thalles de *Lemna* dans chaque traitement, y compris le ou les témoins, d'après la masse sèche établie à la fin de l'essai.

#### 4.5.3 Essais à concentration unique

Dans un essai à concentration unique, la réponse des organismes à la concentration expérimentale est comparée à celle des organismes témoins<sup>54</sup>. Si l'on évalue le nombre de thalles et la masse sèche (données quantitatives) à un seul site expérimental et à un seul site témoin, le test de Student<sup>55</sup> constitue habituellement la méthode qui convient pour comparer les données relatives à la concentration d'essai et à la concentration témoin. Lorsque plus d'un site expérimental est à l'étude et que le responsable de l'essai souhaite comparer de nombreux sites avec le site témoin ou comparer les sites entre eux, il peut avoir recours à divers tests ANOVA (ou équivalent non paramétrique) (sous-section 3.3 dans EC, 2005). Le choix du test à utiliser est fonction des éléments suivants :

- (i) le type de comparaison à établir (p. ex. une série complète de comparaisons par paire entre tous les sites ou une comparaison des données propres à chaque emplacement avec celles du témoin seulement);
- (ii) un gradient dans la réponse chimique et/ou biologique est prévu;
- (iii) les hypothèses de *normalité* et d'*homoscédasticité* sont satisfaites.

<sup>54</sup> Une description du ou des types d'eau témoin/de dilution pouvant être utilisés dans un essai à concentration unique est présentée en 4.1, 5.3, 6.3 et 7.3.

<sup>55</sup> En toute rigueur, le test de Student suppose une distribution t et des variances égales dans les deux groupes. On trouvera dans EC (2005) une description des tests de distribution et de variances égales, de même que les solutions de rechange recommandées dans le cas de variances inégales.

Comme dans le cas d'un essai à concentrations multiples, les autres calculs à effectuer et à enregistrer lorsqu'on procède à un essai à concentration unique incluent : (i) la moyenne ( $\pm$  ET) de l'augmentation du nombre de thalles dans chaque traitement, y compris le ou les témoins, d'après le dénombrement effectué à la fin de l'essai; (ii) la moyenne ( $\pm$  ET) de la masse sèche des thalles de *Lemna* dans chaque traitement, y compris le ou les témoins, d'après la masse sèche établie à la fin de l'essai.

#### 4.5.4 Effets stimulants

Un *effet stimulant* (réponse plus marquée à toutes les concentrations ou aux concentrations élevées) doit être signalé pour toutes les concentrations auxquelles une stimulation importante a été observée. Le cas échéant, on procède à une comparaison statistique avec les témoins au moyen d'une ANOVA, puis à une comparaison par paire avec le témoin (v. 3.3 et 7.5 dans EC, 2005). Cette analyse permettra de déterminer quelles concentrations provoquent un effet stimulant qui s'écarte significativement de celui observé chez les témoins. Le pourcentage de stimulation attribuable à ces concentrations doit être noté; on l'établit à l'aide de l'équation suivante (USEPA, 2002)<sup>56</sup> :

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

où :

S (%) = pourcentage de stimulation  
 T = augmentation moyenne du nombre de thalles ou masse sèche totale moyenne des thalles à la fin de l'essai dans les récipients d'essai  
 C = augmentation moyenne du nombre de thalles ou masse sèche totale moyenne des thalles à la fin de l'essai chez les témoins

<sup>56</sup> Il est indiqué dans USEPA (2002) que T = réponse moyenne dans l'effluent ou l'eau de surface et que C = réponse moyenne dans le témoin; ces réponses ont été précisées davantage dans l'équation ci-dessus.

#### 4.5.5 Autres plans d'expérience et utilité de ceux-ci

On peut calculer la vitesse spécifique moyenne de croissance (ou vitesse relative de croissance)<sup>57</sup> et/ou l'aire sous la courbe<sup>58</sup> à partir du nombre de thalles dans chaque répétition; cependant, il faut

<sup>57</sup> Pour déterminer la vitesse spécifique moyenne de croissance correspondant à chaque concentration et au témoin, on trace le graphique du nombre de thalles dans chaque répétition des groupes témoins et chaque concentration à chaque moment des observations, sur papier semi-logarithmique, pour obtenir les courbes de croissance. La vitesse spécifique moyenne de croissance pendant une période donnée correspond à la pente de la courbe de croissance logarithmique établie au moyen de l'équation suivante (OCDE, 2002) :

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{m_j - m_i}$$

où :

- $\mu_{i-j}$  est la vitesse spécifique moyenne de croissance entre le moment  $i$  et le moment  $j$ ;
- $N_i$  est le nombre de thalles observé dans le récipient d'essai ou le récipient témoin au moment  $i$ ;
- $N_j$  est le nombre de thalles observé dans le récipient d'essai ou le récipient témoin au moment  $j$ ;
- $m_i$  est le moment du début de la période d'essai;
- $m_j$  est le moment de la fin de la période d'essai.

La vitesse spécifique moyenne de croissance de cultures en croissance exponentielle (ou dont la croissance est davantage exponentielle que linéaire) peut être déduite de la pente de la courbe de régression du graphique de  $\ln N$  en fonction du temps, et ce, à la condition qu'aucune période importante de retard ou de stagnation ne soit observée et que le tracé de la courbe soit monotone.

On peut ensuite calculer le taux d'inhibition de la vitesse de croissance ( $I_v$ ) pour chaque concentration d'essai, à l'aide de la formule suivante :

$$\% I_v = \frac{(\mu_T - \mu_E)}{\mu_T} \times 100$$

où :

- $\% I_v$  est le pourcentage d'inhibition de la vitesse spécifique moyenne de croissance;
- $\mu_T$  est la valeur moyenne de  $\mu$  chez le témoin;
- $\mu_E$  est la valeur moyenne de  $\mu$  chez le groupe exposé.

<sup>58</sup> On peut calculer l'aire sous les courbes de croissance de chaque témoin et de chaque répétition à l'aide de l'équation suivante (OCDE, 2002) :

$$A = \frac{\ln N_1 - \ln N_0}{2} m_1 + \frac{\ln N_1 + \ln N_2 - 2 \ln N_0}{2} (m_2 - m_1) + \dots + \frac{\ln N_{n-1} + \ln N_n - 2 \ln N_0}{2} (m_n - m_{n-1})$$

où :

$A$  est l'aire sous la courbe de croissance;

$N_0$  est le nombre de thalles observé dans le récipient d'essai ou le récipient témoin au début de l'essai ( $t_0$ );

$N_1$  est le nombre de thalles observé dans le récipient d'essai ou le récipient témoin au moment  $t_1$ ;

$N_n$  est le nombre de thalles observé dans le récipient d'essai ou le récipient témoin au moment  $t_n$ ;

$m_1$  est le moment de la première mesure après le début de l'essai;

$m_n$  est le moment de la  $n$ ème mesure après le début de l'essai.

On devrait calculer l'aire pour toute la période de l'essai ou fournir les motifs de la sélection d'une partie seulement de la courbe de croissance. Pour chaque concentration et chaque témoin, on calcule une aire moyenne, assortie de l'estimation de la variance.

On peut ensuite calculer pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant à l'aire sous la courbe ( $I_a$ ), à l'aide de la formule suivante :

$$\% I_a = \frac{(A_T - A_E)}{A_T} \times 100$$

où :

- $A_T$  est la valeur moyenne de l'aire sous la courbe correspondant au groupe témoin;
- $A_E$  est la valeur moyenne de l'aire sous la courbe correspondant au groupe exposé.



effectuer des mesures régulières au cours de l'essai (p. ex. aux jours 3 et 5) **aux fins de ces calculs** (ASTM, 1997; OCDE, 1998, 2002)<sup>59</sup>.

#### 4.6 Toxique de référence

L'utilisation systématique d'un ou de **plus d'un** toxique de référence est **un moyen** pratique et nécessaire pour évaluer, dans des conditions normalisées, la sensibilité relative de la culture de *Lemna* utilisée, **de même** que la précision et la fiabilité des données obtenues par le laboratoire à l'égard du toxique de référence choisi (EC, 1990). Dans les 14 jours **incluant la période réservée à l'essai toxicologique, il faut évaluer la sensibilité des *Lemna* au toxique de référence (en d'autres termes, l'évaluation doit débiter à l'intérieur de la période de 14 jours englobant celle pendant laquelle l'essai a été mené)**. On **peut** utiliser la même culture (âgée de 7 à 10 jours) pour les essais employant le toxique de

<sup>59</sup> Les estimations de la toxicité exprimées d'après la biomasse finale sont généralement plus sensibles que celles qui se fondent sur la vitesse spécifique moyenne de croissance (Sims et **coll.**, 1999). Cependant, cette dernière est avantageuse pour la comparaison des données d'essais ayant des périodes différentes d'exposition, puisque la vitesse spécifique moyenne de croissance (ou vitesse relative de croissance) dépend moins de la durée d'exposition que les paramètres ultimes de mesure fondés sur la biomasse finale (p. ex. le nombre de thalles ou la masse sèche) (Nyholm, 1990). En outre, les vitesses intrinsèques de croissance des *Lemna* ne sont pas constantes au **fil** du temps, même dans des conditions contrôlées de laboratoire (Huebert et Shay, 1993). Le calcul de la vitesse spécifique moyenne de croissance exige des mesures régulières de l'effet au cours de l'essai et il exige que la croissance chez les témoins soit exponentielle. **Faute de satisfaire à** cette dernière condition, il est préférable de fonder les estimations de la toxicité sur l'aire sous la courbe plutôt que sur la vitesse spécifique moyenne de croissance (OCDE, 1998).

Un autre avantage de l'examen de la vitesse de croissance ou de l'aire sous la courbe de croissance est l'information précieuse que l'on peut tirer de la constatation du moment où s'exerce l'effet toxique sur la croissance. Par exemple, la courbe de croissance pourrait montrer un effet toxique immédiat qui n'évolue pas dans le temps, un effet toxique initial qui s'atténue graduellement ou une réaction toxique qui ne se manifeste pas avant plusieurs jours après le début de l'essai (ASTM, 1997).

référence et l'échantillon **(il peut y en avoir plus d'un dans les deux cas)**. L'essai toxicologique de référence doit se dérouler dans les mêmes conditions expérimentales que l'essai portant sur **l'échantillon** ou les échantillons **pour essai**.

Les critères **sur lesquels se fonde la recommandation** quant à l'utilisation des toxiques de référence **qui conviennent** pour cet essai **incluent les suivants** :

- produit facilement accessible à l'état pur;
- **durée de conservation stable** (longue);
- forte solubilité dans l'eau;
- stabilité en solution aqueuse;
- **risque** minime pour l'utilisateur;
- analyse facile et précise;
- bonne courbe dose-**réponse** pour *L. minor*;
- influence connue, sur les **plans** quantitatif et qualitatif, du pH sur la toxicité **du produit** pour les organismes **d'essai**.

On recommande comme toxiques de référence pour cet essai le **nickel (Ni)**<sup>60</sup> **et/ou** le chlorure de potassium (KCl)<sup>61</sup> de qualité réactif. Si l'on se

<sup>60</sup> De nombreux problèmes associés à l'utilisation du chrome (Cr) comme toxique de référence dans les essais avec *L. minor* ont mené à des recherches sur plusieurs métaux (Zn, Cd, Cu et Ni) de remplacement. On a **considéré que le Ni était indiqué du fait qu'il a permis d'obtenir une courbe dose-réponse relativement accentuée (il ne donnait pas lieu à un aplatissement marqué à des concentrations plus élevées, comme c'était le cas pour le Zn, le Cu et le Cd; SRC, 2003)**. Au cours d'autres essais toxicologiques de référence employant le Ni et la souche UTCC 492 de *L. minor*, on a obtenu, avec des **concentrations nominales de Ni, une CI<sub>25</sub> moyenne de l'augmentation du nombre de thalles de 13,2 µg/L (SRC, 2005)**.

<sup>61</sup> Le KCl s'est révélé un bon toxique de référence pour les essais avec *L. minor*. Sa CI<sub>25</sub> moyenne a été **de 4 840 mg/L (n = 20) et ses coefficients de variation (CV) se situaient entre 21,3 % et 28,3 % (Jonczyk, 1998)**. D'autres données relatives au KCl révèlent une CI<sub>50</sub> moyenne de 4 770 mg/L

sert du Ni, il est recommandé de consulter attentivement la fiche signalétique du produit et de prendre toutes les précautions utiles.

Il faut évaluer la sensibilité des *Lemna* au moyen d'essais normalisés, conformément aux modes opératoires et aux conditions énoncés dans le présent document, afin de déterminer la  $CI_p$  du ou des toxiques de référence choisis. Si l'on choisit le Ni, on devrait utiliser le sulfate de nickel ( $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ ) pour préparer les solutions mères. Ces dernières devraient être fraîchement préparées pour chaque essai toxicologique de référence. La concentration de Ni devrait être exprimée en milligrammes de Ni par litre (mg/L). Il faudrait préparer les solutions mères de KCl la journée même de l'essai. L'eau témoin/de dilution devrait convenir aux toxiques de référence utilisés (milieu APHA modifié pour les essais avec le Ni et milieu APHA modifié, milieu SIS ou milieu Steinberg modifié pour ceux avec le KCl).

On devrait doser, à l'aide des méthodes pertinentes, le toxique de référence dans toutes les solutions mères (p. ex. APHA et coll., 1995). Au cours de la préparation des solutions d'essai, il faudrait prélever des aliquotes au moins dans la solution témoin et dans les concentrations élevée, médiane et faible et les analyser directement ou les entreposer pour analyse ultérieure, au cas où la  $CI_p$  tombe à l'extérieur des limites de contrôle de 95 %. Si l'on entrepose les aliquotes pour usage ultérieur, il faut les conserver dans l'obscurité à  $4 \pm 2$  °C et, au besoin, leur ajouter un agent conservateur (v. APHA et coll., 1995). On devrait analyser les aliquotes à doser le plus tôt possible après la fin de l'essai toxicologique. Il est souhaitable de doser les mêmes solutions à la fin de l'essai, après avoir terminé les observations biologiques. Les calculs de la  $CI_p$  devraient se fonder sur les concentrations

mesurées, si elles sont notablement différentes (c.-à-d.  $\geq 20$  %) des concentrations nominales et si la précision des analyses chimiques est satisfaisante.

Dès que l'on possède suffisamment de données, il faut préparer une carte de contrôle des valeurs de la  $CI_p$  en fonction du nombre de thalles, puis l'actualiser pour chaque toxique de référence utilisé (EC, 1990, 2005). Il faut préparer une carte de contrôle distincte pour chaque clone de *L. minor* utilisé dans les essais toxicologiques, parce que la sensibilité des clones peut différer selon les toxiques (v. 2.2; note 11). Il faut également préparer une carte distincte pour chacun des milieux utilisés pour les essais toxicologiques de référence (c.-à-d. chaque milieu APHA modifié, milieu SIS et milieu Steinberg modifié). On porte sur la carte de contrôle les  $CI_p$  successives, puis on détermine si les résultats se trouvent à  $\pm 2$  ET (limites de contrôle de 95 %) des valeurs obtenues dans les essais antérieurs avec le même toxique de référence et en suivant le même mode opératoire. On calcule de nouveau la moyenne et l'écart-type du logarithme des  $CI_p$  disponibles à chaque essai successif, jusqu'à ce que la statistique se stabilise (EC, 1990, 2005). La carte de contrôle devrait représenter le logarithme de la  $CI_p$  sur l'axe vertical en fonction de la date de l'essai (ou du numéro de l'essai) sur l'axe horizontal.

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

---

( $n = 18$ ) et un CV de 15,9 % (Stantec, 2005). En tant que toxique de référence, le KCl a comme avantage d'être stable en solution et de ne pas subir l'influence des caractéristiques de qualité de l'eau. Il est en outre beaucoup moins dangereux à utiliser que d'autres substances.

Chaque nouvelle  $CI_p$  du toxique de référence devrait être comparée aux limites de contrôle de 95 % établies pour le nombre de thalles; on estime que la  $CI_p$  est acceptable si elle se trouve à l'intérieur de ces limites. Si une valeur donnée de la  $CI_p$  se trouve à l'extérieur, la sensibilité de la culture de *Lemna* ainsi que le rendement et la précision de l'essai sont suspects. Comme le phénomène pourrait se produire 5 % du temps par le seul effet du hasard, une valeur aberrante n'est pas nécessairement le signe d'une sensibilité douteuse des cultures ou d'une mise en question de la précision des données de toxicité recueillies par le laboratoire. Ce serait plutôt un avertissement que tel pourrait être le cas. On exige alors que le personnel de laboratoire vérifie en profondeur les conditions et procédures de culture et d'essai. Selon les résultats qui en ressortiront, il pourrait être nécessaire de répéter l'essai toxicologique de référence et/ou de préparer une nouvelle culture de *Lemna* avant d'entreprendre d'autres essais toxicologiques avec les organismes d'essai.

Des résultats qui restent à l'intérieur des limites de contrôle de 95 % n'indiquent pas nécessairement que le laboratoire obtient des résultats constants. Les résultats extrêmement variables que donne un toxique de référence élargissent ces limites; un nouveau point de donnée pourrait s'y trouver, tout en représentant un écart indésirable. Pour obtenir des indications sur la variation raisonnable entre les données sur

les toxiques de référence (c.-à-d. des limites de contrôle de 95 % pour une carte de contrôle), prière de consulter la sous-section 2.8.1 et l'annexe F de EC (2005).

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

#### 4.7 Considérations d'ordre juridique

Il faut veiller à l'admissibilité, devant un tribunal, des échantillons prélevés et analysés dans le dessein d'engager des poursuites. À cette fin, les échantillons doivent être représentatifs de la substance ou de la matière échantillonnée, ne pas être contaminés par des substances ou matières étrangères et être identifiables quant à la date, à l'heure et au lieu du prélèvement; il faut aussi que leur chaîne de conservation soit documentée et qu'ils aient été analysés le plus tôt possible après le prélèvement. Les responsables de l'exécution de l'essai et de la transmission des résultats doivent assurer la continuité de la preuve (McCaffrey, 1979) et l'intégrité des résultats.



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

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

### 5.1 Propriétés, étiquetage et entreposage de l'échantillon

On devrait se renseigner sur les propriétés de la substance, de la préparation ou du mélange chimiques à évaluer, y compris les caractéristiques suivantes : concentration des principaux ingrédients et des impuretés, solubilité dans l'eau, pression de vapeur, stabilité chimique, constantes de dissociation, toxicité pour les humains et les organismes aquatiques, biodégradabilité. Il convient aussi de consulter, si elles existent, les fiches signalétiques de chaque substance. Lorsque la solubilité dans l'eau est incertaine ou problématique, on devrait obtenir et consigner les modes opératoires acceptables ayant servi à la préparation de solutions aqueuses de la ou des substances ou déterminer expérimentalement la solubilité dans l'eau d'essai. On devrait recueillir et consigner d'autres renseignements tels que les formules développées, le degré de pureté, la nature et le pourcentage des impuretés importantes, la présence et la quantité d'additifs ainsi que le coefficient de partage *n*-octanol-eau<sup>62</sup>. La solubilité dans l'eau et la pression de vapeur peuvent servir à calculer la constante de la loi de Henry, qui indiquera si des pertes importantes de substance risquent de survenir au cours de l'essai. Cela aidera aussi à déterminer si des dispositions sont à prendre pour limiter ces pertes (OCDE,

1998, 2002) (v. 5.2). On devrait également disposer d'une méthode acceptable de dosage du produit dans l'eau, aux concentrations prévues pour l'essai, de même que de données sur sa précision et son exactitude.

Les contenants de produits chimiques doivent être scellés et codés ou étiquetés dès leur réception. L'information requise (nom du produit et du fournisseur, date de réception, qualité ou pureté, responsable de l'essai, etc.) doit figurer sur l'étiquette ou sur une feuille de données distincte réservée à l'échantillon, au besoin. Les conditions d'entreposage (p. ex. température, protection contre la lumière) sont souvent dictées par la nature du produit. Il faudrait suivre les modes opératoires normalisés pour manipuler et entreposer le produit ou, sinon, ceux que recommandent le fabricant, la fiche signalétique du produit ou de semblables sources de renseignements et de conseils.

### 5.2 Préparation des solutions d'essai

Habituellement, on prépare les solutions de la substance chimique par l'ajout d'aliquotes d'une solution mère constituée d'eau témoin/de dilution (milieu de croissance SIS, milieu Steinberg modifié ou milieu APHA modifié; v. 5.3). On devrait utiliser des fioles jaugées pour préparer les solutions mères et les solutions d'essai. Les solutions mères devraient normalement être préparées par dissolution de la ou des substances d'essai dans le milieu expérimental. Dans le cas de certaines substances ou matières (dont les pesticides), on pourrait pulvériser la substance d'essai directement sur les thalles si l'on considère que la pulvérisation constitue la voie la plus probable d'exposition (Lockhart et coll., 1989; Boutin et coll., 1993; OCDE, 1998, 2002). Pour préparer des solutions concentrées ou

<sup>62</sup> La connaissance des propriétés du produit facilite la détermination des précautions à prendre ou des exigences en matière de manipulation et d'essais (p. ex. une bonne ventilation des lieux ou la nécessité d'utiliser un solvant).

d'importants volumes, on pourrait aussi ajouter à l'eau témoin/de dilution (p. ex. milieu SIS ou milieu Steinberg modifié) des quantités pesées (à la balance de précision) de la substance chimique pour obtenir les titres nominaux qui serviront à l'essai. Quelles que soient les modalités de préparation des solutions d'essai, on devrait déterminer avant le début de l'essai la concentration, la solubilité et la stabilité de la substance dans le milieu d'essai, en fonction des conditions d'essai. On devrait protéger de la lumière les solutions mères susceptibles de photolyse et préparer aussi souvent qu'il est nécessaire les solutions instables, afin de maintenir les concentrations pour chaque renouvellement des solutions expérimentales.

Dans aucune des concentrations d'essai utilisées, on ne devrait excéder la solubilité dans l'eau de la substance d'essai (OCDE, 1998, 2002)<sup>63</sup>. Dans le cas des substances peu solubles dans l'eau, on peut préparer les solutions mères à l'aide de la technique de la colonne génératrice (Billington et coll., 1988; Shiu et coll., 1988) ou, ce qui est moins souhaitable, par dispersion ultrasonique<sup>64</sup>. On ne devrait pas utiliser de solvants organiques, d'émulsifiants ou de dispersants pour accroître la solubilité du produit, sauf lorsque ces substances risquent d'entrer dans la composition normale de la préparation commerciale du produit. Dans un tel cas, il faut préparer une solution témoin supplémentaire renfermant la concentration la plus élevée de l'agent qui sera utilisé dans l'essai. On devrait utiliser parcimonieusement les agents solubilisants sans jamais excéder la concentration de 0,1 mL/L dans les solutions d'essai; il faut signaler la nature de l'agent et la concentration finale utilisée. Quant aux solvants, ceux dont l'emploi est à privilégier sont le triéthylèneglycol

<sup>63</sup> Dans certains cas, la concentration nominale ciblée devrait être légèrement supérieure au taux de solubilité, pour atteindre un taux de solubilité de 100 % (après dosage) dans la solution d'essai non diluée.

<sup>64</sup> La dispersion ultrasonique n'est pas recommandée, les ultrasons pouvant produire des gouttelettes non uniformes, de différentes tailles, dont certaines pourraient gagner la surface du liquide ou présenter une biodisponibilité variable, ce qui risquerait de faire varier la toxicité.

et la diméthylformamide (ASTM, 1991; OCDE, 1998)<sup>65</sup>. On pourrait aussi utiliser le méthanol, l'éthanol et l'acétone, mais ces composés sont plus volatils et ils peuvent stimuler la croissance indésirable de micro-organismes (ASTM, 1991).

Il est recommandé de procéder à un essai sans renouvellement pour les substances, les produits commerciaux et les mélanges constitués de substances connues qui sont stables. Cependant, si l'on ne s'attend pas que la concentration de la substance d'essai restera à  $\pm 20$  % de la concentration nominale (ou si un essai préliminaire montre que la concentration de la substance d'essai ou d'au moins l'un de ses ingrédients biologiquement actifs tombe à moins de 80 % de la concentration initiale mesurée) au cours de l'essai (7 jours), il faut opter pour un essai à renouvellement intermittent des solutions (OCDE, 1998, 2002). On doit alors transférer les colonies de *L. minor* dans des solutions fraîches au moins deux fois au cours de l'essai (p. ex. aux jours 3 et 5) (v. 4.3). Des renouvellements plus fréquents pourraient être nécessaires pour maintenir les concentrations ( $\geq 80$  %) des substances très instables ou volatiles (USEPA, 1996; OCDE, 1998, 2002).

### 5.3 Eau témoin/de dilution

Dans les essais visant à évaluer la toxicité d'une substance chimique à l'égard de *L. minor*, on devrait utiliser comme eau témoin/de dilution soit le milieu SIS modifié (OCDE, 1998, 2002), soit le milieu Steinberg modifié (ISO, 2005), soit une eau réceptrice enrichie de solutions mères nutritives SIS ou de solutions mères nutritives Steinberg modifiées (eau réceptrice enrichie de nutriments)<sup>66</sup>. S'il y a lieu (p. ex. pour un essai

<sup>65</sup> Le triéthylèneglycol et la diméthylformamide sont des solvants souvent utilisés, non phytotoxiques jusqu'à la concentration de 100 mg/L.

<sup>66</sup> Si l'objet de l'essai est d'harmoniser le mode opératoire avec l'essai de mesure de l'inhibition de la croissance de *Lemna* de l'OCDE (OCDE, 1998, 2002), il faudrait utiliser le milieu SIS; s'il s'agit de l'harmoniser avec la norme provisoire de l'ISO (ISO, 2005), on optera plutôt pour le milieu Steinberg modifié.

portant sur des métaux), on peut utiliser comme eau témoin/de dilution un milieu APHA modifié qui ne renferme pas d'EDTA, ou une eau réceptrice enrichie de solutions mères nutritives APHA modifiées (v. 6.3).

L'eau témoin/de dilution recommandée pour un usage normalisé dans les essais sur des échantillons de substances chimiques est le milieu SIS ou le milieu Steinberg modifié. Le milieu SIS est constitué de sept solutions mères, comme il est indiqué au tableau 4. On prépare les solutions mères dans l'eau distillée ou l'équivalent, à l'aide de produits chimiques de qualité réactif. La solution mère VII (tampon de MOPS) n'est utilisée que pour les essais sur des substances ou des matières exigeant une régulation supplémentaire du pH<sup>67</sup>. On stérilise les solutions mères I à V par autoclavage à 120 °C pendant 15 min ou par filtration sur membrane (à pores de 0,2 µm). On stérilise les solutions mères VI et VII (facultatives) uniquement par filtration sur membrane (à pores de 0,2 µm) (on ne devrait pas les autoclaver), puis on les ajoute en asepsie aux autres solutions mères.

Pour préparer 1 L de milieu d'essai SIS, on ajoute les ingrédients suivants à 900 mL d'eau distillée sous verre et désionisée (ou l'équivalent) :

- 10 mL de solution mère I
- 5 mL de solution mère II
- 5 mL de solution mère III
- 5 mL de solution mère IV
- 1 mL de solution mère V
- 5 mL de solution mère VI

S'il faut un tampon, on ajoute aussi 1 mL de la solution mère VII (facultative). On règle le pH à  $6,5 \pm 0,2$  à l'aide de HCl ou de NaOH 0,1 ou 1 N et l'on porte le volume à 1 L avec de l'eau distillée (OCDE, 1998, 2002).

<sup>67</sup> Lorsque la régulation du pH du milieu d'essai importe particulièrement (p. ex. lorsque l'essai porte sur des métaux ou sur des substances ou matières présentant une instabilité hydrolytique), on recommande l'ajout du tampon de MOPS au milieu d'essai (OCDE, 1998, 2002).

On devrait conserver les solutions mères stériles au frais et dans l'obscurité. Les solutions mères I à V ont une durée de conservation de six mois, tandis que les solutions mères VI et VII devraient être jetées après un mois. On garde le milieu dans l'obscurité pour empêcher d'éventuelles altérations photochimiques (inconnues). Dans ces conditions, le milieu préparé se conserve de six à huit semaines environ; il est toutefois recommandé de préparer un milieu frais pour les essais. On devrait préparer le milieu SIS un ou deux jours d'avance pour que le pH se stabilise, mais il est conseillé de vérifier celui-ci avant d'utiliser le milieu. Si le pH se trouve à l'extérieur de la plage précisée ( $6,5 \pm 0,2$ ), on peut le rajuster par l'ajout de NaOH ou de HCl, selon la méthode déjà décrite (OCDE, 1998, 2002).

On peut aussi utiliser le milieu Steinberg modifié comme eau témoin/de dilution pour les essais sur des échantillons de substances chimiques, conformément à la recommandation provisoire de l'ISO pour les essais d'inhibition de la croissance de *L. minor* (ISO, 2005). Ce milieu compte huit solutions mères (v. le tableau 11 de l'annexe D). La norme provisoire de l'ISO (ISO, 2005) renferme de plus amples détails sur la préparation de ce milieu.

S'il faut évaluer l'effet toxique d'une substance chimique sur une eau réceptrice donnée, l'eau témoin/de dilution recommandée est l'eau réceptrice même, enrichie des mêmes nutriments que ceux qui ont servi à préparer le milieu SIS ou le milieu Steinberg modifié (eau réceptrice enrichie de nutriments) (v. la note 40 et le tableau 4). Ce genre d'évaluation pourrait se faire après un déversement de produits chimiques ou après des pulvérisations délibérées de substances chimiques (p. ex. des pesticides) mettant en cause un plan d'eau.

Si l'on doit utiliser comme eau témoin/de dilution un échantillon d'eau d'amont, on doit préparer une solution témoin distincte à l'aide du milieu SIS ou du milieu Steinberg modifié,

**Tableau 4. Composition chimique des solutions mères nutritives entrant dans la préparation du milieu SIS et de l'eau réceptrice enrichie de nutriments, en vue des essais toxicologiques sur des échantillons de substances chimiques avec *Lemna minor***

Solution mère	Substance	Concentration	
		Solution mère (g/L)	Milieu <sup>a</sup> (mg/L)
I	NaNO <sub>3</sub>	8,50	85
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,34	13,4
II	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15,0	75
III	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,20	36
IV	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,00	20
V	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,00	1,00
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,200	0,200
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,010	0,010
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,050	0,050
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,005	0,005
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,010	0,010
VI	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,168	0,84
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	0,280	1,40
VII	MOPS (tampon) <sup>b</sup>	488	488

<sup>a</sup> Concentration de la substance dans le milieu SIS préparé.

<sup>b</sup> On recommande le MOPS sous forme d'acide libre, qui se dissout facilement; on peut devoir rajuster le pH.

selon celui qui est utilisé dans l'essai (v. 4.1)<sup>68</sup>. Le milieu d'essai pourrait servir à préparer toutes les dilutions et le témoin lorsqu'un degré poussé de normalisation est exigé pour les essais (p. ex. si la toxicité d'une substance doit être déterminée, puis comparée, dans un certain nombre d'installations d'essai) ou lorsque le prélèvement et l'utilisation de l'eau réceptrice sont impraticables (p. ex. trop coûteux).

<sup>68</sup> La comparaison de la vitesse de croissance des *Lemna* dans le milieu SIS ou le milieu Steinberg modifié et dans l'échantillon d'eau réceptrice enrichie de nutriments prélevé en amont pourrait révéler des réactions toxiques attribuables aux contaminants présents dans l'eau d'amont.

#### 5.4 Observations et mesures au cours de l'essai

Outre les observations relatives à la toxicité exposées en 4.4, certaines autres observations et mesures doivent être effectuées au cours des essais sur des substances chimiques.

Pendant la préparation des solutions et à chaque moment prescrit d'observation au cours de l'essai, on devrait examiner chaque solution afin de vérifier la présence et l'évolution du produit chimique (p. ex. odeur, couleur, opacité, précipitation, floculation). On devrait consigner les observations.

Il est souhaitable et recommandé d'analyser les solutions d'essai afin de doser les produits chimiques auxquels *L. minor* est exposée<sup>69</sup>. Pour les dosages au cours d'un essai sans renouvellement des solutions, on devrait prélever des aliquotes dans toutes les répétitions, du moins dans les concentrations élevée, médiane et faible, de même que dans le ou les témoins. On devrait analyser séparément les aliquotes des échantillons prélevés immédiatement avant le début de l'exposition et à la fin de l'essai, au moins. Pour les dosages pendant un essai à renouvellement intermittent des solutions, on devrait prélever des aliquotes au moins dans les concentrations élevée, médiane et faible, de même que dans le ou les témoins. On devrait au moins analyser séparément les échantillons prélevés au début et à la fin de la période de renouvellement ainsi que la première et la dernière journée de l'essai.

On devrait conserver, entreposer et analyser tous les échantillons selon des méthodes éprouvées, en utilisant des seuils acceptables de détection pour

<sup>69</sup> En raison des coûts, des limites inhérentes aux analyses ou des données techniques antérieures indiquant que le produit est stable en solution dans des conditions analogues à celles de l'essai, il n'est pas nécessaire d'entreprendre ces analyses dans tous les cas. On recommande de procéder à des analyses chimiques si, selon le cas, la substance d'essai ou au moins un de ses ingrédients biologiquement actifs est volatil ou insoluble ou précipite dans la solution, ou encore si l'on sait que la substance entraîne la sorption sur le ou les matériaux des enceintes expérimentales. Certaines situations (p. ex. l'essai d'un pesticide en vue de son homologation) pourraient exiger le dosage du produit dans des solutions d'essai.

L'OCDE exige des analyses chimiques si l'on ne s'attend pas que la substance reste dans la plage de  $\pm 20$  % de sa concentration nominale. Si la concentration initiale mesurée de la substance d'essai sort de cette plage et que l'on peut prouver qu'il est possible de préparer de façon répétée des solutions aux concentrations initiales qui sont stables (c.-à-d. dans la plage de 80 à 120 % des concentrations initiales), on peut effectuer les dosages en n'employant que les concentrations d'essai maximale et minimale. Dans tous les cas, il suffit, avant le renouvellement des solutions, de doser la substance d'essai dans un récipient de répétition de chaque concentration d'essai (ou dans des portions amalgamées de chaque répétition) (OCDE, 1998, 2002).

le dosage de la substance particulière en solution aqueuse. Les résultats toxicologiques de tout essai dans lequel on mesure les concentrations devraient être calculés et exprimés en fonction de ces concentrations mesurées, à moins que l'on ait de bonnes raisons de croire que les dosages n'étaient pas précis<sup>70</sup>. Au cours des calculs, on devrait caractériser chaque solution d'essai par la moyenne géométrique de la concentration mesurée à laquelle les organismes sont exposés.

Au début de l'essai, on enregistre le nombre de thalles et de colonies dans les récipients. On doit noter le nombre de thalles et l'aspect des colonies au début et à la fin de l'essai. Si l'on opte pour la vitesse spécifique moyenne de croissance ou l'aire sous la courbe comme paramètre de mesure statistique (v. la note 46 et la sous-section 4.5.5), on devrait faire deux observations supplémentaires du nombre de thalles (p. ex. aux jours 3 et 5). On devrait noter toute modification dans le développement des plantes, la taille des thalles, leur aspect, la nécrose ou la chlorose, de même que toute observation supplémentaire concernant la longueur des radicules, l'aspect atypique du milieu d'essai (p. ex. présence de matières non dissoutes) ou toute autre anomalie.

## 5.5 Paramètres et calculs

La CI<sub>p</sub> constitue le paramètre statistique que l'on recommande d'utiliser pour un essai à concentrations multiples d'une substance chimique donnée (v. 4.5.2).

Si un témoin contenant le solvant est utilisé pour garder la substance d'essai en solution, il faut s'assurer que le solvant ne provoque pas lui-même d'effets excessifs. L'essai est rendu invalide si la croissance des *Lemna* dans le

<sup>70</sup> D'après l'OCDE (1998, 2002), l'analyse des résultats peut se fonder sur la concentration nominale ou la concentration initiale mesurée, s'il y a lieu de croire que la concentration de la substance d'essai est restée dans la plage de  $\pm 20$  % de la concentration initiale mesurée ou de la concentration nominale tout au long de l'essai. Si l'écart est supérieur à  $\pm 20$  %, on devrait fonder les résultats sur la moyenne pondérée en fonction du temps.



témoin **contenant le** solvant (ou le témoin non traité) ne satisfait pas aux critères de validité précisés **en** 4.5.1.

Quand on utilise un solvant ou un autre produit chimique, **celui-ci sert de** témoin pour évaluer l'effet du toxique. On ne doit pas réunir les données relatives au témoin **contenant le** solvant **et celles** sur l'eau témoin/de dilution, car on risquerait alors d'introduire une erreur systématique dans le calcul des paramètres; dans l'eau témoin/de dilution, il manque un facteur qui pourrait agir sur les organismes aux autres concentrations (**c.-à-d.** le solvant).

La vitesse spécifique moyenne de croissance (**ou** vitesse relative de croissance) **et/ou** l'aire sous la courbe<sup>71</sup> peuvent aussi être calculées d'après les données sur le nombre de thalles. Le calcul de ces deux paramètres facultatifs exige des observations supplémentaires et régulières (p. ex. aux jours 3 et 5) pendant l'essai (v. 4.5.5 et 5.4).

---

<sup>71</sup> Dans **ses lignes directrices pour les** essais **avec des** *Lemna*, l'OCDE exige le calcul de la vitesse spécifique moyenne de croissance ou de l'aire sous la courbe à partir des données sur le nombre de thalles (**recueillies** en quatre occasions au cours de l'essai), de même que de la biomasse finale, à partir d'un autre paramètre de croissance (**masse sèche, masse** humide ou superficie totale des thalles). La validation interlaboratoires de **la version provisoire des lignes directrices** de l'OCDE a montré que, pour estimer la toxicité, la biomasse finale était plus sensible que la vitesse spécifique moyenne de croissance (Sims et **coll.**, 1999). Ce dernier paramètre a cependant pour avantage de réduire au minimum l'effet de la durée d'exposition et de permettre de comparer entre eux les résultats d'essais de durées différentes (Huebert et Shay, 1993; Nyholm, 1990).

Le critère de validité de l'essai **précisé dans les lignes directrices provisoires** de l'OCDE se fonde sur le temps de doublement du nombre de thalles chez le témoin [il doit être inférieur à 2,5 **jours** (60 h)]. Cela correspond à peu près à une multiplication minimale par 8 en 7 jours (OCDE, 1998), soit le critère de validité de la présente méthode (4.5.1). La validation interlaboratoires organisée par l'OCDE montre que la plupart des laboratoires se sont conformés à ce critère. Le non-respect du critère a souvent été corrélé à de faibles intensités lumineuses, à de basses températures ou à un pH **atteignant des valeurs excessives** (Sims et **coll.**, 1999).

## 5.6 Interprétation des résultats

Dans tout essai utilisant **comme eau témoin/de dilution** de l'eau qui n'est pas **un** milieu SIS, **un** milieu Steinberg modifié ou, s'il y a lieu, **un** milieu APHA modifié, il faut particulièrement veiller à comparer la croissance des *Lemna* dans **l'eau témoin/de dilution à celle** dans des témoins étalons utilisant le milieu d'essai (SIS, **Steinberg** ou APHA). Cette comparaison est nécessaire pour déterminer si l'eau témoin/de dilution est phytotoxique. Toute croissance stimulée dans les solutions d'essai par rapport aux solutions témoins doit être signalée et prise en considération dans l'interprétation des résultats (v. 4.5.2 **et** 4.5.4).



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

La présente section renferme des instructions particulières sur le prélèvement et la préparation d'échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat et sur leur emploi dans les essais. Ces instructions s'ajoutent aux procédures exposées à la section 4.

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

Les contenants utilisés pour le transport et l'entreposage des échantillons ou sous-échantillons d'effluent, de lixiviat ou d'élutriat doivent être fabriqués d'un matériau non toxique. Sont recommandés les contenants souples en polyéthylène ou en polypropylène servant au transport de l'eau potable (p. ex. Reliance<sup>MC</sup>). Leur volume peut se contracter pour s'adapter à l'intérieur d'une glacière, et le volume d'air intérieur peut être maintenu au minimum ou parfois même éliminé lorsqu'on y prélève des fractions de l'échantillon au laboratoire en vue d'essais toxicologiques ou d'analyses chimiques. Les contenants doivent être soit neufs, soit nettoyés à fond et rincés à l'eau non contaminée. Il faudrait aussi les rincer avec l'échantillon à prélever et les remplir complètement de façon à supprimer le volume d'air libre.

Avant d'entreprendre le programme, on devrait porter une attention particulière au volume de l'échantillon d'eau usée à obtenir. En général, un échantillon de 4 L d'effluent ou de lixiviat convient à un essai à concentrations multiples réalisé hors site ainsi qu'à l'analyse systématique de l'échantillon qui y est associée. Les essais à concentration unique exigent un volume moindre (v. 4.5.3). Dès le prélèvement, il faut remplir, fermer hermétiquement et étiqueter ou coder chaque contenant. On devrait indiquer sur l'étiquette au moins le type d'échantillon, son origine, la date et l'heure du prélèvement ainsi

que le nom de la ou des personnes ayant procédé au prélèvement. On ne devrait pas soumettre à des essais les échantillons arrivant au laboratoire non étiquetés ou non codés, ni utiliser pour les essais courants les échantillons parvenant au laboratoire dans des contenants partiellement remplis ou non hermétiquement fermés, parce que les toxiques volatils peuvent passer dans le volume d'air. Cependant, s'il sait que la volatilité ne fait pas problème, le responsable de l'essai peut, à son gré, soumettre ces échantillons à des essais. On devrait noter la chaîne de conservation de l'échantillon au cours du prélèvement, du transport et de l'entreposage, de même que tout aspect (anomalie) de l'échantillon susceptible d'influer sur les résultats de l'essai.

On doit s'efforcer de garder les échantillons d'effluent ou de lixiviat au frais ( $1-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de préférence  $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durant le transport. Dès le prélèvement, il faut refroidir à  $1-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  les échantillons tièdes ( $>7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), à l'aide de glace ordinaire (et non de glace sèche) ou de sachets réfrigérants. Au besoin, on doit ajouter dans le contenant de transport des quantités généreuses de glace, de sachets réfrigérants ou d'autres moyens de réfrigération, afin de maintenir la température de l'échantillon dans la plage de  $1-7\text{ }^{\circ}\text{C}$  durant le transport. Les échantillons ne doivent pas geler pendant le transport ou l'entreposage.

Il faut mesurer et noter la température de l'échantillon ou, le cas échéant, de l'un des sous-échantillons (on n'ouvre pas les autres sous-échantillons et on les laisse fermés hermétiquement) dès leur arrivée au laboratoire. On peut amener à la température d'essai, immédiatement ou pendant la nuit, une aliquote d'effluent ou de lixiviat dont on a besoin et l'utiliser dans l'essai. On doit garder dans

l'obscurité le reste de l'échantillon ou des sous-échantillons dont on pourra avoir besoin pour le renouvellement des solutions ou pour des essais supplémentaires, dans des contenants fermés hermétiquement, sans espace libre, à  $4 \pm 2$  °C. Quant aux éluviats et aux échantillons destinés à l'extraction en milieu aqueux puis à l'essai toxicologique, on devrait les transporter et les entreposer dans les conditions précisées pour les effluents et les lixiviats.

Les essais portant sur un effluent, un éluviat ou un lixiviat peuvent être exécutés « hors site » dans des conditions contrôlées de laboratoire. Pour ces échantillons, on recommande comme méthode normalisée l'essai sans renouvellement des solutions. Cependant, si la concentration du constituant actif de l'eau usée est susceptible de diminuer notablement au cours de l'essai, il est recommandé de procéder à un essai à renouvellement intermittent des solutions (v. 4.3).

Si l'on opte pour l'essai sans renouvellement, il faut prélever un seul échantillon d'eau usée et s'en servir pour la préparation des solutions expérimentales au début de l'essai. Si l'on opte pour l'essai à renouvellement intermittent des solutions, il faut prélever les échantillons suivant l'une des deux méthodes et approches suivantes :

- 1) On peut utiliser un seul échantillon d'eau usée tout au long de l'essai, à la condition de le répartir dans trois contenants (c.-à-d. trois sous-échantillons) dès son prélèvement<sup>72</sup>.
- 2) Si l'on sait ou prévoit que la toxicité de l'eau usée évoluera notablement au cours des 7 à 10 jours d'entreposage qui précèdent l'utilisation de cette eau dans l'essai, on doit prélever des échantillons frais en au moins trois occasions distinctes, à des intervalles de deux ou trois jours ou moins. On doit utiliser

ces échantillons successivement au cours de l'essai<sup>73</sup>.

Si l'eau usée est instable, on peut effectuer sur place un essai à renouvellement intermittent avec une eau usée fraîche (v. 4.3).

L'essai sur des échantillons d'effluent et de lixiviat devrait débuter le plus tôt possible après le prélèvement. Dans un essai donné, il faudrait utiliser un échantillon dans les 24 h suivant le prélèvement, si possible, et pas plus de 3 jours après. Si l'on utilise des effluents ou des lixiviats dans un laboratoire sur place, les échantillons devraient servir à l'essai 24 h ou moins après le prélèvement<sup>74</sup> (USEPA, 1989, 2002).

Les échantillons de sédiment ou d'autre matière solide prélevés en vue de l'extraction en milieu aqueux puis d'un essai sur l'éluviat devraient être soumis à l'essai le plus tôt possible après leur prélèvement et pas plus de 10 jours après leur réception au laboratoire. On devrait se conformer aux modes opératoires d'Environnement Canada (EC, 1994) pour la préparation des éluviats. Dans le cas de ces derniers, on devrait utiliser si possible des aliquotes de l'échantillon préparé selon le calendrier indiqué pour les échantillons d'effluent ou de lixiviat. Il n'est pas souhaitable d'entreposer longtemps les échantillons d'éluviat parce que leur toxicité pourrait ne pas être stable. Les essais portant sur des éluviats doivent

<sup>73</sup> Par exemple, si les 3 échantillons sont prélevés à 2 ou 3 jours d'intervalle (p. ex. le lundi, le mercredi et le vendredi), le premier doit servir au début de l'essai (jour 0), le deuxième pour le renouvellement le jour 3 et le troisième pour le renouvellement le jour 5. On pourrait prélever quotidiennement pendant 7 jours consécutifs des échantillons d'eaux usées dont on sait ou prévoit qu'elles seront particulièrement instables si elles doivent être analysées hors site. Chaque échantillon doit être utilisé dans l'ordre dans lequel il a été prélevé pour le renouvellement quotidien (ou plus fréquent) des solutions.

<sup>74</sup> L'essai sur place pourrait se conformer au calendrier et aux modes opératoires des essais hors site. Certains essais sur place pourraient aussi exiger un apport continu d'eau usée fraîche (essais à renouvellement continu) ou à des intervalles d'au plus 12 h dans chaque récipient expérimental.

<sup>72</sup> Par exemple, on pourrait utiliser le premier sous-échantillon au début de l'essai (jour 0), le deuxième pour le renouvellement le jour 3, le troisième pour le renouvellement le jour 5.

débuter dans les 3 jours suivant leur préparation, sauf indication contraire dans un règlement ou une méthode prescrite.

## 6.2 Préparation des solutions d'essai

Il faut agiter vigoureusement, juste avant de le vider, le contenant dans lequel l'échantillon ou le sous-échantillon a été prélevé ou entreposé pour assurer la remise en suspension des matières décantables. Il faut mesurer, immédiatement avant emploi, le pH de chaque échantillon ou sous-échantillon.

Normalement, il n'est ni nécessaire ni recommandé de filtrer les échantillons ou les sous-échantillons. Cependant, si les échantillons d'eau usée sont mélangés avec de l'eau réceptrice ou en contiennent (p. ex. effluent prélevé dans la zone de mélange d'un lac ou d'un cours d'eau), ils peuvent renfermer des algues, de sorte qu'il pourrait être nécessaire de les filtrer pour réduire le risque de contamination (c.-à-d. une croissance excessive des algues) pendant l'essai. Tout échantillon d'eau usée devrait être examiné au microscope afin de détecter la présence éventuelle d'algues. Le cas échéant, il faudrait passer les échantillons sur des filtres en fibre de verre (à pores d'environ 1 µm, p. ex. filtres Whatman GF/C) pour réduire le risque de contamination par les algues. On peut ensuite les passer sur des filtres à ouvertures de 0,22 µm afin de supprimer tout risque résiduel de contamination par les algues (SRC, 1997). Ces filtrations pourraient arrêter des matières en suspension caractéristiques de l'échantillon, qui risquent autrement de contribuer à une partie de la toxicité ou de la modifier. Si l'on s'inquiète de l'effet de la filtration sur la toxicité, on devrait effectuer un deuxième essai (simultané), en tout point identique au premier si ce n'est qu'il porte sur une portion de l'échantillon ou du sous-échantillon non filtré.

On doit ensuite enrichir un échantillon d'eau usée avec les mêmes nutriments que ceux ayant servi à préparer les milieux de croissance APHA modifiés (eau usée enrichie de nutriments)

(v. 6.3; tableau 5). On ajoute une aliquote de chacune des trois solutions mères nutritives (A, B, C) à l'échantillon d'eau usée selon un ratio de 10 mL pour 1 000 mL d'échantillon, ce qui en diminue le titre à 97 %. On aère ensuite l'échantillon enrichi pendant 20 min (v. 4.1) avant de le répartir entre les récipients de répétition.

## 6.3 Eau témoin/de dilution

Pour les essais réalisés sur des effluents ou des lixivats afin d'en déterminer la conformité aux règlements, on doit utiliser le milieu APHA modifié (tableau 5) ou un échantillon de l'eau réceptrice enrichie de solutions mères nutritives APHA modifiées (eau réceptrice enrichie de nutriments) comme eau témoin/de dilution. Il faut définir les objectifs de l'essai avant de choisir l'eau témoin/de dilution qui conviendra, car les résultats pourraient différer selon les deux types d'eau. On devrait aussi tenir compte des difficultés et des coûts reliés au prélèvement et à l'expédition des échantillons d'eau réceptrice devant servir d'eau témoin/de dilution.

On prépare le milieu APHA (modifié) à l'aide de trois solutions mères, comme il est indiqué au tableau 5. On prépare les solutions mères avec des produits chimiques de qualité réactif, dans de l'eau distillée sous verre, de l'eau désionisée ou l'équivalent. Pour préparer 1 L de milieu, on ajoute 10 mL de chaque solution mère (A, B, C) à 970 mL d'eau distillée dans une bouteille de 1 L. On aère le tout vigoureusement pendant au moins 1–2 h. Si l'on prépare un volume plus important de milieu (>4 L), on recommande l'aération de ce dernier pendant la nuit afin de stabiliser le pH. Immédiatement avant l'essai, on rajuste le pH du milieu à  $8,3 \pm 0,1$  au moyen de NaOH ou de HCl 0,5 N<sup>75</sup>. On ne stérilise pas le milieu. On peut entreposer séparément les solutions A, B et C au réfrigérateur ( $4 \pm 2$  °C) pendant un mois au plus.

<sup>75</sup> L'aération stabilise naturellement le pH autour de 8,3 (Moody, 1998).

**Tableau 5. Composition des solutions mères nutritives entrant dans la préparation du milieu APHA modifié et dans l'enrichissement de l'eau usée et de l'eau réceptrice, en vue d'essais toxicologiques sur des échantillons d'effluent, d'élutriat, de lixiviat ou d'eau réceptrice avec *Lemna minor***

Solution mère	Substance	Concentration	
		Solution mère (g/L)	Milieu <sup>a</sup> (mg/L)
A	NaNO <sub>3</sub>	25,5	255
	NaHCO <sub>3</sub>	15,0	150
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,04	10,4
	KCl	1,01	10,1
B <sup>b</sup>	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,41	44,1
	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12,17	121,7
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,414 9	4,149
	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,16	1,6
C <sup>c</sup>	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,7	147
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,186	1,86
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,007 26	0,072 6
	ZnCl <sub>2</sub>	0,003 27	0,032 7
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,001 4	0,014
	CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,5 × 10 <sup>-5</sup>	1,5 × 10 <sup>-4</sup>

<sup>a</sup> Concentration de la substance dans le milieu préparé.

<sup>b</sup> Acidifier la solution B jusqu'à pH 2,0 pour empêcher la précipitation des constituants. Protéger la solution de la lumière en la gardant dans une bouteille ambre foncé.

<sup>c</sup> Pour assurer une plus grande précision, la solution mère C peut aussi être préparée à l'aide de solutions mères plus concentrées de chaque métal trace, comme suit : mesurer et dissoudre 14,7 g de MgSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O par litre et 0,186 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> par litre dans 900 mL d'eau distillée sous verre, d'eau distillée ou l'équivalent. Préparer comme suit des solutions mères distinctes pour chacun des métaux traces restants dans la solution mère C : 0,363 g de NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O par 50 mL, 0,1635 g de ZnCl<sub>2</sub> par 50 mL, 0,0714 g de CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O par 50 mL et 0,0057 g de CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O par 50 mL. Ajouter 1 mL des solutions mères de Na, Zn et Co, et 0,1 mL de la solution mère de Cu aux solutions MgSO<sub>4</sub> et H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et porter le volume à 1 L.

Le milieu APHA modifié constitue l'eau témoin/de dilution exigée ordinairement pour les échantillons d'effluent, d'élutriat et de lixiviat. Cependant, il pourrait être souhaitable d'utiliser de l'eau réceptrice comme eau témoin/de dilution lorsqu'on doit obtenir, pour un site particulier, des renseignements sur l'effet toxique éventuel

d'un effluent, d'un lixiviat ou d'un élutriat sur une eau réceptrice donnée (v. la note 40 et la sous-section 4.1). Un exemple important d'une telle situation serait la détermination de l'effet subléthal d'une substance ou d'une matière à la périphérie de la zone de mélange, conformément aux exigences réglementaires visant un site

donné. Pour le prélèvement, le transport et l'entreposage de ces échantillons d'eau réceptrice, on devrait se plier aux conditions décrites en 6.1.

Avant de l'utiliser, on passe sur un filtre en fibre de verre (pores d'environ 1 µm, p. ex. filtre Whatman GF/C) une aliquote de l'eau réceptrice qui servira d'eau témoin/de dilution pour réduire le risque de contamination des milieux d'essai par les algues. On peut passer ensuite l'échantillon d'eau réceptrice sur des filtres à ouvertures de 0,22 µm, pour empêcher la croissance d'algues (SRC, 1997). Il faut ensuite enrichir l'eau réceptrice selon les mêmes concentrations de nutriments que le milieu APHA modifié [10 mL de chacune des solutions mères (A, B, C) pour 1 000 mL d'eau réceptrice]. On devrait aérer vigoureusement les échantillons d'eau réceptrice enrichie pendant 1–2 h (ou plus longtemps dans le cas de volumes plus importants), sans rajuster le pH, pour stabiliser ce dernier<sup>76</sup>. On enregistre avant l'essai le pH de l'eau réceptrice enrichie et aérée.

Si l'on doit utiliser un échantillon d'eau réceptrice d'amont comme eau témoin/de dilution, il faut préparer une solution témoin distincte à l'aide du milieu APHA modifié. Les conditions expérimentales et les modes opératoires de l'évaluation de chaque solution témoin devraient être identiques à ceux décrits à la section 4 et en 5.3.

Si l'on vise un degré poussé d'uniformisation, on devrait utiliser le milieu APHA modifié pour toutes les dilutions et comme eau témoin, puisque l'emploi d'un milieu donné accroît la probabilité de réduire l'influence qu'exercent des compositions différentes de l'eau de dilution. Cela est particulièrement indiqué dans les études approfondies visant à corrélérer les données toxicologiques relatives à divers types et sources d'effluents, de lixiviats ou d'éluviats provenant d'un certain nombre de laboratoires. Il est alors

souhaitable de réduire au minimum l'influence des propriétés chimiques de l'eau de dilution.

#### 6.4 Observations et mesures au cours de l'essai

Outre les observations et mesures décrites en 4.4, il faudrait en effectuer d'autres au cours des essais sur des effluents, des éluviats et des lixiviats.

Avant et après la filtration de l'échantillon, on devrait en observer et en noter la couleur, la turbidité, l'odeur et l'homogénéité (présence de matières flottantes ou de décantats). On devrait noter tout changement survenant au cours de la préparation de l'échantillon pour essai (p. ex. précipitation, floculation, changement de couleur ou d'odeur, émission de matières volatiles), de même que tout changement d'aspect des solutions au cours de l'essai (p. ex. formation de mousse, dépôt, floculation, accroissement ou diminution de la turbidité, changement de couleur).

Dans le cas d'échantillons d'effluents renfermant une quantité appréciable de matières solides, il est souhaitable de mesurer dès leur réception leur teneur en matières totales en suspension et en matières décantables (APHA et coll., 1995). Ces caractéristiques font partie de la description globale de l'effluent et elles sont susceptibles d'influer sur les résultats de l'essai toxicologique. On devrait aussi effectuer des mesures supplémentaires qui aideraient à caractériser chaque échantillon d'effluent, de lixiviat ou d'éluviat : pH, conductivité, dureté, alcalinité, couleur, demande chimique d'oxygène, demande biochimique d'oxygène, oxygène dissous, concentrations de certains contaminants toxiques (p. ex. acides résiniques, chlorophénols, métaux dissous, chlore, chloramine, ammoniacque), notamment.

#### 6.5 Paramètres et calculs

Les paramètres à mesurer au cours des essais sur des échantillons d'eau usée sont habituellement

<sup>76</sup> Le pH pourrait être considéré comme stable s'il ne varie pas de plus de 0,1 unité en 30 min d'aération.



les  $CI_{25}$  fondées sur l'augmentation du nombre de thalles au cours de l'essai et sur la masse sèche des thalles à la fin de l'essai (indicateurs de la croissance). Pour les essais réalisés aux fins de la surveillance ou de la réglementation des effluents, des lixiviats ou des éluviats, on doit utiliser les options et les paramètres standards définis à la section 4.

Normalement, les essais réalisés à des fins de surveillance ou de vérification de la conformité aux règlements devraient comprendre, pour le moins, trois répétitions ou plus de l'échantillon ou des sous-échantillons non dilués (ou une dilution précisée de ces derniers) et trois solutions témoins ou plus de répétition. Selon les exigences réglementaires précisées, on pourrait limiter les essais de détermination de la conformité à une seule concentration (p. ex. échantillon « non dilué », soit 97 % de la concentration d'origine selon la présente méthode, sauf indication contraire); on pourrait aussi exiger une série de concentrations (c.-à-d. un essai à concentrations multiples) (v. 4.5.2). Les essais à concentration unique sont souvent d'un bon rapport coût-efficacité lorsqu'il s'agit de déterminer si l'on est en présence d'une toxicité mesurable et d'évaluer préalablement un nombre élevé d'échantillons.

On pourrait adapter à des fins spéciales l'essai toxicologique normalisé, par exemple pour repérer dans une usine les sources de toxicité ou pour évaluer l'efficacité de changements apportés

aux procédés ou du traitement des effluents dans une usine. Les essais pourraient porter sur une série de concentrations ou une seule concentration (97 % de la concentration d'origine ou une dilution convenable, plus un témoin). Les paramètres à mesurer dépendraient des objectifs, mais ils pourraient englober des limites arbitraires « satisfaisant/non satisfaisant » ou le taux de ralentissement de la croissance à une concentration donnée (4.5.3).

La sous-section 4.5.3 fournit des indications pertinentes sur l'analyse statistique et les comptes rendus consécutifs aux séries d'essais sur différents échantillons évalués chacun à une concentration seulement.

## 6.6 Interprétation des résultats

Dans tout essai utilisant comme eau témoin/de dilution une autre eau que le milieu APHA modifié, on devrait veiller particulièrement à comparer la croissance des *Lemna* dans cette eau témoin/de dilution à celle de témoins standards dans le milieu APHA modifié. Il est nécessaire de procéder à une comparaison statistique pour déterminer si l'eau témoin/de dilution est phytotoxique (v. 4.5.3). Il faut signaler toute augmentation de la croissance dans les solutions d'essai par rapport à la croissance dans les solutions témoins et en tenir compte dans l'interprétation des résultats de l'essai (v. 4.5.2 et 4.5.4).



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

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

### 7.1 Prélèvement, étiquetage, transport et entreposage des échantillons

Les procédures de prélèvement, d'étiquetage, de transport et d'entreposage des échantillons sont décrites en 6.1. Les essais sur des échantillons ou sous-échantillons d'eau réceptrice devraient débuter le plus tôt possible après le prélèvement, de préférence dans les 24 heures, mais pas plus de 3 jours après.

### 7.2 Préparation des solutions d'essai

On devrait agiter les échantillons qui se trouvent dans les contenants de leur prélèvement, avant de les verser, pour en assurer l'homogénéité.

Il faut passer sur un filtre en fibre de verre (pores de 1 µm, p. ex. filtre Whatman GF/C) chaque échantillon d'eau réceptrice, avant emploi, afin de réduire le risque de contamination par les algues. On peut ensuite le passer sur un filtre à ouvertures de 0,22 µm pour empêcher la croissance d'algues (SRC, 1997). On devrait exécuter en parallèle un deuxième essai avec un échantillon non filtré si l'on craint l'effet de la filtration sur la toxicité (v. 6.2).

On enrichit ensuite les échantillons d'eau réceptrice avec des solutions mères nutritives APHA modifiées, puis on les aère 20 min, à débit lent (v. 4.1 et 6.2).

### 7.3 Eau témoin/de dilution

Quand on prélève des échantillons d'eau de surface à proximité d'un lieu de rejet d'eau usée, d'un déversement de produits chimiques ou d'une autre source ponctuelle de contamination, on peut prélever en même temps de l'eau d'amont et l'utiliser comme eau témoin/de dilution de l'échantillon prélevé en aval (v. la note 37 et la sous-section 6.3). On devrait prélever cette eau le plus près possible de la ou des sources du contaminant, mais en amont ou à l'extérieur de la zone d'influence du contaminant. Il faut filtrer cette eau de surface pour en éliminer les organismes, comme il est indiqué en 7.2.

Si l'on utilise de l'« eau d'amont » comme eau témoin/de dilution, il faut préparer une solution témoin distincte à l'aide du milieu APHA modifié normalement utilisé pour les essais avec *L. minor*. Les conditions et procédures applicables à la préparation et à l'évaluation de chaque solution témoin devraient être identiques et conformes aux descriptions fournies à la section 4 et en 5.3 et 6.3. Il faut comparer statistiquement les résultats des expositions expérimentales à ceux des témoins des récipients renfermant l'eau réceptrice (v. 4.5).

Des contraintes d'ordre logistique, les effets toxiques prévus ou d'autres aspects pratiques propres au site pourraient empêcher ou proscrire l'utilisation d'eau d'amont comme eau témoin/de dilution. Dans de tels cas, on devrait utiliser le milieu APHA modifié pour toutes les dilutions et comme eau témoin (v. 6.3).

### 7.4 Observations et mesures

Les principales observations relatives aux organismes d'essai devraient être conformes à

celles décrites en 4.4. En outre, on devrait observer la couleur et la turbidité de l'échantillon et de la solution, la formation de mousse, de précipité, etc., comme il est indiqué en 6.4, tant au cours de la préparation des solutions d'essai qu'au cours des essais.

On devrait caractériser chimiquement chaque échantillon d'eau réceptrice. Selon la nature prévue des toxiques, les mesures pourraient englober le pH, la conductivité, la dureté, l'alcalinité, la couleur, la demande chimique d'oxygène, la demande biochimique d'oxygène et la teneur en toxiques précis (p. ex. acides résiniques, chlorophénols, métaux dissous, chlore, chloramine, ammoniacque, etc.).

### 7.5 Paramètres et calculs

Les paramètres des essais sur des échantillons d'eau réceptrice devraient correspondre aux options et aux méthodes énoncées en 4.5, 6.5 et 6.6.

Ces essais pourraient faire appel à des concentrations multiples ou à une seule concentration. Les essais de détermination de la conformité aux règlements comprendraient normalement au moins trois répétitions renfermant l'échantillon non dilué (ou, dans le cas du présent essai, dilué à 97 %) et au moins trois solutions témoins de répétition, pour

déterminer l'inhibition de la croissance de *L. minor* exposée pendant 7 jours à une eau réceptrice diluée à 97 % (v. 4.5). Les essais à concentration unique sont souvent d'un bon rapport coût-efficacité lorsqu'il s'agit de déterminer si l'on est en présence d'une toxicité mesurable et d'évaluer préalablement un nombre élevé d'échantillons (p. ex. de divers emplacements dans l'eau réceptrice). Les tests statistiques et la consignation des résultats de ces tests devraient être conformes aux procédures exposées en 4.5.3.

Si l'on prévoit que les échantillons d'eau réceptrice seront toxiques et si l'on veut connaître le degré de dilution nécessaire pour permettre la croissance normale des *Lemna*, on devrait effectuer un essai à concentrations multiples pour déterminer la  $CI_{25}$  de la croissance, conformément à la description fournie à la section 4. Dans tout essai à concentrations multiples, l'eau réceptrice « non diluée » (97 %) enrichie de nutriments devrait constituer la concentration la plus élevée.

Certains ensembles d'essais pourraient comprendre une série d'échantillons « non dilués » (97 %) d'eau de surface, par exemple, provenant d'un certain nombre d'endroits. Les tests statistiques et la consignation des résultats de ces essais devraient être conformes aux procédures exposées en 4.5.3.

## Section 8

### Rapports à produire

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

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

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

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

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

- un enregistrement de la chaîne de transmission des échantillons mis à l'essai à des fins de surveillance ou d'application d'un règlement;
- une copie du dossier d'acquisition de l'échantillon ou des échantillons;
- les résultats des analyses chimiques de l'échantillon ou des échantillons qui ne figurent pas dans le rapport d'essai;
- les notes de laboratoire relatives aux observations et aux mesures effectuées au cours de l'essai;
- les notes de laboratoire et la ou les cartes de contrôle des essais toxicologiques de référence;
- les dossiers détaillés concernant l'origine des organismes d'essai, leur confirmation taxinomique et tous les renseignements pertinents sur leur culture et leur état de santé;
- des renseignements sur l'étalonnage de l'équipement et des instruments.

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

#### 8.1 Exigences minimales pour le rapport d'essai

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

### 8.1.1 Substance ou matière d'essai

- Une courte description du type d'échantillon (p. ex. produit ou substance chimique, effluent, éluviat, lixiviat ou eau réceptrice) tel qu'il a été transmis, le cas échéant, au personnel de laboratoire;
- des renseignements sur l'étiquetage ou le codage de chaque échantillon ou sous-échantillon;
- la date du prélèvement de chaque échantillon ou sous-échantillon;
- la date et l'heure d'arrivée de chaque échantillon ou sous-échantillon au laboratoire;
- les dates ou journées d'utilisation de chaque échantillon ou sous-échantillon au cours de l'essai;
- la température de l'échantillon d'eau usée ou d'eau réceptrice ou, si l'on utilise de nombreux sous-échantillons, la température d'un seul des sous-échantillons à son arrivée au laboratoire;
- le pH de chaque échantillon ou sous-échantillon d'eau usée ou d'eau réceptrice, immédiatement avant sa préparation et son utilisation dans l'essai toxicologique;
- la date de préparation de l'éluviat et la description de la procédure utilisée à cette fin; les dates ou les journées au cours desquelles, dans un essai sur éluviat, on a utilisé chaque échantillon ou sous-échantillon.

### 8.1.2 Organismes d'essai

- Le nom de l'espèce, le code d'identification du clone (s'il est connu) et l'origine de la culture;
- l'âge (c.-à-d. 7 à 10 jours) de la culture d'essai dont on a tiré les inoculums au début de l'essai;

- une indication du caractère axénique ou non de la culture d'essai;
- le milieu de culture de *L. minor*;
- le milieu d'essai dans lequel les *Lemna* ont été acclimatés pendant 18 à 24 heures avant le début de l'essai;
- les données montrant l'augmentation du nombre de thalles dans les récipients servant à surveiller l'état de santé de la culture;
- tout aspect ou traitement inhabituels de la culture d'essai, avant son emploi dans l'essai.

### 8.1.3 Installations et appareils

- Le nom et l'adresse du laboratoire;
- le nom de la ou des personnes ayant réalisé l'essai;
- une courte description des récipients utilisés dans l'essai (taille, forme, matériau).

### 8.1.4 Eau témoin/de dilution

- Le type de milieu d'essai utilisé comme eau témoin/de dilution;
- le type et l'origine de l'eau ayant servi à préparer le milieu d'essai;
- le type et la quantité de produit chimique ayant servi à préparer l'eau témoin/de dilution.

### 8.1.5 Méthode d'essai

- Le nom de la méthode d'essai biologique utilisée (c.-à-d. celle décrite dans le présent document);
- le type d'essai utilisé, c'est-à-dire avec ou sans renouvellement des solutions et, le cas échéant, la fréquence des renouvellements;
- le plan d'étude et la description de toute procédure spéciale (p. ex. filtration ou non de

l'échantillon; rajustement ou non du pH de l'échantillon; préparation et emploi d'un éluat; préparation et emploi d'un solvant et, le cas échéant, d'un témoin) ou modification de la méthode d'essai normalisée;

- une courte description de la fréquence et de la nature de toutes les observations et mesures effectuées au cours de l'essai;
- le nom du ou des programmes et des méthodes employés pour calculer les paramètres statistiques, de même que des renvois à ces programmes et méthodes.

#### 8.1.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La raison et la description de tout écart ou de toute omission en regard des modes opératoires et conditions exposés dans le présent document;
- le nombre, la concentration, le volume et la profondeur des solutions dans les récipients d'essai, y compris les témoins;
- le nombre de thalles par plante et le nombre de plantes par récipient au début de l'essai;
- le nombre de répétitions par traitement;
- une brève mention (y compris de la procédure, du débit et de la durée) de toute aération préalable des échantillons ou des solutions d'essai avant le démarrage de l'essai;
- la description de la méthode de filtration des échantillons (taille des pores des filtres, nombre de filtrations, type de papier filtre, etc.), le cas échéant;
- le type et la quantité de substances chimiques ajoutées à l'échantillon (pour l'enrichir) avant le début de l'essai;
- une courte description de toutes les solutions d'essai ou des échantillons dont le pH a été

rajusté, y compris de la méthode utilisée à cette fin;

- toutes les mesures exigées (v. 4.4) de la température et du pH des solutions d'essai (y compris les témoins) et les mesures du débit de fluence photonique effectuées au cours de l'essai;
- la date et l'heure du début et de la fin de l'essai;
- une brève indication concernant l'application ou non des mêmes conditions expérimentales pour l'essai toxicologique de référence et pour l'essai sur un ou des échantillons; la description de tout écart ou de toute omission en regard des modes opératoires et conditions applicables à l'essai toxicologique de référence exposés dans le présent document.

#### 8.1.7 Résultats

- Le nombre et l'aspect des thalles dans chaque récipient d'essai, selon les notes prises pendant chaque période d'observation au cours des sept journées d'exposition;
- pour chaque traitement, y compris le ou les traitements témoins, l'augmentation moyenne ( $\pm$  ET) du nombre de thalles dans le groupe témoin, déterminée à la fin de l'essai;
- pour chaque traitement, y compris le ou les traitements témoins, la masse sèche moyenne ( $\pm$  ET) des thalles de *Lemna*, déterminée à la fin de l'essai;
- toute  $CI_p$  (et ses limites de confiance à 95 %) de la croissance (c.-à-d. augmentation du nombre de thalles au cours de l'essai et masse sèche des thalles à la fin de ce dernier) obtenue au moyen de concentrations dont le volume a été corrigé pour tenir compte de l'ajout de solution mère nutritive; les détails relatifs à toute technique de pondération appliquée aux données; une indication des statistiques quantitatives utilisées;

- les valeurs aberrantes ainsi que la justification de leur suppression;
- les résultats et la durée de tout essai toxicologique employant un ou des toxiques de référence, effectué dans les 14 jours de l'essai, ainsi que la moyenne géométrique ( $\pm$  ET) que le laboratoire a établie, au cours d'essais antérieurs réalisés selon les procédures et les conditions décrites ici, pour le ou les mêmes toxiques de référence, la même espèce, le même clone et le même milieu d'essai;
- toute stimulation appréciable de la croissance, exprimée en pourcentage de stimulation, à quelque concentration que ce soit;
- toute anomalie dans le déroulement de l'essai, tout problème observé et toute mesure corrective prise.

## 8.2 Exigences supplémentaires

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

### 8.2.1 Substance ou matière d'essai

- Le nom de la ou des personnes ayant prélevé et/ou fourni l'échantillon ou le sous-échantillon;
- la chaîne de transmission et les fiches d'inscription de l'échantillon ou du sous-échantillon;
- l'état (p. ex. température, conservation dans l'obscurité, dans un récipient scellé) de chaque échantillon ou sous-échantillon à l'arrivée au laboratoire, pendant l'entreposage et immédiatement avant l'utilisation.

### 8.2.2 Organismes d'essai

- Le nom de la ou des personnes ayant identifié les organismes, de même que les lignes

directrices taxinomiques utilisées pour confirmer l'identité de l'espèce;

- l'historique de la culture en laboratoire;
- une description des conditions et des modes opératoires de culture, notamment : éclairage (débit de fluence, qualité, photopériode) et température; composition du milieu de culture; procédures et conditions observées pour la préparation et l'entreposage du milieu de culture;
- la fréquence du renouvellement de la culture;
- les modes opératoires, les observations et les enregistrements reliés à la pureté des cultures mères;
- les enregistrements de toutes les courbes de croissance de *Lemna* tracées pour surveiller l'état de santé et le comportement des cultures.

### 8.2.3 Installations d'essai et appareillage

- Une description du système de régulation de l'éclairage et de la température dans les installations de culture et d'essai;
- une description des procédures utilisées pour nettoyer, rincer et stériliser l'appareillage d'essai;
- les fiches d'entretien et les vérifications de la performance de l'appareillage (p. ex. hottes à flux laminaire, enceintes de croissance, appareils de mesure, balances, pipettes).

### 8.2.4 Eau témoin/de dilution

- Des précisions sur l'échantillonnage et l'entreposage, si l'eau témoin/de dilution était de l'eau réceptrice d'amont;
- des précisions concernant tout prétraitement de l'eau (c.-à-d. les procédures et conditions de la filtration, de la stérilisation, de



l'aération, du réglage de la température ou du rajustement du pH);

- toute variable accessoire de la qualité de l'eau mesurée avant et/ou durant l'essai;
- les conditions et la durée d'entreposage de l'eau témoin/de dilution avant son emploi.

### 8.2.5 Méthode d'essai

- Une description de l'expérience accumulée par le laboratoire dans l'application de cette méthode d'essai biologique pour la mesure de la toxicité au moyen de *L. minor*;
- le mode opératoire utilisé pour préparer et entreposer les solutions mères et/ou les solutions d'essai; la description et la ou les concentrations de tout solvant utilisé;
- les méthodes utilisées (avec références) pour l'analyse chimique de l'échantillon ou des solutions d'essai (y compris des précisions sur le prélèvement, la préparation et l'entreposage de l'échantillon ou des solutions, avant les analyses chimiques);
- la description de l'essai préliminaire réalisé pour déterminer la gamme de concentrations.

### 8.2.6 Conditions expérimentales et modes opératoires

- La photopériode, la source lumineuse et le débit de fluence à proximité de la surface des solutions d'essai;
- l'aspect de l'échantillon et des solutions expérimentales avant et après la filtration de l'échantillon, de même que tout changement d'aspect observé au cours de l'essai;
- les mesures de la qualité de l'eau de culture et de l'eau témoin/de dilution;
- toute autre mesure physicochimique effectuée sur l'échantillon, les solutions mères ou les solutions d'essai (p. ex. les concentrations

d'un ou de plusieurs produits chimiques donnés avant et/ou au cours de l'essai);

- les conditions, les modes opératoires, la fréquence, la date et l'heure des essais toxicologiques employant un ou des toxiques de référence et *L. minor*;
- le dosage, c'est-à-dire les analyses chimiques des concentrations de produits chimiques dans les solutions d'essai renfermant le toxique de référence.

### 8.2.7 Résultats de l'essai

- Les résultats de tout essai préliminaire;
- les résultats de toute analyse statistique effectuée avec et sans les valeurs aberrantes; dans le cas des analyses de régression, conserver dans les dossiers les renseignements concernant la taille de chaque échantillon (p. ex. nombre de répétitions par traitement), les estimations paramétriques ainsi que la variance ou l'erreur-type, tout tableau ANOVA produit, les graphiques des valeurs ajustées et observées de tout modèle utilisé, les résultats des tests des valeurs aberrantes et des tests de normalité et d'homoscédasticité;
- les courbes de croissance, le cas échéant;
- une carte de contrôle/de surveillance montrant les résultats les plus récents et les résultats plus anciens des essais toxicologiques au moyen du ou des toxiques de référence;
- la représentation graphique des données toxicologiques;
- les originaux des notes de laboratoire et d'autres feuilles de données, signés et datés par les membres du personnel de laboratoire qui ont effectué les essais et les analyses connexes.

## Références

- Abernethy, S.G., et G.F. Westlake, *Guidelines for pH Adjustment of Effluent Samples for Toxicity Testing*, ministère de l'Environnement de l'Ontario, Rexdale (Ont.) (1989).
- Acreman, J., communication personnelle, Collection de cultures de l'Université de Toronto (1998).
- , *Axenic Culture Techniques for Lemna*, Collection de cultures de l'Université de Toronto, Département de botanique, Université de Toronto, Toronto (Ont.) (2006).
- AFNOR (Association française de normalisation), *Determination of the inhibitory effect on the growth of Lemna minor* XP T 90-337, Paris La Défense Cedex (France) (1996).
- APHA, AWWA et WPCF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Pollution Control Federation), « Toxicity Test Methods for Aquatic Organisms », partie 8000, p. 8-1 à 8-143, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17<sup>e</sup> éd., Washington, DC (1989).
- APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association et Water Environment Federation), « Toxicity », partie 8000, p. 8-39 à 8-32, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18<sup>e</sup> éd., Washington, DC (1992).
- , « Toxicity », partie 8000, p. 8-40 à 8-42, dans : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19<sup>e</sup> éd., Washington, DC (1995).
- ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with *Lemna gibba* G3 », E-1415-91, p. 1-10, dans : *1991 Book of ASTM Standards*, Philadelphie, PA (1991).
- , « Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory Testing », E-1733-95, p. 1279-1289, dans : *1996 Book of ASTM Standards, Volume 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides*, Philadelphie, PA (1995).
- , « Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte *Myriophyllum sibiricum* Komarov », E-1913-97, p. 1428-1441, dans : *1997 Book of ASTM Standards*, Philadelphie, PA (1997).
- Arber, A., *Water Plants: A Study of Aquatic Angiosperms*, Wheldon and Wesley Ltd. and Hafner Publishing Co., New York, NY (1963).
- Billington, J.W., G.-L. Huang, F. Szeto, W.Y. Shiu et D. MacKay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: I. Single Component Systems », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:117-124 (1988).
- Bishop, W.E., et R.L. Perry, « Development and Evaluation of a Flow-through Growth Inhibition Test with Duckweed (*Lemna minor*) », p. 421-435, dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference*, ASTM STP 737, D.R. Branson et K.L. Dickson (éd.), ASTM, Philadelphie, PA (1981).

- Blackman, G.E., et R.C. Robertson-Cuninghame, « Interrelationships between Light Intensity, Temperature, and the Physiological Effects of 2:4-dichlorophenoxyacetic Acid on the Growth of *Lemna minor* », *Journal of Experimental Botany*, 6:156–176 (1955).
- Boutin, C., K.E. Freemark et C.J. Keddy, *Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Nontarget Plant Testing and Evaluation*, Rapport technique 145, Environnement Canada, Service canadien de la faune (administration centrale), Ottawa (Ont.) (1993).
- Britton, N.L., et A. Brown, *An Illustrated Flora of the Northern United States and Canada, Vol. I*, Dover Publications, New York, NY (1970).
- Cowgill, U.M., et D.P. Milazzo, « The Culturing and Testing of Two Species of Duckweed », p. 379–391, dans : *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 12th Vol., ASTM STP 1027, U.M. Cowgill et L.R. Williams (éd.), ASTM, Philadelphie, PA (1989).
- Day, J., et M.R. McLellan (éd.), « Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols », dans : *Methods in Molecular Biology*, vol. 38, Humana Press, Totowa, NJ (1995).
- Deitzer, G., « Spectral Comparisons of Sunlight and Different Lamps », c74, p. 197–199, dans : *Proceedings of International Lighting in Controlled Environments Workshop*, T.W. Tibbits (éd.), 1<sup>er</sup> mars 1994, Madison, WI (1994).
- EC (Environnement Canada), *Document d'orientation sur le contrôle de la précision des essais de toxicité au moyen de produits toxiques de référence*, rapport SPE 1/RM/12, Conservation et Protection, Protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1990).
- , *Méthode d'essai biologique : essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce Selastrum capricornutum*, rapport SPE 1/RM/25, Conservation et Protection, Protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992a).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de reproduction et de survie sur le cladocère Ceriodaphnia dubia*, rapport SPE 1/RM/21, Conservation et Protection, Protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992b).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule*, rapport SPE 1/RM/22, Conservation et Protection, Protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1992c).
- , *Document d'orientation sur le prélèvement et la préparation de sédiments en vue de leur caractérisation physicochimique et d'essais biologiques*, rapport SPE 1/RM/29, Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1994).
- , *Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation de leurs résultats*, rapport SPE 1/RM/34, Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1999a).
- , *Méthode d'essai biologique : essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole, Lemna minor*, rapport SPE 1/RM/37, Service de la protection de l'environnement, Ottawa (Ont.) (1999b).
- , *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, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) (2005).

- Fassett, N.C., *A Manual of Aquatic Plants*, University of Wisconsin Press, Madison, WI (1957).
- Forrow, D., communication personnelle, National Centre for Ecotoxicology and Hazardous Substances, Waterlooville, Hants, Royaume-Uni (1999).
- Godfrey, R.K., et J.W. Wooten, *Aquatic and Wetland Plants of Southeastern United States*, University of Georgia Press, Athens, GA (1979).
- Greenberg, B.M., X.D. Huang et D.G. Dixon, « Applications of the Aquatic Higher Plant *Lemna gibba* for Ecotoxicological Assessment », *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 1:147–155 (1992).
- Hillman, W.S., « The Lemnaceae, or Duckweed. A Review of the Descriptive and Experimental Literature », *Bot. Rev.*, 27:221–287 (1961).
- Hillman, W.S., et D.D. Culley, « The Use of Duckweed », *Amer. Sci.*, 66:442–451 (1978).
- Huang, S.-D., T.S. Babu, C.A. Marwood, R.W. Gensemer, K.R. Solomon et B.M. Greenberg, « Inhibition of Photosynthesis as an Endpoint for the Photoinduced Toxicity of Intact and Photomodified PAHs », p. 443–455, dans : *Environmental Toxicology and Risk Assessment: 6th Vol.*, F.J. Dwyer, T.R. Doane et M.L. Hinman (éd.), ASTM STP 1317, ASTM, Philadelphie, PA (1997).
- Huebert, D.B., J.M. Shay, « Considerations in the Assessment of Toxicity Using Duckweeds », *Environ. Toxicol. Chem.*, 12:481–483 (1993).
- ISO (Organisation internationale de normalisation), *Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water on Duckweed (Lemna minor) – Duckweed Growth Inhibition Test*, version définitive, ISO/FDIS 20079, Genève, Suisse (2005).
- ITM (Institut de recherche environnementale appliquée), *Method for Toxicity Test with the Floating Plant Lemna minor, Duckweed*, rapport ITM 7, préparé par I. Björklund, E. Woode et S. Ullstrand, ITM, Solna (Suède) (1990).
- Jonczyk, E., communication personnelle, Beak International Incorporated, Brampton (Ont.) (1998).
- Jonczyk, E., et G.L. Gilron, « Technical Evaluation of the Proposed Duckweed (*Lemna minor*) Toxicity Test Method », p. 26–29, dans : *Proceedings of the 22nd Annual Aquatic Toxicity Workshop*, St. Andrews, Nouveau-Brunswick, 2–4 octobre 1995, K. Haya et A.J. Niimi (éd.), Pêches et Océans Canada (1996).
- Jenner, H.A., et J.P.M. Janssen-Mommen, « Phytomonitoring of Pulverized Fuel Ash Leachates by the Duckweed *Lemna minor* », *Hydrobiologia*, 188/189:361–366 (1989).
- Kartha, K.K. (éd.), *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1985).
- Landolt, E., et R. Kandeler, *The Family of Lemnaceae – A Monographic Study (Volume 2)*, Veroff, Geobot. Inst. ETH 95, Stiftung Rubel, Zurich, Suisse (1987).
- Lockhart, W.L., et A.P. Blouw, « Phytotoxicity Tests Using the Duckweed *Lemna minor* », p. 112–118 dans : *Toxicity Tests for Freshwater Organisms*, E. Scherer (éd.), publication spéciale du *Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques* 44, Pêches et Océans Canada (1979).

- Lockhart, W.L., B.N. Billeck et C.L. Baron, « Bioassays with a Floating Aquatic Plant (*Lemna minor*) for Effects of Sprayed and Dissolved Glyphosate », *Hydrobiologia*, 188/189:353–359 (1989).
- McCaffrey, L., « The Role of Toxicity Testing in Prosecutions Under Section 14(1)(a) of the Environmental Protection Act, 1971 and Section 32 (1) of the Ontario Water Resources Act », p. 15–22, dans : *Proc. Fifth Annual Aquatic Toxicity Workshop*, Hamilton (Ont.), 7–9 novembre 1978, *Fish. Mar. Serv. Tech. Rep.* 862 (1979).
- Moody, M., communication personnelle, *Saskatchewan Research Council*, Saskatoon (Sask.) (1998).
- Newmaster, S.G., A.G. Harris et L.J. Kershaw, *Wetland Plants of Ontario*, Lone Pines Printing and Queen's Printer for Ontario, Edmonton (Alb.) (1997).
- Nyholm, N., « Response Variable in Algal Growth Inhibition Tests – Biomass or Growth Rate? », *Water Research*, 19:273–279 (1990).
- OCDE (Organisation de coopération et de développement économiques), *OECD Lemna Growth Inhibition Test*, version provisoire (juin 1998).
- , *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Revised Proposal for a New Guideline 221, Lemna sp. Growth Inhibition Test*, Ligne directrice provisoire 221 (juillet 2002).
- Riemer, D.N., *Introduction to Freshwater Vegetation*, Krieger Publishing Company, Malabar, FL (1993).
- Rocchini, R.J., M.J.R. Clark, A.J. Jordan, S. Horvath, D.J. McLeay, J.A. Servizi, A. Sholund, H.J. Singleton, R.G. Watts et R.H. Young, *Provincial Guidelines and Laboratory Procedures for Measuring Acute Lethal Toxicity of Liquid Effluents to Fish*, ministère de l'Environnement de la Colombie-Britannique, Victoria (C.-B.) (1982).
- Sager, J.C., et C. McFarlane, « Radiation », p. 1–30 dans : *Plant Growth Chamber Handbook*, R.W. Langhans et T.W. Tibbits (éd.), North Central Regional Research Publication No. 340, Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Special Report No. 99, Iowa State University of Science and Technology, Ames, IA (1997).
- Scoggan, H.J., « La flore du Canada », vol. 2, *Publications de botanique*, n° 7. Musée national des sciences naturelles, Ottawa (Ont.) (1978).
- Sergy, G., *Recommendations on Aquatic Biological Tests and Procedures for Environmental Protection*, Environnement Canada, Protection de l'environnement, Conservation et Protection, Edmonton (Alb.), (rapport inédit) (1987).
- Shiu, W.Y., A. Maijanen, A.L.Y. Ng et D. Mackay, « Preparation of Aqueous Solutions of Sparingly Soluble Organic Substances: II. Multicomponent Systems—Hydrocarbon Mixtures and Petroleum Products », *Environ. Toxicol. Chem.*, 7:125–137 (1988).
- Sims, I., P. Whitehouse et R.F. Lacey, *The OECD Lemna Growth Inhibition Test: Development and Ring-testing of Draft OECD Test Guideline*, WRc plc, version provisoire d'un rapport technique de R-D, préparé pour l'UK Environment Agency, Bristol, Royaume-Uni (1999).



SIS (Institut des normes de Suède), *Water Quality—Determination of Growth Inhibition (7-d) Lemna minor, Duckweed*, norme suédoise SS 02 82 13, Stockholm, Suède (1995).

Smith, S., et M.K.H. Kwan, « Use of Aquatic Macrophytes as a Bioassay Method to Assess Relative Toxicity, Uptake Kinetics and Accumulated Forms of Trace Metals », *Hydrobiologia*, 188/189:345–351 (1989).

SRC (Saskatchewan Research Council), Annual Report: Development of Aquatic Plant Bioassays for Rapid Screening and Interpretive Risk Assessment of Metal Mining Wastewaters, publication SRC E-2100-2-C-95, préparée pour Environnement Canada et Ressources naturelles Canada, Programme d'innovation environnementale, par le SRC, l'Université technique du Danemark et l'Université de la Saskatchewan (1995).

———, *The Lemna minor Growth Inhibition Test*, publication SRC R-1640-5-C-97, Laboratoire de la section de la qualité de l'eau, Saskatoon (Sask.) (1997).

———, *Research to Assess Potential Improvements to Environment Canada's Lemna minor Test Method*, publication SRC n° 11545-1C03, Saskatoon (Sask.) (2003).

———, *Assessment of Candidate Reference Toxicants and Sensivity to Two Strains of Lemna minor*, publication SRC n° 11545-1C04, Section de la qualité de l'eau, Saskatoon (Sask.) (2005).

Stantec, données inédites obtenues auprès de E. Jonczyk, Stantec Consulting Ltd., Guelph (Ont.) (2005).

Staveley, J., communication personnelle, ARCADIS Geraghty and Miller Inc., Raleigh, NC (1998).

Taraldsen, J.E., et T.J. Norberg-King, « New Method for Determining Effluent Toxicity Using Duckweed (*Lemna minor*) », *Environ. Toxicol. Chem.*, 9:761–767 (1990).

USEPA (United States Environmental Protection Agency), *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, rapport EPA 600/4-89/001, 2<sup>e</sup> éd. (préparée par C.I. Weber, W.H. Peltier, T.J. Norberg-King, W.B. Horning, F.A. Kessler, J.R. Menkedick, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, D.J. Klemm, Q.H. Pickering, E.L. Robinson, J. Lazorchak, L.J. Wymer et R.W. Freyberg), Office of Research and Development, USEPA, Cincinnati, OH (1989).

———, *Methods for Aquatic Toxicity Identification Evaluations. Phase I Toxicity Characterization Procedures*, rapport EPA/600/6-91/003, 2<sup>e</sup> éd. (préparée par T.J. Norberg-King, D.I. Mount, E.J. Durhan, G.T. Ankley, L.P. Burkhard, J.R. Amato, M.T. Lukasewycz, M.K. Schubauer-Berigan et L. Anderson-Carnahan), Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Report 18-90, USEPA, Duluth, MN (1991a).

———, *Toxicity Identification Evaluations: Characterization of Chronically Toxic Effluents, Phase I*, rapport EPA/600/6-91/005 (préparé par T.J. Norberg-King, D.I. Mount, J.R. Amato, D.A. Jensen et J.A. Thompson), Office of Research and Development, National Effluent Toxicity Assessment Center Tech. Report 05-91, USEPA, Duluth, MN (1991b).

———, « *Lemna Acute Toxicity Test* — 797.1160 » (partie 797, « Environmental Effects Testing Guidelines »), *Protection of Environment, Code of Federal Regulations* (édition du 7-1-92) 40:316–319 (1992).



- , *Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp.*, version provisoire publique, niveaux I et II, Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4400, USEPA, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) EPA 712-C-96-156 (1996).
- , *Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, rapport EPA-821-R-02-013, 4<sup>e</sup> éd., Washington, DC (2002).
- Wang, W., « Toxicity of Nickel to Common Duckweed (*Lemna minor*) », *Environ. Toxicol. Chem.*, 6:961–967 (1987).
- , « Literature Review on Duckweed Toxicity Testing », *Environmental Research*, 52:7–22 (1990).
- , « Ammonia Toxicity to Macrophytes (Common Duckweed and Rice) Using Static and Renewal Methods », *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:1173–1177 (1991).
- Wang, W., K. Freemark, « The Use of Plants for Environmental Monitoring and Assessment », *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30:289–301 (1995).

## Membres du Groupe intergouvernemental sur la toxicité de l'environnement (en décembre 2006)

### Gouvernement fédéral, Environnement Canada

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Gouvernement fédéral,  
Pêches et Océans Canada**

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

**Gouvernement fédéral,  
Ressources naturelles Canada**

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

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

**Gouvernements provinciaux**

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

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

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

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

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

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

## Administration centrale et bureaux régionaux du Service de la protection de l'environnement d'Environnement Canada

### Administration centrale

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

### Région de l'Atlantique

Queen Square, 15<sup>e</sup> étage  
45, Alderney Drive  
Dartmouth (N.-É.)  
B2Y 2N6

### Région du Québec

105, rue McGill, 8<sup>e</sup> étage  
Montréal (Qué.)  
H2Y 2E7

### Région de l'Ontario

4905, rue Dufferin, 2<sup>e</sup> étage  
Downsview (Ont.)  
M3H 5T4

### Région de l'Ouest et du Nord

Twin Atria n<sup>o</sup> 2, bureau 210  
4999, 98<sup>e</sup> Avenue  
Edmonton (Alb.)  
T6B 2X3

### Région du Pacifique et du Yukon

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

## Variantes des méthodes de culture de *Lemna* spp. et des essais de mesure de l'inhibition de sa croissance, décrites dans les méthodes canadiennes, étatsuniennes et européennes

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, selon le sigle de l'organisme dont ils émanent, dans l'ordre suivant : (1) grands comités et organismes de l'État; (2) principaux auteurs.

**ITM (1990)** – publication de l'Institut de recherche environnementale appliquée (Institutet för tillämpad miljöforskning), qui énonce les modes opératoires de la culture de *Lemna minor* et des essais toxicologiques avec cette espèce, compilés et utilisés par le Conseil suédois de protection de l'environnement, en collaboration avec le Bureau national d'inspection des produits chimiques (de l'Institut susmentionné), à Solna (Suède).

**ASTM (1991)** – norme publiée par l'American Society for Testing and Materials, pour la réalisation d'essais toxicologiques sans renouvellement des solutions, avec *Lemna gibba* G3.

**APHA (1992)** – publication de l'American Public Health Association, de l'American Water Works Association et de la Water Environment Federation (parue dans *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18<sup>e</sup> éd.), qui expose les méthodes de culture de *L. minor* et d'essai avec cette espèce, désignées comme moyen de surveillance dans le cadre des Études de suivi des effets sur l'environnement, conformément au Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers, promulgué par le gouvernement fédéral du Canada. Ce document a été révisé en 1996.

**USEPA (1992)** – norme publiée par l'Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT), de l'USEPA, pour la réalisation d'essais toxicologiques avec *L. gibba* G3, afin d'obtenir des données sur la phytotoxicité de produits chimiques [sous le régime de la *Toxic Substances Control Act* (TSCA)]. Elle a été publiée dans le titre 40, chapitre I, sous-chapitre R du *Code of Federal Regulations* (CFR). Ce document a été révisé, harmonisé avec d'autres publications et publié de nouveau (sous forme de version provisoire) en 1996 (v. la référence suivante).

**USEPA (1996)** – version provisoire (avril 1996) de la norme OPPTS 850.4400 élaborée par l'OPPT, de l'USEPA, pour la réalisation d'essais toxicologiques avec *L. gibba* G3 et *L. minor*, afin d'obtenir des données sur la phytotoxicité de produits chimiques [sous le régime de la TSCA et de la *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act* (FIFRA)]. Cette norme amalgame : les conseils et exigences sur les essais en vigueur à l'OPPT, publiés dans le titre 40, chapitre I, sous-chapitre R du CFR; ceux de l'Office of Pesticide Programs (OPP), parus dans les publications du National Technical Information Service (NTIS); les lignes directrices publiées par l'OCDE. Elle résulte de l'harmonisation de deux documents : *Lemna Acute Toxicity Test* (40 CFR 797.1160); *Growth and Reproduction of Aquatic Plants (Tier I)* (OPP 122-2) et *Growth and Reproduction of Aquatic Plants (Tier 2)* (OPP 123-2) (*Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision J—Hazard Evaluation; Nontarget Plants*), rapport EPA 540/09-82-020, 1982.

- AFNOR (1996)** – norme publiée par l'Association française de normalisation (méthode d'essai XP T 90-337, 1996). Ce document expose les modes opératoires de la culture de *L. minor* et des essais toxicologiques avec cette espèce.
- OCDE (1998)** – version provisoire (juin 1998) de la norme publiée par l'OCDE. Elle vise à évaluer la toxicité de substances à l'égard de *L. gibba* et de *L. minor* et se fonde sur des lignes directrices et des normes en vigueur publiées par l'ASTM (1991), l'USEPA (1996), l'AFNOR (1996) et le SIS (1995) de Suède.
- SRC (1997)** – mode opératoire normalisé (inédit) élaboré en 1997 par H. Peterson et M. Moody, du Saskatchewan Research Council (Laboratoire de la section de la qualité de l'eau), pour la culture de *L. minor* et son emploi dans des essais. Il se fonde sur la recherche effectuée par Peterson et Moody (1994–1997) et constitue une modification de la méthode d'essai toxicologique (proposée) avec des *Lemna*, n° 1995–8211 de l'APHA.
- MPO (1979)** – voir la référence Lockhart et Blouw, 1979. Cette méthode, publiée dans un document intitulé *Toxicity Tests for Freshwater Organisms*, E. Scherer (éd.), décrit les modes opératoires utilisés pour les essais sur des herbicides et des sédiments avec *L. minor*.
- B & P (1981)** – voir la référence Bishop et Perry, 1981. Cette publication décrit un essai normalisé d'inhibition de la croissance de *L. minor* faisant appel à un renouvellement continu des solutions. Elle compare aussi la sensibilité relative des *Lemna* à celle de poissons et d'invertébrés à l'égard de diverses matières d'essai.
- C & M (1989)** – voir la référence Cowgill et Milazzo, 1989. Cette publication expose les conditions de culture et la composition d'un milieu de culture à long terme pour le maintien de *L. gibba* G3 ainsi que de plusieurs clones de *L. minor*. Les auteurs y examinent et y comparent un certain nombre de paramètres et y étudient la sensibilité relative des deux espèces de *Lemna* et de divers clones à différentes matières.
- T & N-K (1990)** – voir la référence Taraldsen et Norberg-King, 1990. Cette publication décrit une méthode de culture de *L. minor* ainsi qu'une méthode d'essai avec cette espèce, principalement pour les effluents. Les auteurs y analysent également la sensibilité relative de la lentille d'eau, de *Ceriodaphnia dubia* et de la tête-de-boule (*Pimephales promelas*) à différents produits chimiques et effluents.



## 1. Substance et type d'essai

Document <sup>a</sup>	Substance d'essai	Type d'essai	Durée (jours)
ITM (1990)	substances individuelles, eaux usées	sans renouvellement, à renouvellement intermittent <sup>b</sup>	7
ASTM (1991)	substances chimiques, produits du commerce, mélanges connus <sup>c</sup>	sans renouvellement	7
APHA (1992)	métaux, composés organiques, effluents industriels, lixiviats, eaux réceptrices	sans renouvellement, à renouvellement intermittent, à renouvellement continu <sup>b</sup>	4
USEPA (1992)	produits chimiques (en vertu de la TSCA)	à renouvellement intermittent	7
USEPA (1996)	produits chimiques (en vertu de la TSCA et de la FIFRA)	à renouvellement intermittent	7
AFNOR (1996)	substances chimiques, échantillons de surface ou d'eau, effluents industriels ou urbains, eaux souterraines	sans renouvellement, à renouvellement intermittent <sup>b</sup>	4
OCDE (1998)	substances	sans renouvellement, à renouvellement intermittent <sup>b</sup>	7
SRC (1997)	effluents, éluviats, lixiviats, eaux réceptrices, substances chimiques <sup>d</sup>	sans renouvellement	7
MPO (1979)	herbicides, sédiments	n.i. <sup>e</sup>	14
B & P (1981)	métaux lourds, surfactifs, herbicides	à renouvellement continu	7
C & M (1989)	séléniate de sodium (Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub> ) nitrate de cobalt [(CoNO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O] chlorure stannique (SnCl <sub>4</sub> ) sulfate de vanadyle [(VOSO <sub>4</sub> ) · 2H <sub>2</sub> O]	n.i.	7
T & N-K (1990)	effluents, toxiques (un seul à la fois)	à renouvellement intermittent	4

<sup>a</sup> V. les pages précédentes pour connaître les références complètes.

<sup>b</sup> Si les solutions d'essai sont instables (p. ex. forte activité microbienne, forte volatilité, photodégradation ou biodégradation), on devrait les renouveler.

<sup>c</sup> Les effluents, lixiviats, huiles, sédiments particulaires et eaux de surface peuvent aussi faire l'objet d'essais une fois modifié le mode opératoire.

<sup>d</sup> On passe les effluents et les eaux réceptrices sur des filtres en fibre de verre (pores de 1 µm), pour réduire la croissance des algues.

<sup>e</sup> n.i. = Non indiqué.

## 2. Espèces d'essai

Document	Espèce	Souche ou clone	Stade évolutif	Taxinomie confirmée?
ITM (1990)	<i>L. minor</i>	n.i. <sup>a</sup>	étape de croissance la plus intense (couleur pâle et radicelle courte)	n.i.
ASTM (1991)	<i>L. gibba</i>	G3	n.i.	oui
APHA (1992)	<i>L. minor</i>	n.i.	n.i.	oui
USEPA (1992)	<i>L. gibba</i>	G3	culture de moins de 2 semaines; pour un essai donné, on devrait utiliser des sujets cultivés à partir d'un seul thalle isolé	oui
USEPA (1996)	<i>L. gibba</i> <i>L. minor</i>	G3 n.i.	culture de moins de 2 semaines; pour un essai donné, on devrait utiliser des sujets cultivés à partir d'un seul thalle isolé	oui
AFNOR (1996)	<i>L. minor</i>	n.i.	culture d'environ 2 semaines	n.i.
OCDE (1998)	<i>L. gibba</i> <i>L. minor</i>	identifié (si connu)	jeune colonie en croissance rapide, sans lésions visibles <sup>b</sup>	oui
SRC (1997)	<i>L. minor</i>	C4	≤7-10 jours	n.i.
MPO (1979)	<i>L. minor</i>	n.i.	<1 mois	n.i.
B & P (1981)	<i>L. minor</i>	n° 6	n.i.	oui
C & M (1989)	<i>L. gibba</i> <i>L. minor</i>	G3 6591 (CA) <sup>c</sup> 7102(=LMS) (KS) 7101(LMY) (CT) 7136(46) (IL)	n.i.	oui
T & N-K (1990)	<i>L. minor</i>	n.i.	n.i.	n.i.

<sup>a</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>b</sup> Les cultures de bonne qualité se reconnaissent à la forte incidence des colonies comptant au moins deux thalles. Un nombre important de thalles simples dénote un stress dû au milieu, et les matériels végétaux issus de ces cultures ne devraient pas servir dans les essais.

<sup>c</sup> CA = Californie; KS = Kansas; CT = Connecticut; IL = Illinois.

### 3. Entretien des cultures mères

Document	Milieu	Repiquage	Récipient	Profondeur ou volume	Axénie?
ITM (1990)	milieu de culture mère	mensuel, 10 jeunes plantes vertes	fioles Erlenmeyer de 300 mL	5–6 cm	oui
ASTM (1991)	milieu E+, milieu H.M. ou 20X-AAP <sup>a</sup>	hebdomadaire	n.i. <sup>b</sup>	n.i.	oui
APHA (1992)	milieu nutritif pour <i>Lemna</i>	mensuel; ajout hebdomadaire de nutriments	aquarium de 15 L ou bassin en acier inoxydable	≥40 mm	non
USEPA (1992)	milieu Hoagland	au besoin	aquarium	n.i.	oui
USEPA (1996)	milieu H.M.	au besoin	aquarium	n.i.	oui
AFNOR (1996)	milieu de culture	tous les 14 jours, 10 plantes à deux thalles	n.i.	150 mL	oui
OCDE (1998)	<i>L.g.</i> : 20X-AAP <sup>a, c</sup> <i>L.m.</i> : SIS <sup>d, e</sup>	mensuel <sup>f</sup>	verre	n.i.	oui
SRC (1997)	milieu E+	hebdomadaire	25 tubes à essai de 150 mm à capsule Kimcaps®	25 mL	oui
MPO (1979)	milieu M Hillman	n.i.	fioles Erlenmeyer de 250 mL	100 mL	oui
B & P (1981)	milieu Hutner × 0,01	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
C & M (1989)	milieu H.M.	<i>L.g.</i> : 5 plantes (15 thalles) toutes les semaines <sup>c</sup> <i>L.m.</i> : 10 plantes (30 thalles) toutes les semaines <sup>d</sup>	fioles Erlenmeyer en verre de 250 mL enceinte Shimadzu	100 mL	oui
T & N-K (1990)	eau enrichie de nutriments	n.i.	aquarium de 10 L	4 L	n.i.

<sup>a</sup> milieu E+ = milieu E+ Hoagland; milieu H.M. = milieu E+ Hoagland modifié; 20X-AAP = 20 fois la concentration du milieu AAP (pour les essais avec des algues microscopiques).

<sup>b</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>c</sup> *L.g.* = *Lemna gibba*.

<sup>d</sup> *L.m.* = *Lemna minor*.

<sup>e</sup> Le milieu SIS est semblable au milieu d'inoculation utilisé dans les normes suédoises (ITM, 1990). V. l'annexe D, tableau 1.

<sup>f</sup> Les repiquages mensuels peuvent être espacés à une fois tous les trois mois, si les cultures sont gardées à basse température (4–10 °C).

#### 4. Type de milieu de culture

Document	Milieu	Modification(s) chimique(s) du milieu	Type d'eau	Préparation
ITM (1990)	milieu de culture mère	les milieux de culture et d'inoculation (acclimatation) sont plus riches en azote (N) et en phosphore (P) pour prévenir les carences vers la fin de la croissance le MOPS est recommandé comme tampon	désionisée ou l'équivalent	mélanger 6 des 8 solutions mères avec de l'eau; rajuster le pH à 6,5; porter le volume à 1 L; stériliser à l'autoclave ou par filtration; ajouter les solutions 7 et 8
ASTM (1991)	milieu E+ <sup>a</sup>	aucune	désionisée ou distillée	9 solutions mères; porter le volume à 1 L; rajuster le pH à 4,6; autoclaver
	ou milieu H.M.	identique au milieu E+ Hoagland, mais sans sucrose, EDTA, bactotryptone ou levure	désionisée ou distillée	2 solutions mères; porter le volume à 1 L; autoclaver; rajuster le pH à 4,9–5,1
	ou 20X-AAP	mêmes nutriments que dans le milieu AAP (pour les essais avec des algues microscopiques), mais à 20 fois la concentration; pH 7,5	désionisée ou distillée	7 solutions mères; porter le volume à 1 L; rajuster le pH à 7,4–7,6; stériliser par passage sur filtre à pores de 0,22 µm
APHA (1992)	solution nutritive pour <i>Lemna</i>	omettre l'EDTA si les échantillons d'essai renferment des métaux toxiques (acidifier à pH 2 pour empêcher la précipitation si l'on omet l'EDTA)	désionisée	3 solutions mères; rajuster le pH à 7,5–8,0
USEPA (1992)	milieu nutritif Hoagland	pas d'EDTA, ni autres chélateurs ni métabolites organiques tels que le sucrose	désionisée ou distillée	rajuster le pH à 4,8–5,2
USEPA (1996)	milieu nutritif H.M.	pas d'EDTA ni métabolites organiques tels que le sucrose	de grande qualité (p. ex. distillée, désionisée ou ASTM de type I)	rajuster le pH à 4,8–5,2
	ou 20X-AAP	l'EDTA assure la biodisponibilité des nutriments traces pour les thalles; pas de métabolites organiques tels que le sucrose	de grande qualité	rajuster le pH à 7,4–7,6

#### 4. Type de milieu de culture (suite)

Document	Milieu	Modification(s) chimique(s) du milieu	Type d'eau	Préparation
AFNOR (1996)	milieu concentré	milieu de culture constitué à 10 % de milieu concentré et à 90 % d'eau	distillée ou l'équivalent	7 solutions mères; porter le volume à 1 L; rajuster le pH à 5,0–6,0; stériliser par passage sur filtre à pores de 0,22 µm
OCDE (1998)	<i>L.g.</i> : 20X-AAP <sup>b, c</sup>	aucune	distillée	rajuster le pH à 7,4–7,6
	<i>L.m.</i> : milieu SIS <sup>c, d</sup>	FeCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (0,84 mg/L) plutôt que le citrate d'ammonium et de fer (III); pas d'acide citrique <sup>e</sup>	distillée	rajuster le pH à 6,3–6,7
SRC (1997)	milieu E+	aucune	n.i. <sup>f</sup>	n.i.
MPO (1979)	milieu M Hillman	aucune	distillée	mélanger 10 des 11 solutions mères; porter le volume à 1 L; autoclaver; ajouter la solution mère de FeCl <sub>3</sub> (autoclavée séparément)
B & P (1981)	milieu Hutner × 0,01	aucune	filtrée <sup>g</sup>	dilueur à circulation continue
C & M (1989)	milieu E+	aucune	distillée	9 solutions mères; porter le volume à 1 L; rajuster le pH à 4,6; autoclaver
T & N-K (1990)	eau enrichie de nutriments	eau reconstituée (APHA, 1985) et sol du commerce; pas d'EDTA	n.i.	filtrer (ouvertures de 1,2 µm)

<sup>a</sup> milieu E+ = milieu E+ Hoagland; milieu H.M. = milieu Hoagland modifié. Est acceptable tout milieu permettant d'obtenir une biomasse au moins cinq fois plus élevée des témoins en moins de 7 jours.

<sup>b</sup> *L.g.* = *Lemna gibba*.

<sup>c</sup> On peut utiliser pour les cultures mères d'autres milieux riches en nutriments.

<sup>d</sup> *L.m.* = *Lemna minor*.

<sup>e</sup> Il s'agit de modifications d'une version antérieure (ITM, 1990) du milieu étalon suédois.

<sup>f</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>g</sup> Eau de puits filtrée sur charbon actif et par osmose inverse.

## 5. Conditions de culture

Document	Température (°C)	Photopériode	Type d'éclairage	Intensité lumineuse <sup>a</sup>
ITM (1990)	8-10	constante	fluorescent (blanc chaud)	2 × 10 W
ASTM (1991)	25 ± 2	constante	fluorescent (blanc chaud)	6 200-6 700 lux
APHA (1992)	25 ± 2	constante	fluorescent (blanc froid)	4 300 ou 2 150 lux
USEPA (1992)	n.i. <sup>b</sup>	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1996)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
AFNOR (1996)	25 ± 1	16 h de clarté, 8 h d'obscurité	n.i.	3 500 ± 500 lux
OCDE (1998)	24 ± 2 (4-10, facultatif)	continue	fluorescent (blanc chaud ou blanc froid)	6 500-10 000 lux <sup>c</sup>
SRC (1997)	25 ± 2	continue	fluorescent (en spectre continu)	4 000-4 500 lux
MPO (1979)	25	16 h de clarté, 8 h d'obscurité	Sylvanic Gro-Lux (usage botanique)	60 μE/m <sup>2</sup> · s <sup>-1</sup>
B & P (1981)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
C & M (1989)	25 ± 2	n.i.	n.i.	<i>L.g.</i> : 6 461 ± 323 <sup>d</sup> <i>L.m.</i> : 5 385 ± 323 <sup>e</sup>
T & N-K (1990)	25	n.i.	n.i.	n.i.

<sup>a</sup> L'intensité lumineuse est mesurée au niveau de la solution d'essai.

<sup>b</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>c</sup> Les plantes peuvent être gardées sous éclairage réduit.

<sup>d</sup> *L.g.* = *Lemna gibba*.

<sup>e</sup> *L.m.* = *Lemna minor*.



## 6. Acclimatation et sélection des organismes d'essai

Document	Milieu	Conditions d'acclimatation	Période d'acclimatation
ITM (1990)	milieu d'inoculation <sup>a</sup>	démarrage avec 10 à 12 plantes; mêmes conditions d'éclairage et de température que dans l'essai; pas de remplacement du milieu durant l'acclimatation	10–14 jours ou lorsqu'il y a 100–200 thalles dans chaque fiole
ASTM (1991)	milieu E+, milieu Hoagland ou 20X-AAP	mêmes conditions d'éclairage et de température que dans l'essai	8 semaines
APHA (1992)	solution nutritive pour <i>Lemna</i>	mêmes conditions que dans l'essai	2 semaines
USEPA (1992)	milieu Hoagland	n.i. <sup>b</sup>	<2 semaines
USEPA (1996)	milieu H.M. ou 20X-AAP	n.i.	<2 semaines
AFNOR (1996)	milieu de culture	choisir des plantes à deux thalles dans une culture de 14 jours et repiquer dans les conditions de culture pour emploi dans l'essai	5–18 heures
OCDE (1998)	<i>L.g.</i> : 20X-AAP <sup>c</sup> <i>L.m.</i> : milieu SIS <sup>d</sup>	on repique une quantité suffisante de colonies dans un milieu stérile frais et on les cultive dans les conditions de l'essai	7–10 jours <sup>e</sup>
SRC (1997)	milieu APHA modifié	150 boîtes de Petri de 25 mm; dans les conditions de l'essai <sup>f</sup>	18–24 heures
MPO (1979)	milieu M Hillman	les organismes d'essai sont choisis dans la culture mère	<1 mois
B & P (1981)	n.i.	n.i.	n.i.
C & M (1989)	milieu E+	les organismes d'essai sont choisis dans la culture mère	8 semaines
T & N-K (1990)	n.i.	n.i.	n.i.

<sup>a</sup> milieu E+ = milieu E+ Hoagland; milieu H.M. = milieu Hoagland modifié. Le milieu d'inoculation est identique au milieu de base (v. l'annexe D, tableau 1), sauf que l'on double la concentration des solutions mères II (azote) et V (phosphore) pour prévenir la carence en ces éléments vers la fin de la croissance.

<sup>b</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>c</sup> *L.g.* = *Lemna gibba*.

<sup>d</sup> *L.m.* = *Lemna minor*.

<sup>e</sup> Si l'on prélève les plantes sur le terrain, on devrait les conserver en culture pendant au moins 8 semaines avant de les utiliser. Si les plantes proviennent d'un autre laboratoire ou d'une collection de cultures, on devrait les conserver en culture pendant au moins 3 semaines.

<sup>f</sup> Les plantes destinées à l'essai sont choisies dans une culture d'essai d'où l'on en transfère entre 10 et 20, en aseptie, d'une culture en tubes d'essai d'une semaine et on les garde 7–10 jours dans 100 mL de milieu E+ Hoagland.

## 7. Type de milieu d'essai

Document	Milieu	Modification(s) chimique(s) du milieu	Type d'eau	Préparation
ITM (1990)	milieu de base	même composition que le milieu de culture mère (v. l'annexe C, tableau 4), mais contenant moins de N et de P	désionisée ou l'équivalent	8 solutions mères ajoutées à l'eau; rajuster le pH; porter le volume à 1 L; pas d'autoclavage
ASTM (1991)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)			
APHA (1992)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)			
USEPA (1992)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)			
USEPA (1996)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4) <sup>a</sup>			
AFNOR (1996)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)			
OCDE (1998)	comme pour le milieu de culture : 20X-AAP, dans le cas de <i>L. gibba</i> ; milieu SIS dans le cas de <i>L. minor</i> (annexe C, tableau 4)			
SRC (1997)	milieu APHA (modifié) <sup>b</sup>	ajout de KCl; omission de l'EDTA	Milli-Q	3 solutions mères; porter le volume à 1 L; aérer 1–2 h; rajuster le pH à 8,3; pas d'autoclavage
MPO (1979)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)			
B & P (1981)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)			
C & M (1989)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)			
T & N-K (1990)	eau enrichie de nutriments  ou milieu APHA modifié (1985)	comme pour le milieu de culture (annexe C, tableau 4)  pas d'EDTA; MgCl <sub>2</sub> = 12,16 mg/L	n.i. <sup>c</sup>	n.i.

<sup>a</sup> Le milieu Hoagland modifié devrait servir à la préparation de la solution d'essai si l'on présume que l'agent chélateur interagira avec la substance chimique d'essai.

<sup>b</sup> L'eau réceptrice peut servir de milieu d'essai afin d'évaluer l'effet de l'eau usée sur son environnement immédiat.

<sup>c</sup> n.i. = Non indiqué.

## 8. Système d'essai<sup>a</sup>

Document	Réceptif d'essai	Concentrations d'essai	Plan d'expérience
ITM (1990)	fioles Erlenmeyer de 300 mL ou d'une taille suffisante pour que les thalles ne se recouvrent pas; bouchonnées au moyen de tampons de cellulose non hermétiques	série géométrique; coefficient de dilution de 0,83–0,5 <sup>b, c</sup>	répartition aléatoire et déplacement quotidien des réceptifs
ASTM (1991)	verre : béciers de 250 mL, tubes à essai de 200 mL à fond plat, bocaux à conserve de 250 mL ou fioles Erlenmeyer de 250 ou de 500 mL; remplis aux 2/5 avec la solution d'essai; on peut utiliser des réceptifs en plastique si les <i>Lemna</i> n'adhèrent pas aux parois et si le matériau ne se prête pas à la sorption; couvrir <sup>e</sup>	≥5 + témoin(s); série géométrique; coefficient de dilution ≥0,6 <sup>c</sup>	répartition aléatoire des réceptifs (DAB <sup>d</sup> )
APHA (1992)	60 boîtes de Petri en verre de 15 mm; on peut utiliser des réceptifs en plastique si les <i>Lemna</i> n'y adhèrent pas; couvrir	≥6 + témoin(s); coefficient de dilution de 0,5	n.i. <sup>f</sup>
USEPA (1992)	béciers ou fioles Erlenmeyer en verre d'une taille suffisante pour permettre la croissance des thalles sans encombrement (contenance recommandée : 250 mL) <sup>e</sup>	≥5 + témoin(s) <sup>c</sup>	DBAC <sup>g</sup> ou répartition aléatoire dans les enceintes
USEPA (1996)	béciers ou fioles Erlenmeyer en verre d'une taille suffisante pour permettre la croissance des thalles sans encombrement (contenance recommandée : 250 mL); remplis aux 2/5 avec la solution d'essai <sup>e</sup>	≥5 + témoin(s); série géométrique; coefficient de dilution de 0,67–0,5 <sup>c</sup>	DBAC ou répartition aléatoire dans les enceintes
AFNOR (1996)	fioles Erlenmeyer de 250 mL, cristallisoirs ou autres, ≥4 cm de hauteur et ≥35 cm <sup>2</sup> de superficie; bouchons perméables à l'air	3–4 dans la plage d'inhibition de 10–90 % de la croissance; série géométrique; coefficient de dilution de 0,1 pour les substances et de 0,5 pour les échantillons d'eau	n.i.
OCDE (1998)	fioles Erlenmeyer, cristallisoirs ou boîtes de Petri en verre, ≥20 mm de profondeur, ≥100 mL de contenance, d'une taille suffisante pour permettre la croissance des thalles sans chevauchement; couvrir	≥5 + témoin(s); série géométrique; coefficient de dilution ≥0,3	répartition aléatoire des réceptifs; plan d'expérience figé ou repositionnement des réceptifs après les observations
SRC (1997)	gobelets en polystyrène de 1 oz (30 mL); couvrir d'un couvercle en polystyrène pour boîte de Petri	10 + témoin(s); série géométrique <sup>h, i</sup>	n.i.
MPO (1979)	fioles Erlenmeyer de 125 mL	n.i.	n.i.
B & P (1981)	réceptifs en verre de 7,5 cm × 10,8 cm × 6,8 cm	5 + témoin(s)	n.i.
C & M (1989)	fioles Erlenmeyer en verre de 250 mL; enceinte Shimadzu	6 + témoin(s); coefficient de dilution de 0,1	n.i.
T & N-K (1990)	gobelets en plastique polystyrène de 30 mL	séries de dilution selon les coefficients de 0,5, 0,3 et 0,25	DAB; rotation quotidienne des tables d'essai

<sup>a</sup> Essais et culture dans une enceinte environnementale, un incubateur, une enceinte à température constante ou une armoire convenablement éclairée et à température constante.

<sup>b</sup> En raison de l'ajout de solutions mères et du rajustement du pH, il est peu probable que l'on puisse utiliser des concentrations d'eau usée supérieures à 90–95 %.

<sup>c</sup> Les concentrations choisies devraient encadrer les concentrations efficaces prévues (p. ex. CI<sub>10</sub>, CI<sub>50</sub>, CSEO).

<sup>d</sup> DAB = dispositif aléatoire par blocs.

<sup>e</sup> Toutes les enceintes expérimentales et tous les couvercles utilisés dans un essai doivent être identiques.

<sup>f</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>g</sup> DPAC = dispositif par blocs aléatoires complets.

<sup>h</sup> En raison de l'ajout de solution mère, la concentration maximale possible d'effluent est de 97 %.

<sup>i</sup> Les concentrations d'essai devraient comprendre les concentrations inhibant l'augmentation de la biomasse à moins de 10 % et à plus de 90 %. Les autres concentrations intermédiaires entre ces extrêmes encadreront la CI<sub>25</sub> et la CI<sub>50</sub>.

## 9. Conditions d'essai

Document	Volume du milieu d'essai	Nombre de plantes par récipient <sup>a</sup>	Nombre de thalles par plante	Nombre de thalles inoculés	Nombre de récipients de répétition	Renouvellement des solutions d'essai
ITM (1990)	250 mL	3	3	9	5	jours 2 et 4 <sup>b</sup>
ASTM (1991)	2/5 de la contenance	3-5 <sup>c</sup>	3-4 <sup>c</sup>	12-16 <sup>c</sup>	≥3	aucun
APHA (1992)	15 mL	≥6 <sup>d</sup>	2	≥12	4	tous les jours si l'on évalue la toxicité de l'effluent dans le milieu récepteur
USEPA (1992)	150 mL	3	4	12	7	jours 3 et 6 ou plus fréquemment <sup>e</sup>
USEPA (1996)	150 mL	3-5 <sup>c</sup>	3-4 <sup>c</sup>	12-16 <sup>c</sup>	3	jours 3 et 5 ou plus fréquemment <sup>e</sup>
AFNOR (1996)	4 cm de profondeur	8	2	16	3	tous les jours
OCDE (1998)	n.i. <sup>f</sup>	n.i.	2-4 <sup>c</sup>	9-12 <sup>c</sup>	≥3	≥2 fois (p. ex. jours 3 et 5) <sup>g, h</sup>
SRC (1997)	25 mL	1	3	3	8	aucun
MPO (1979)	50 mL	n.i.	n.i.	10	5	n.i.
B & P (1981)	400 mL	7 (moins les radicules) <sup>i</sup>	2	14	4	à renouvellement continu; 14 renouvellements par jour
C & M (1989)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
T & N-K (1990)	15 mL	6 (moins les radicules)	2	12	4	tous les jours

<sup>a</sup> On devrait veiller à ce que, au départ, plantes et thalles soient à peu près de la même taille et de la même qualité dans chaque enceinte.

<sup>b</sup> On renouvelle les solutions d'essai si l'on s'attend à ce que la concentration de la substance d'essai (ou de l'ingrédient actif dans l'eau usée) diminue de façon marquée au cours de l'essai, si le pH change considérablement ou si l'activité microbienne est élevée.

<sup>c</sup> Le nombre de plantes et de thalles doit être identique ou le plus identique possible dans chaque récipient d'essai.

<sup>d</sup> La coupe des radicules avant le début de l'essai est facultative.

<sup>e</sup> On devrait transférer plus souvent les colonies pour que les substances d'essai très volatiles se maintiennent à 80 % de la concentration initiale.

<sup>f</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>g</sup> On devrait procéder à un essai à renouvellement intermittent des solutions si un essai préliminaire de détermination de la stabilité montre que la concentration de la substance d'essai ne peut être maintenue au cours de l'essai (c.-à-d. si la concentration mesurée tombe sous 80 % de sa valeur initiale mesurée). Dans certaines circonstances, on pourrait recourir au renouvellement continu.

<sup>h</sup> Des renouvellements plus fréquents pourraient être nécessaires pour maintenir les concentrations de substances instables ou volatiles.

<sup>i</sup> On coupe les radicules avec des ciseaux avant le début de l'essai.

## 10. Éclairage, température et pH au cours de l'essai

Document	Photopériode	Intensité lumineuse	Type d'éclairage <sup>a</sup>	Température (°C)	Gamme de pH
ITM (1990)	24 h	4 000–6 000 lux <sup>b</sup>	fluorescent (blanc chaud)	25 ± 1	5,5–7,5
ASTM (1991)	24 h	6 200–6 700 lux <sup>b, c</sup>	fluorescent (blanc chaud)	25 ± 2	n.i. <sup>d</sup>
APHA (1992)	24 h	4 300 ou 2 150 lux	fluorescent (blanc froid)	25 ± 2	7,5–9,0
USEPA (1992)	24 h	350–450 µE/m <sup>2</sup> · s <sup>-1c</sup>	n.i.	25 ± 2	4,8–5,2 <sup>e</sup>
USEPA (1996)	24 h	4 200 et 6 700 lux <sup>b, c</sup>	fluorescent (blanc chaud)	25 ± 2	4,8–5,2 ou 7,4–7,6 <sup>e, f</sup>
AFNOR (1996)	24 h	3 000–4 000 lux <sup>g</sup>	fluorescent (universel blanc; naturel)	25 ± 1	6,5–8,5 <sup>e</sup>
OCDE (1998)	24 h	6 500–10 000 lux <sup>b, c</sup>	fluorescent (blanc chaud ou froid)	24 ± 2	6,0–8,0 <sup>h</sup>
SRC (1997)	24 h	4 000–4 500 lux <sup>b</sup>	fluorescent (en spectre continu)	25 ± 2	8,3–9,0
MPO (1979)	16 h d'éclairage, 8 h d'obscurité	60 µE/m <sup>2</sup> · s <sup>-1</sup>	Sylvanic Gro-Lux (usage botanique)	25	n.i.
B & P (1981)	24 h	3 875 lux	fluorescent (Gro & Sho et blanc froid)	22 ± 1	n.i.
C & M (1989)	n.i.	<i>L.g.</i> : 6 461 ± 323 lux <sup>i</sup> <i>L.m.</i> : 5 385 ± 323 lux <sup>j</sup>	n.i.	25 ± 2	4,8–5,2
T & N-K (1990)	24 h	1 505–1 725 lux <sup>k</sup>	fluorescent (blanc chaud)	25	n.i.

<sup>a</sup> Répartition égale de l'éclairage au-dessus de toute la surface exposée.

<sup>b</sup> L'intensité lumineuse ne devrait pas varier de plus de ±15 % de la valeur choisie, sur toute la surface du milieu d'incubation.

<sup>c</sup> L'intensité lumineuse est mesurée à la surface de la solution.

<sup>d</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>e</sup> Aucun rajustement du pH.

<sup>f</sup> pH entre 4,8 et 5,2 pour le milieu Hoagland modifié et entre 7,4 et 7,6 pour le milieu 20X-AAP.

<sup>g</sup> Intensité lumineuse mesurée au niveau des récipients d'essai.

<sup>h</sup> Le pH du milieu témoin ne devrait pas augmenter de plus de 1,5 unité au cours de l'essai.

<sup>i</sup> *L.g.* = *Lemna gibba*.

<sup>j</sup> *L.m.* = *Lemna minor*.

<sup>k</sup> La lumière est diffusée à l'aide d'un rectangle de plastique translucide de 66 cm sur 50, de 0,32 cm d'épaisseur.

## 11. Surveillance de la qualité de l'eau au cours de l'essai

Document	Variable <sup>a</sup>	Fréquence (jours)
ITM (1990)	cond., pH	– au début de l'essai, avant et après chaque renouvellement des solutions, à la fin de l'essai
	conc.	– avant le renouvellement des solutions, à la fin de l'essai
	T	– régulièrement
ASTM (1991)	pH, conc.	– au début et à la fin de l'essai; chez les témoins et aux concentrations élevée, médiane et faible
	T	– maximum et minimum horaires ou quotidiens
APHA (1992)	pH, OD, cond., T	– au début et à la fin de l'essai; à toutes les concentrations et chez tous les témoins
USEPA (1992)	pH, conc.	– avant et après le renouvellement des solutions, aux jours 3, 6 et 7
USEPA (1996)	pH, conc.	– avant et après le renouvellement des solutions, aux jours 3, 5 et 7
AFNOR (1996)	n.i. <sup>b</sup>	n.i.
OCDE (1998)	pH	– au début et à la fin de l'essai ainsi qu'en au moins deux autres occasions, dans le cas de l'essai sans renouvellement; avant et après chaque renouvellement des solutions dans le cas de l'essai à renouvellement intermittent
	intensité lumineuse	– une fois au cours de l'essai
	T	– au moins tous les jours
	conc.	– solutions fraîchement préparées ou concentrations maximale et minimale d'essai <sup>c</sup>
SRC (1997)	pH	– à la fin de l'essai; chez les témoins ainsi qu'aux concentrations élevée et faible
	T	– en continu ou maximum et minimum quotidiens
MPO (1979)	n.i.	n.i.
B & P (1981)	n.i.	n.i.
C & M (1989)	n.i.	n.i.
T & N-K (1990)	pH, T	– au début de l'essai (avant l'ajout des thalles) et après chaque renouvellement des solutions
	cond.	– au début de l'essai (avant l'ajout des thalles)

<sup>a</sup> conc. = concentration de la substance d'essai; cond. = conductivité spécifique; OD = oxygène dissous; pH = concentration des ions hydrogène; T = température.

<sup>b</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>c</sup> Si l'on s'attend que la concentration de la substance d'essai s'écarte de plus de ±20 % de la valeur nominale, il faut analyser toutes les solutions fraîchement préparées, puis toutes les solutions fraîches à chaque renouvellement. Toutefois, si la concentration initiale de la substance s'écarte de plus de ±20 % de la valeur nominale, mais que l'on peut fournir suffisamment de preuves selon lesquelles elle est répétable et stable (c.-à-d. dans la plage de 80–120 % de la valeur initiale), on peut effectuer les dosages des concentrations maximale et minimale seulement. Dans tous les cas, il faut doser la substance d'essai avant le renouvellement, dans un seul récipient de répétition et pour chaque concentration (ou dans le contenu des récipients regroupés par répétition). S'il est évident que la concentration de la substance soumise à l'essai se maintient de façon satisfaisante durant l'essai à ±20 % de la concentration nominale ou de la concentration initiale mesurée, l'analyse des résultats peut se fonder sur les valeurs nominales ou initiales mesurées. Si l'écart par rapport à la concentration nominale ou initiale mesurée est supérieur à ±20 %, l'analyse des résultats devrait se fonder sur la moyenne pondérée en fonction du temps.



## 12. Observations biologiques au cours de l'essai et paramètres biologiques

Document	Variable	Fréquence (jours)	Équipement spécial	Paramètre(s) biologique(s)	Autres observations
ITM (1990)	nombre de thalles <sup>a</sup>	jours 2, 4, 7 <sup>b</sup>	loupe	croissance	n.i. <sup>c</sup>
	masse sèche (105 °C; 24 h)	jour 7		croissance	
ASTM (1991)	nombre de thalles <sup>a, d</sup> ou nombre de plantes	n.i.	n.i.	croissance	changement de couleur, fragmentation de la colonie, destruction des radicelles
	masse sèche (constante à 60 °C) <sup>e</sup>			croissance	
APHA (1992)	nombre de thalles <sup>a, e</sup>	tous les jours	microscope au moins 2 ×	croissance	chlorose, nécrose, fragmentation de la colonie, destruction des radicelles, perte de flottabilité, gibbosité
USEPA (1992)	nombre de thalles <sup>a, f</sup>	au début, aux jours 3 et 6 et à la fin de l'essai	loupe simple ou microscope à dissection	croissance, mortalité	nécrose, chlorose (teneur en chlorophylle), perte de flottabilité
USEPA (1996)	nombre de thalles <sup>a, e, f</sup>	au début, aux jours 3 et 5 et à la fin de l'essai	loupe simple ou microscope à dissection	croissance, mortalité	nécrose, chlorose, taille des thalles, perte de flottabilité
AFNOR (1996)	nombre de thalles <sup>a</sup>	à la fin de l'essai; facultativement : tous les jours	n.i.	croissance	couleur, chlorose, taille des thalles, nécrose, dissociation des thalles, perte de la flottabilité, perte des radicelles
OCDE (1998)	nombre de thalles	au début et tous les 3 jours	n.i.	croissance	taille des thalles, aspect, nécrose ou mortalité, longueur des radicelles
	masse sèche (constante à 60 °C); poids frais; ou superficie totale des thalles	au début <sup>g</sup> et à la fin de l'essai		croissance	
SRC (1997)	nombre de thalles <sup>a, h</sup>	à la fin de l'essai	n.i.	croissance	chlorose, nécrose, couleur, taille des thalles, gibbosité, fragmentation des colonies

## 12. Observations biologiques au cours de l'essai et paramètres biologiques (suite)

Document	Variable	Fréquence (jours)	Équipement spécial	Paramètre(s) biologique(s)	Autres observations
MPO (1979)	nombre de thalles	tous les jours	n.i.	croissance	n.i.
	% de chlorose	tous les jours		chlorose	
B & P (1981)	nombre de thalles <sup>a</sup>	tous les jours	n.i.	croissance	n.i.
	masse sèche (103 °C; 3 h)	à la fin de l'essai			
	longueur des radicelles	à la fin de l'essai			
C & M (1989)	nombre de thalles, nombre de plantes	n.i.	microscope à dissection	croissance	n.i.
	longueur des radicelles				
	masse sèche (constante à 60 °C)				
	chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i>		chromatographe liquide à haute performance (HPLC)		
T & N-K (1990)	azote de Kjeldahl				
	nombre de thalles <sup>a</sup>	tous les jours		croissance	n.i.
	chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> et <i>c</i> phéophytine <i>a</i>	à la fin de l'essai	spectrophotomètre	teneur en chlorophylle	

<sup>a</sup> Devrait compter comme un thalle distinct toute projection au-delà de la périphérie du thalle mère.

<sup>b</sup> On devrait utiliser les mêmes répétitions pour tous les dénombrements.

<sup>c</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>d</sup> On ne devrait pas compter les thalles dépigmentés.

<sup>e</sup> On peut mesurer d'autres paramètres (p. ex. superficie des thalles, nombre de colonies, nombre de radicelles, longueur des radicelles, biomasse fraîche, assimilation du carbone 14, concentration de chlorophylle totale, concentration des chlorophylles *a*, *b* et *c*, azote de Kjeldahl et phéophytine).

<sup>f</sup> On compte les thalles vivants et les thalles morts.

<sup>g</sup> On détermine la masse sèche moyenne des plantes servant d'inoculum au début de l'essai en prélevant des échantillons représentatifs au début de l'essai.

<sup>h</sup> On dénombre dans chaque gobelet les thalles jaunes et verts, mais non les blancs, les bruns ou les noirs.

### 13. Paramètres statistiques

Document	Paramètre(s)	Mode de détermination ou de calcul
ITM (1990)	CE <sub>50</sub> , CE <sub>10</sub>	graphique; programme statistique
	CSEO, CMEO	ANOVA ou test de Dunnett
ASTM (1991)	CI <sub>50</sub>	graphique; interpolation statistique
	CSEO	test d'hypothèse, test d'hétérogénéité et comparaison par paires; test de la table de contingence; ANOVA; comparaisons multiples
APHA (1992)	CI <sub>10</sub> , CI <sub>50</sub> , CI <sub>90</sub>	graphique; méthodes statistiques
USEPA (1992)	CE <sub>10</sub> , CE <sub>50</sub> , CE <sub>90</sub>	graphique; méthodes statistiques (test de conformité) pour les courbes concentration-réponse
USEPA (1996)	CE <sub>5</sub> , CE <sub>50</sub> , CE <sub>90</sub> , CSEO, CMEO	graphique; méthodes statistiques (test de conformité) pour les courbes concentration-réponse
AFNOR (1996)	CI <sub>50</sub>	graphique; méthodes statistiques
OCDE (1998)	CE <sub>50</sub>	graphique; régression non linéaire employant la fonction appropriée [courbe logistique, modèle normal cumulatif ou interpolation linéaire avec la méthode bootstrap (CI <sub>p</sub> )]; interpolation statistique
	CSEO, CMEO	ANOVA, méthode de comparaisons multiples (p. ex. test de Dunnett ou de Williams) et analyse non paramétrique (test de sommation des rangs de Wilcoxon), si les conditions de normalité (test de Shapiro-Wilk) et d'homogénéité (p. ex. tests de Bartlett ou de Levene) sont gravement enfreintes
SRC (1997)	valeurs CI <sub>x</sub> (p. ex. CI <sub>25</sub> et CI <sub>50</sub> )	modèle de régression non linéaire
MPO (1979)	n.i. <sup>a</sup>	n.i.
B & P (1981)	CE <sub>50</sub>	modèle de régression non linéaire
C & M (1989)	comparaison des moyennes	$\chi^2$ , coefficients de corrélation linéaire
T & N-K (1990)	données numériques	ANOVA
	CMEO, CSEO	test de Dunnett
	valeur chronique	moyenne géométrique de la CSEO et de la CMEO

<sup>a</sup> n.i. = Non indiqué.

## 14. Validité de l'essai

Document	Croissance acceptable chez le témoin	T <sup>a</sup> (°C)	pH <sup>b</sup>	Autres conditions (« Essai invalide si... »)
ITM (1990)	temps de doublement du nombre de thalles : ≤50 h masse sèche moyenne : ≥8 mg/répétition masse moyenne des thalles : 0,1–0,2 mg	n.i. <sup>c</sup>	1,0	l'inoculum ne provient pas d'une monoculture; la concentration de la substance d'essai est inférieure à 70 % de la valeur nominale (condition ne s'appliquant pas aux eaux usées)
ASTM (1991)	nombre de thalles : ≥5 fois plus élevé	n.i.	4	les récipients d'essai et les couvercles ne sont pas identiques; la répartition des traitements ou des plantes n'est pas aléatoire; on a omis les témoins des solvants du milieu de croissance; l'acclimatation n'est pas conforme au mode opératoire; l'essai dure moins de 7 jours; la température n'est pas mesurée; l'intensité lumineuse s'écarte de plus de 15 % de la valeur choisie; le nombre de plantes et de thalles n'est pas identique dans tous les récipients, au début de l'essai
APHA (1992)	nombre de thalles : ≥2 fois plus élevé en 4 jours	n.i.	n.i.	chez les témoins, le taux de mortalité, de morbidité ou de stress excède 10 %
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1996)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
AFNOR (1996)	coefficient quotidien de croissance (μ) <sup>d</sup> = 0,25–0,35 <sup>d</sup>	n.i.	n.i.	la CI <sub>50</sub> du dichromate de potassium (toxique de référence) est inférieure à 10 mg/L ou supérieure à 30 mg/L
OCDE (1998)	temps de doublement du nombre de thalles : <2,5 jours (60 h) biomasse : ≅8 fois plus élevée en 7 jours	24 ± 2	6,0–8,0	n.i.

## 14. Validité de l'essai (suite)

Document	Croissance acceptable chez le témoin	T <sup>a</sup> (°C)	pH <sup>b</sup>	Autres conditions (« Essai invalide si... »)
SRC (1997)	nombre de thalles : ≥ 8 fois plus élevé en 7 jours	25 ± 2	n.i.	il y a croissance manifeste d'algues; les <i>Lemna</i> n'ont pas été maintenues en conditions axéniques de croissance rapide dans le milieu E+ Hoagland par repiquage hebdomadaire; l'éclairage et la température n'ont pas été constants durant l'essai; l'essai sur l'effluent n'a pas été entrepris dans les 72 h suivant le prélèvement; chez les témoins, la vitesse moyenne de croissance et le taux moyen d'inhibition de l'augmentation de la biomasse par le toxique de référence se situent hors des limites de confiance cumulatives à 95 % d'au moins 5 essais
MPO (1979)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
B & P (1981)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
C & M (1989)	nombre de plantes et nombre de thalles : 3 fois plus élevé en 7 jours	n.i.	n.i.	n.i.
T & N-K (1990)	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

<sup>a</sup> Variation maximale de la température autorisée dans les récipients au cours de l'essai.

<sup>b</sup> Variation maximale du pH autorisée dans les récipients témoins au cours de l'essai.

<sup>c</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>d</sup>

$$\mu = \frac{\ln N_4 - \ln N_0}{4}$$

où :

N<sub>4</sub> est le nombre de thalles observé dans le récipient témoin après 4 jours;

N<sub>0</sub> est le nombre de thalles observé dans le récipient témoin au début de l'essai.

## 15. Toxique de référence

Document	Produit chimique	Concentration (mg/L)	Fréquence
ITM (1990)	n.i. <sup>a</sup>	n.i.	n.i.
ASTM (1991)	n.i.	n.i.	n.i.
APHA (1992)	chromate de potassium	20 ou 35 (en tant que Cr)	à tous les essais comme témoin positif
USEPA (1992)	n.i.	n.i.	n.i.
USEPA (1996)	chlorure de zinc (ZnCl <sub>2</sub> )	n.i.	périodiquement
AFNOR (1996)	dichromate de potassium (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	10 à 30 <sup>b</sup> (en tant que Cr)	selon la fréquence des essais
OCDE (1998)	à déterminer	à déterminer	à déterminer
SRC (1997)	chromate de potassium	1 (en tant que Cr)	chaque fois que l'on effectue un essai
MPO (1979)	n.i.	n.i.	n.i.
B & P (1981)	n.i.	n.i.	n.i.
C & M (1989)	n.i.	n.i.	n.i.
T & N-K (1990)	chlorure de sodium (NaCl)	15 000, 4 000	6 essais

<sup>a</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>b</sup> Cl<sub>50</sub> du dichromate de potassium après 4 jours à l'égard de *L. minor*.



## Milieux de culture et d'essai utilisés dans les essais d'inhibition de la croissance de *Lemna* spp., selon les méthodes canadiennes, étatsuniennes et européennes

Les documents de base sont énumérés dans l'ordre chronologique, selon le sigle de l'organisme dont ils émanent.

**ITM (1990)** – publication de l'Institut de recherche environnementale appliquée (Institutet för tillämpad miljöforskning), qui énonce les modes opératoires de la culture de *Lemna minor* et des essais toxicologiques avec cette espèce, compilés et utilisés par le Conseil suédois de protection de l'environnement, en collaboration avec le Bureau national d'inspection des produits chimiques (de l'Institut susmentionné), à Solna (Suède).

**ASTM (1991)** – norme publiée par l'American Society for Testing and Materials, pour la réalisation d'essais toxicologiques sans renouvellement des solutions, avec *Lemna gibba* G3.

**APHA (1992)** – publication de l'American Public Health Association, de l'American Water Works Association et de la Water Environment Federation (parue dans *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 18<sup>e</sup> éd.), qui expose les méthodes de culture de *L. minor* et d'essai avec cette espèce, désignées comme moyen de surveillance dans le cadre des Études de suivi des effets sur l'environnement, conformément au Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers, promulgué par le gouvernement fédéral du Canada. Ce document a été révisé en 1996.

**USEPA (1992)** – norme publiée par l'Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT), de l'USEPA, pour la réalisation d'essais toxicologiques avec *L. gibba* G3, afin d'obtenir des données sur la phytotoxicité de produits chimiques [sous le régime de la *Toxic Substances Control Act* (TSCA)]. Elle a été publiée dans le titre 40, chapitre I, sous-chapitre R du *Code of Federal Regulations* (CFR). Ce document a été révisé, harmonisé avec d'autres publications et publié de nouveau (sous forme de version provisoire) en 1996 (v. la référence suivante).

**USEPA (1996)** – version provisoire (avril 1996) de la norme OPPTS 850.4400 élaborée par l'OPPT, de l'USEPA, pour la réalisation d'essais toxicologiques avec *L. gibba* G3 et *L. minor*, afin d'obtenir des données sur la phytotoxicité de produits chimiques [sous le régime de la TSCA et de la *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act* (FIFRA)]. Cette norme amalgame : les conseils et exigences sur les essais en vigueur à l'OPPT, publiés dans le titre 40, chapitre I, sous-chapitre R du CFR; ceux de l'Office of Pesticide Programs (OPP), parus dans les publications du National Technical Information Service (NTIS); les lignes directrices publiées par l'OCDE. Elle résulte de l'harmonisation de deux documents : *Lemna Acute Toxicity Test* (40 CFR 797.1160); *Growth and Reproduction of Aquatic Plants (Tier 1)* (OPP 122-2) et *Growth and Reproduction of Aquatic Plants (Tier 2)* (OPP 123-2) (*Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision J—Hazard Evaluation; Nontarget Plants*), rapport EPA 540/09-82-020, 1982.

**AFNOR (1996)** – norme publiée par l'Association française de normalisation (méthode d'essai XP T 90-337, 1996). Ce document expose les modes opératoires de la culture de *L. minor* et des essais toxicologiques avec cette espèce.

**OCDE (1998)** – version provisoire (juin 1998) de la norme publiée par l'OCDE. Elle vise à évaluer la toxicité de substances à l'égard de *L. gibba* et de *L. minor* et se fonde sur des lignes directrices et des normes en vigueur publiées par l'ASTM (1991), l'USEPA (1996), l'AFNOR (1996) et le SIS (1995) de Suède.

**SRC (1997)** – mode opératoire normalisé (inédit) élaboré en 1997 par H. Peterson et M. Moody, du Saskatchewan Research Council (Laboratoire de la section de la qualité de l'eau), pour la culture de *L. minor* et son emploi dans des essais. Il se fonde sur la recherche effectuée par Peterson et Moody (1994–1997) et constitue une modification de la méthode d'essai toxicologique (proposée) avec des *Lemna*, n° 1995–8211 de l'APHA.

**SRC (2003)** – rapport (inédit) préparé par M. Moody du Saskatchewan Research Council (Laboratoire de la section de la qualité de l'eau), décrivant la mise au point d'un milieu E+ Hoagland modifié pour la culture de *L. minor*, à l'issue de recherches effectuées par l'auteure. Ce milieu constitue une modification du milieu E+ Hoagland décrit dans la première édition de la méthode d'essai d'Environnement Canada avec *L. minor*.

**ISO (2005)** – version provisoire d'une méthode d'essai normalisée internationale servant à mesurer les effets de composantes de l'eau et d'eau usée sur la croissance de *L. minor*, publiée par l'Organisation internationale de normalisation, Genève, Suisse.

**MPO (1979)** – voir la référence Lockhart et Blouw, 1979. Cette méthode, publiée dans un document intitulé *Toxicity Tests for Freshwater Organisms*, E. Scherer (éd.), décrit les modes opératoires utilisés pour les essais sur des herbicides et des sédiments avec *L. minor*.

# 1. ITM (1990) – Milieux de culture et d'essai pour *Lemna minor*

Substance	Concentration				Élément	Solution mère
	Solution mère (g/L)	Milieu <sup>a</sup> (mg/L)				
		de base <sup>b</sup>	de culture <sup>c, d</sup>	d'inoculation <sup>d, e</sup>		
MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	15	75	75	75	n.i. <sup>f</sup>	I
NaNO <sub>3</sub>	8,5	42,5	425	85	n.i.	II
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,2	36	36	36	n.i.	III
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,0	20	20	20	n.i.	IV
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,34	6,7	67	13,4	n.i.	V
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	1,0	1,0	1,0	n.i.	VI
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,2	0,2	0,2	0,2	n.i.	VI
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	0,010	0,010	n.i.	VI
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,050	0,050	0,050	0,050	n.i.	VI
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,005	0,005	0,005	0,005	n.i.	VI
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	0,010	0,010	n.i.	VI
Na <sub>2</sub> EDTA	0,28	1,4	1,4	1,4	n.i.	VII <sup>g</sup>
Acide citrique	0,12	0,6	0,6	0,6	n.i.	VII <sup>g</sup>
Citrate d'ammonium et de fer (III)	0,12	0,6	0,6	0,6	n.i.	VII <sup>g</sup>
MOPS (tampon) <sup>h</sup>	488 <sup>i</sup>	488	488	488	n.i.	VIII <sup>g</sup>
<b>Rajustement du pH</b>	<b>Rajuster le pH à 6,5 au moyen de NaOH ou de HCl.</b>					
<b>Stérilisation</b>	<b>On stérilise les solutions mères par filtration stérilisante (pores de 0,2 µm) ou par autoclavage.</b>					

<sup>a</sup> Concentration de la substance dans le milieu.

<sup>b</sup> Milieu de culture synthétique complet, utilisé pour la dilution de la substance d'essai ou de l'eau usée.

<sup>c</sup> Milieu de culture synthétique complet, utilisé pour l'entretien des cultures mères de *Lemna*.

<sup>d</sup> On a augmenté le titre des solutions mères II (azote) et V (phosphore) pour empêcher que les plantes servant à l'inoculation ne souffrent d'une carence en nutriments au cours de la dernière partie de la période de croissance.

<sup>e</sup> Milieu de culture synthétique complet, utilisé pour l'acclimatation des *Lemna*, 10-12 jours avant l'essai.

<sup>f</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>g</sup> Ajout après autoclavage.

<sup>h</sup> Rajustement du pH à 6,5 au moyen de NaOH.

<sup>i</sup> Si l'on s'attend à une variation considérable du pH, on devrait ajouter davantage de tampon (2,0 mL par litre de solution d'essai).

## 2. **ASTM (1991)** – Milieu de culture et d'essai E+ Hoagland pour *Lemna gibba* G3

Substance <sup>a</sup>	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère (g/L)	Milieu <sup>b</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50,00	500,0	n.i. <sup>c</sup>	E
KNO <sub>3</sub>	75,76	1 515,2	n.i.	A <sup>d</sup>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	59,00	1 180,0	n.i.	A
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00	680,0	n.i.	A
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	2,86	n.i.	F
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3,62	3,62	n.i.	F
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,12	0,12	n.i.	F
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,22	0,22	n.i.	F
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,08	0,08	n.i.	F
EDTA	9,00	9,00	n.i.	D <sup>e</sup>
Sucrose	----	1 × 10 <sup>4</sup>	n.i.	G
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5,40	5,40	n.i.	C
Extrait de levure	----	100	n.i.	H
Bactotryptone	----	600	n.i.	I
Acide tartrique	3,00	3,00	n.i.	B

**Rajustement** du pH **Rajuster le** pH à 4,60 **au moyen de** KOH ou **de** HCl.

**Stérilisation** Autoclaver 20 min à 121 °C et sous pression de 1,1 kg/cm<sup>2</sup>.

<sup>a</sup> Il a été montré que l'ajout des éléments suivants au milieu de culture de *L. gibba* G3 **favorise la croissance de cette dernière** : Se, 4,2 µg/L; V, 25,6 µg/L; Co, 20,3 µg/L; Sn, 457 µg/L (Cowgill et Milazzo, 1989).

<sup>b</sup> Concentration de la substance dans le milieu préparé.

<sup>c</sup> **n.i.** = Non indiqué.

<sup>d</sup> Ajouter 6 mL **de** HCl 6 N à la solution mère A.

<sup>e</sup> Ajouter 8 mL de KOH 6 N à la solution mère D.

### 3. **ASTM (1991)** – Milieu de culture et d'essai Hoagland modifié<sup>a</sup> (pas de sucrose ni d'EDTA) pour *Lemna gibba* G3

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère (g/L)	Milieu <sup>b</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	n.i. <sup>c</sup>	492	n.i.	A <sup>d</sup>
KNO <sub>3</sub>	n.i.	1 515	n.i.	A
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	n.i.	1 180	n.i.	A
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	n.i.	680	n.i.	A
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	n.i.	2,86	n.i.	B <sup>e</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	n.i.	3,62	n.i.	B
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	n.i.	0,12	n.i.	B
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	n.i.	0,22	n.i.	B
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	n.i.	0,08	n.i.	B
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	n.i.	5,40	n.i.	A
Acide tartrique	n.i.	3,00	n.i.	A

**Rajustement du pH** **Rajuster** le pH à 5,0 ± 0,1 au moyen de KOH ou **de** HCl N 0,1.

**Stérilisation** Autoclaver 20 min à 121 °C et sous pression de 1,1 kg/cm<sup>2</sup>.

<sup>a</sup> Ce milieu est le même que le milieu E+ Hoagland (tableau 2), sauf que l'on y a omis le sucrose, la bactotryptone, la levure et l'EDTA.

<sup>b</sup> Concentration de **la** substance dans le milieu préparé.

<sup>c</sup> **n.i.** = Non indiqué.

<sup>d</sup> Ajouter chaque substance chimique (A) à de l'eau distillée ou désionisée.

<sup>e</sup> Ajouter 1 mL de la solution mère d'oligo-éléments (solution B).

4. **ASTM (1991)** – Milieu de culture et d'essai 20X-AAP<sup>a</sup> pour *Lemna gibba*

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère <sup>b</sup> (g/L)	Milieu <sup>c</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,70	38,22	S	D
NaNO <sub>3</sub>	25,50	84,00	N	A
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,410	24,04	Ca	F
NaHCO <sub>3</sub>	15,00	220,02	Na	B
	----	42,86	C	B
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,044	9,38	K	C
	----	3,72	P	C
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,185 52	0,649 20	B	G
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,415 61	2,307 48	Mn	G
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12,164	58,08	Mg	E
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,007 26	0,057 56	Mo	G
ZnCl <sub>2</sub>	0,003 27	0,031 4	Zn	G
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,2 × 10 <sup>-5</sup>	8 × 10 <sup>-5</sup>	Cu	G
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,001 43	0,007 08	Co	G
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b> · 2H <sub>2</sub> O	0,300	----	----	G
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,160	0,66102	Fe	G
<b>Rajustement</b> du pH	<b>Rajuster</b> le pH à 7,5 ± 0,1 au moyen de NaOH ou <b>de</b> HCl 0,1 N.			
<b>Stérilisation</b>	Passer le milieu sur un filtre à membrane <b>à</b> pores de 0,22 µm et recueillir dans un récipient stérile.			

<sup>a</sup> La force ionique est beaucoup **moins élevée** que celle du milieu Hoagland.

<sup>b</sup> Ajouter 20 mL de chacune des solutions mères **de macro**-éléments (solutions A à F) et 20 mL de la solution mère d'oligo-éléments (solution G) à environ 800 mL d'eau désionisée ou distillée. **Porter** le volume à 1 L.

<sup>c</sup> Concentration de l'élément dans le milieu.



## 5. **APHA (1992)** – Solution nutritive de culture et d'essai pour *Lemna minor*

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère <sup>a</sup> (g/L)	Milieu <sup>b</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,7	19,1	S	C
NaNO <sub>3</sub>	25,5	42,0	N	A
	----	110,0	Na	A
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,41	12,0	Ca	B
NaHCO <sub>3</sub>	15,0	21,4	C	A
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,04	4,69	K	A
	----	1,86	P	A
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,186	0,325	B	C
MnCl <sub>2</sub>	0,264	1,15	Mn	B
MgCl <sub>2</sub>	5,7	29,0	Mg	B
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,007 26	0,028 8	Mo	C
ZnCl <sub>2</sub>	0,003 27	0,015 7	Zn	C
CuCl <sub>2</sub>	9 × 10 <sup>-6</sup>	4 × 10 <sup>-5</sup>	Cu	C
CoCl <sub>2</sub>	0,000 78	0,003 54	Co	C
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b> · 2H <sub>2</sub> O <sup>c</sup>	0,3	----	----	B
FeCl <sub>3</sub>	0,096	0,33	Fe	B
<b>Rajustement</b> du pH	<b>Rajuster</b> le pH à 7,5–8,0.			
Stérilisation	Aucune.			

<sup>a</sup> Pour préparer la solution nutritive pour *Lemna*, ajouter 1 mL de chacune des solutions mères à 100 mL d'eau désionisée.

<sup>b</sup> Concentration de l'élément dans le milieu.

<sup>c</sup> Omettre ce composé de la solution B si les **échantillons pour** essai renferment des métaux toxiques. Dans ce cas, acidifier la solution B jusqu'à pH 2 pour empêcher la précipitation.

6. **USEPA (1992 et 1996)<sup>a</sup> – Milieu de culture et d'essai Hoagland modifié<sup>b</sup> (sans sucrose ni EDTA) pour *Lemna gibba***

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère (g/L)	Milieu <sup>c</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	n.i. <sup>d</sup>	492	n.i.	A <sup>e</sup>
KNO <sub>3</sub>	n.i.	1 515	n.i.	A
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	n.i.	1 180	n.i.	A
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	n.i.	680	n.i.	A
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	n.i.	2,86	n.i.	B <sup>f</sup>
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	n.i.	3,62	n.i.	B
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	n.i.	0,12	n.i.	B
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	n.i.	0,22	n.i.	B
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	n.i.	0,08	n.i.	B
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	n.i.	5,40	n.i.	A
Acide tartrique	n.i.	3,00	n.i.	A

**Rajustement** du pH     **Rajuster** le pH à 5,0 ± 0,2 au moyen de NaOH 0,1 N<sup>g</sup>.

Stérilisation             Autoclave.

<sup>a</sup> Dans USEPA (1996), on recommande le milieu Hoagland modifié ou le milieu nutritif 20X-AAP.

<sup>b</sup> Ce milieu est le même que le milieu E+ Hoagland (tableau 2), sauf que l'on en a omis le sucrose, la bactotryptone, la levure et l'EDTA. Des agents chélateurs tels que l'EDTA sont présents dans le milieu 20X-AAP pour assurer la biodisponibilité des nutriments traces pour les thalles de *Lemna*. Le milieu Hoagland modifié, qui ne renferme pas d'EDTA, devrait donc servir à la préparation de solutions d'essai si l'on présume qu'il y aura interaction entre le chélateur et la substance chimique d'essai.

<sup>c</sup> Concentration de la substance dans le milieu préparé.

<sup>d</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>e</sup> Ajouter chaque produit chimique (A) à de l'eau distillée ou désionisée.

<sup>f</sup> Ajouter 1 mL de la solution mère d'oligo-éléments (solution B).

<sup>g</sup> On devrait rajuster le pH du milieu Hoagland modifié à 4,8–5,2 au moyen de NaOH 0,1 N ou 1 N. Si l'on utilise le milieu 20X-AAP, on devrait rajuster le pH à 7,4–7,6 au moyen de NaOH ou de HCl 0,1 N.

7. **AFNOR (1996)** – Milieu de culture et d'essai pour *Lemna minor*

Substance	Concentration			Élément	Solution mère
	Solution mère (g/L)	Milieu <sup>a</sup> (mg/L)			
		de base <sup>b</sup>	de culture et d'inoculation <sup>c</sup>		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	123,3	4 932	493,2	n.i. <sup>d</sup>	3
KNO <sub>3</sub>	101,1	5 055	505,5	n.i.	2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	118	11 800	1 180,0	n.i.	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	680	68,0	n.i.	4
EDTA ferrique	3,46	34,6	3,46	n.i.	5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,6	28,6	2,86	n.i.	6
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15,5	15,5	1,55	n.i.	6
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,2	2,2	0,22	n.i.	6
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,79	0,79	0,079	n.i.	6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,28	1,28	0,128	n.i.	7
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	2,296	2,296	0,229 6	n.i.	7
CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0,96	0,96	0,096	n.i.	7
NiSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,478 5	0,478 5	0,047 9	n.i.	7
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,493	0,493	0,049 3	n.i.	7
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,179 4	0,179 4	0,017 94	n.i.	7
TiOSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,241 6	0,241 6	0,024 16	n.i.	7
<b>Rajustement</b> du pH	<b>Rajuster</b> le pH des milieux de culture et d'essai à 5,5 ± 0,5 au moyen de NaOH ou de HCl <sup>e</sup> .				
<b>Stérilisation</b>	Passer sur un filtre à ouvertures de 0,22 µm.				

<sup>a</sup> Concentration de la substance dans le milieu préparé.

<sup>b</sup> Milieu nutritif concentré, préparé immédiatement avant **emploi**.

<sup>c</sup> Les milieux de culture et d'essai sont constitués à 10 % de milieu nutritif concentré et à 90 % d'eau distillée ou d'une eau de qualité équivalente.

<sup>d</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>e</sup> On **rajuste** le pH du milieu nutritif concentré à 3,8 ± 0,3 au moyen de HCl et de NaOH.

**8. OCDE (1998) – Milieux de culture et d'essai pour *Lemna minor* (milieu de croissance SIS)**

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère (g/L)	Milieu <sup>a</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	15	75	n.i. <sup>b</sup>	II
NaNO <sub>3</sub>	8,5	85	n.i.	I
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	7,2	36	n.i.	III
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,0	20	n.i.	IV
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,34	13,4	n.i.	I
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	1,0	n.i.	V
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,2	0,2	n.i.	V
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	n.i.	V
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,050	0,050	n.i.	V
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,005	0,005	n.i.	V
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,010	0,010	n.i.	V
Na <sub>2</sub> EDTA	0,28	1,4	n.i.	VI <sup>c</sup>
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,168	0,84	n.i.	VI <sup>c</sup>
MOPS (tampon) <sup>d</sup>	488	488	n.i.	VII <sup>c</sup>

**Rajustement** du pH     **Rajuster** le pH à 6,5 ± 0,2 **au moyen** de NaOH ou **de** HCl.

**Stérilisation**     On stérilise les solutions mères I à V par autoclavage (120 °C, pendant 15 min) ou par filtration sur membrane (à pores de 0,2 µm); on stérilise les solutions mères VI (et, facultativement, VII) uniquement par filtration **sur** membrane (**en d'autres termes, ces solutions ne devraient pas être autoclavées**).

<sup>a</sup> Concentration de la substance dans le milieu préparé.

<sup>b</sup> **n.i.** = Non indiqué.

<sup>c</sup> Ajouter après autoclavage.

<sup>d</sup> Le tampon de MOPS n'est nécessaire que lorsque la **régulation** du pH du milieu d'essai est particulièrement importante (p. ex. lorsque **les essais portent sur** des métaux ou des substances instables du point de vue hydrolytique).

9. **SRC (1997)** – Milieu APHA modifié pour les essais avec *Lemna minor*

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère <sup>a</sup> (g/L)	Milieu <sup>b, c</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	14,7	147	n.i. <sup>d</sup>	C
NaNO <sub>3</sub>	25,5	255	n.i.	A
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4,41	44,1	n.i.	B <sup>e</sup>
<u>KCl</u> <sup>f</sup>	<u>1,01</u>	<u>10,1</u>	<u>n.i.</u>	<u>A</u>
NaHCO <sub>3</sub>	15,0	150	n.i.	A
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,04	10,4	n.i.	A
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,186	1,86	n.i.	C
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,414 9	4,149	n.i.	B
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	12,17	121,7	n.i.	B
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,007 26	0,072 6	n.i.	C
ZnCl <sub>2</sub>	0,003 27	0,032 7	n.i.	C
CuCl <sub>2</sub>	9,0 × 10 <sup>-6</sup>	9,0 × 10 <sup>-5</sup>	n.i.	C
CoCl <sub>2</sub>	0,000 78	0,007 8	n.i.	C
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,16	1,6	n.i.	B

**Rajustement** du pH      **Rajuster** le pH à 8,30 ± 0,05 immédiatement avant l'**essai**.

Stérilisation              Aucune.

<sup>a</sup> Pour préparer le milieu, ajouter 10 mL de chaque solution mère à 970 mL d'eau traitée à l'appareil Milli-Q et aérer vigoureusement pendant au moins 1-2 h.

<sup>b</sup> Les cultures mères de *Lemna* sont maintenues dans un milieu stérile E+ Hoagland (Cowgill et Milazzo, 1989). Les *Lemna* à utiliser pour l'essai sont acclimatées pendant 18-24 h dans le milieu APHA modifié, dans les conditions d'essai.

<sup>c</sup> Concentration de la substance dans le milieu.

<sup>d</sup> **n.i.** = Non indiqué.

<sup>e</sup> Acidifier la solution B jusqu'à ce que son pH descende à 2,0 pour empêcher la précipitation. Protéger la solution de la lumière en la gardant dans une bouteille de couleur **ambre foncé**.

<sup>f</sup> Le texte souligné dénote les modifications apportées au milieu APHA **d'origine (APHA, 1992)**.

## 10. SRC (2003) – Milieu de culture E+ Hoagland modifié pour *Lemna minor*

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère <sup>a</sup> (g/L)	Milieu <sup>b</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50,00	500,0	n.i. <sup>c</sup>	D
KNO <sub>3</sub>	75,76	1 515,2	n.i.	A <sup>d</sup>
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	59,00	1 180,0	n.i.	A
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34,00	680,0	n.i.	A
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	2,86	n.i.	E
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3,62	3,62	n.i.	E
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,12	0,12	n.i.	E
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,22	0,22	n.i.	E
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,08	0,08	n.i.	E
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O <sup>e</sup>	3,35	67,00	n.i.	C <sup>f</sup>
Sucrose	----	1 × 10 <sup>4</sup>	n.i.	-
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,21	24,20	n.i.	C
Extrait de levure	----	100	n.i.	-
Bactotryptone	----	600	n.i.	-
Acide tartrique	3,00	3,00	n.i.	B
Rajustement du pH	Rajuster le pH à 4,6 ± 0,2 au moyen de NaOH ou de HCl.			
Stérilisation	Autoclaver 20 min à 121 °C et sous pression de 124,2 kPa (1,1 kg/cm <sup>2</sup> ).			

<sup>a</sup> Pour préparer 1 L de milieu E+ Hoagland modifié, ajouter 20 mL de la solution A, 1 mL de la solution B, 20 mL de la solution C, 10 mL de la solution D, 1 mL de la solution E, 10 g de sucrose, 0,10 g d'extrait de levure et 0,6 g de bactotryptone à 900 mL d'eau désionisée distillée sous verre (ou l'équivalent). On brasse le milieu jusqu'à dissolution complète de tous les ingrédients. On rajuste le pH, on porte le volume à 1 L et on autoclave le milieu.

<sup>b</sup> Concentration de la substance dans le milieu.

<sup>c</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>d</sup> Ajouter 6 mL de HCl 6 N à la solution mère A.

<sup>e</sup> On peut utiliser le Na<sub>4</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O plutôt que le Na<sub>2</sub>EDTA · 2H<sub>2</sub>O, auquel cas les concentrations dans la solution mère et dans le milieu d'essai sont de 3,75 g/L et de 75 mg/L, respectivement, et il ne faudrait pas ajouter de KOH à la solution C (voir la note suivante).

<sup>f</sup> Ajouter 1,2 mL de KOH 6 N à la solution mère C.



## 11. ISO (2005) – Milieu de culture et d'essai Steinberg modifié pour *Lemna minor*

Substance	Concentration		Élément	Solution mère <sup>c</sup>
	Solution mère <sup>a</sup> (g/L)	Milieu <sup>b</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5,00	100,0	n.i. <sup>d</sup>	2
KNO <sub>3</sub>	17,5	350,0	n.i.	1
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	14,75	295,0	n.i.	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,50	90,0	n.i.	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,63	12,6	n.i.	1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,12	120,00	n.i.	4
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,18	180,00	n.i.	7
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,044	44,00	n.i.	6
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,18	180,00	n.i.	5
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	1,50	1 500,00	n.i.	8
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,76	760,00	n.i.	8
Rajustement du pH	Rajuster le pH à 5,5 ± 0,2 au moyen de NaOH ou de HCl, au besoin.			
Stérilisation	Autoclaver 20 min à 121 °C ou filtrer (pores de 0,2 µm) pour assurer une plus longue durée de conservation.			

<sup>a</sup> Pour préparer 1 L de milieu Steinberg modifié, ajouter 20 mL de chacune des solutions 1, 2 et 3 à environ 30 mL d'eau distillée ou désionisée. Ajouter ensuite 1 mL de chacune des solutions 4, 5, 6, 7 et 8. Le pH devrait être de 5,5 ± 0,2 (le rajuster à cette valeur par l'ajout d'un volume minimal de NaOH ou de HCl). Porter le volume à 1 L au moyen d'eau distillée ou désionisée. Si les solutions mères sont stérilisées et que l'on utilise l'eau qui convient, aucune autre stérilisation n'est nécessaire. Si le milieu final est stérilisé, il faudrait ajouter la solution mère 8 après l'autoclavage (20 min à 121 °C).

<sup>b</sup> Concentration de la substance dans le milieu préparé.

<sup>c</sup> On peut réunir les solutions 2 et 3 ainsi que les solutions 4 à 7 (en tenant compte des concentrations requises). Pour assurer une plus longue durée de conservation, autoclaver les solutions mères pendant 20 min à 121 °C ou procéder à une filtration stérile (pores de 0,2 µm).

<sup>d</sup> n.i. = Non indiqué.

**12. MPO (1979) – Milieu de culture et d'essai M Hillman pour *Lemna minor***

Substance	Concentration		Élément	Solution mère
	Solution mère (g/L)	Milieu <sup>a, b</sup> (mg/L)		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,492	4,92 × 10 <sup>-4</sup>	n.i. <sup>c</sup>	A
KNO <sub>3</sub>	0,100	1,52	n.i.	B
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1,180	1,18	n.i.	C
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,170	0,680	n.i.	D
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,028 6	2,86 × 10 <sup>-3</sup>	n.i.	E
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,036 2	3,62 × 10 <sup>-3</sup>	n.i.	F
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,012	1,2 × 10 <sup>-4</sup>	n.i.	G
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,022	2,2 × 10 <sup>-4</sup>	n.i.	H
Cu(SO <sub>4</sub> ) · 5H <sub>2</sub> O	0,008	8,0 × 10 <sup>-5</sup>	n.i.	I
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,054	5,40 × 10 <sup>-3</sup>	n.i.	J <sup>d</sup>
Acide tartrique	0,003	3,00 × 10 <sup>-3</sup>	n.i.	K
Rajustement du pH	n.i.			
Stérilisation	n.i.			

<sup>a</sup> On prépare le milieu par dilution de solutions mères avec de l'eau distillée. Tous les constituants, sauf le FeCl<sub>3</sub>, sont ajoutés à l'eau distillée avant la stérilisation à l'autoclave.

<sup>b</sup> Concentration de la substance dans le milieu préparé.

<sup>c</sup> n.i. = Non indiqué.

<sup>d</sup> La solution mère de FeCl<sub>3</sub> est autoclavée séparément, et l'on transfère la quantité voulue dans le milieu, après refroidissement.

## Description générale de *Lemna minor*

### Taxinomie et rapports phylogénétiques

*Lemna minor* Linné (Arales : Lemnaceae) est une petite plante macroscopique (macrophyte) vasculaire aquatique, appartenant à la famille des lemnacées. Les membres de cette famille sont les plantes à fleurs les plus petites et à la structure la plus simple du monde entier, aboutissement probable de la réduction d'ancêtres plus complexes (Godfrey et Wooten, 1979). La plupart des chercheurs placent les lemnacées dans l'ordre des spadiciflores (Arales), ce qui les relie aux aracées par la laitue d'eau du genre *Pistia* (Hillman, 1961).

On reconnaît généralement quatre genres de lemnacées : *Spirodela*, *Lemna*, *Wolffiella* et *Wolffia* (Hillman, 1961). Les thalles (ou frondes) de *Spirodela* et de *Lemna* sont plats, de contour plus ou moins ovale, à l'aspect foliacé. *Spirodela* porte au moins deux radicelles filiformes sur chaque thalle, tandis que *Lemna* n'en porte qu'une. Les deux genres ont été groupés dans une tribu (Lemneae) (Hegelmaier - 1895) ou une sous-famille (Lemnoideae) (Lawalrée - 1945) (Hillman, 1961). On a aussi considéré *Spirodela* comme un sous-genre de *Lemna* (Hutchison, 1934, dans Hillman, 1961). *Wolffiella* et *Wolffia* ne possèdent pas de radicelle et ces deux genres ont été groupés dans une tribu (Wolffieae, Hegelmaier) ou une sous-famille (Wolffioideae, Lawalrée) (Hillman, 1961). *Wolffia* prend la forme d'organismes quasi microscopiques qui ressemblent à de la farine, et *Wolffiella*, d'organismes en forme de rubans, simples ou rayonnant à partir d'un point (Fassett, 1957).

La taxinomie des *Lemna* (appelées aussi lentilles d'eau ou lenticules) est compliquée par l'existence d'une large gamme de phénotypes (OCDE, 1998). En 1957, Landolt a signalé l'existence d'au moins deux souches distinctes de *L. minor* aux États-Unis, qui différaient par leur taille et par leur capacité de fleurir en culture (Hillman, 1961). On pourrait facilement confondre *L. perpusilla* et les formes aux feuilles lisses de *L. gibba* avec *L. minor* (v. Mason, 1957, dans Hillman, 1961). *L. gibba* diffère de *L. minor* par ses thalles largement elliptiques à ronds, leur face supérieure souvent parsemée de taches rouges et leur face inférieure généralement bosselée (gibbeuse). *L. perpusilla* peut se distinguer de *L. minor* par ses appendices aliformes à la base de la gaine des radicelles et, parfois, par ses papilles apicales et centrales proéminentes, qui manquent chez *L. minor* (Hillman, 1961; Godfrey et Wooten, 1979). L'absence de turions (plantes filles vert foncé ou brunâtres) hivernants, de papules dorsales proéminentes et de tachetures d'anthocyanine rougeâtre sur la face ventrale sépare *L. minor* d'une autre espèce très apparentée, *L. turionifera* Landolt. On peut trouver des descriptions taxinomiques et des photographies de nombreuses espèces de lemnacées sur le site Internet consacré à la clé des lemnacées de l'ouest de l'Amérique du Nord, de Wayne P. Armstrong (collège Palomar, Université d'État de l'Oregon) (<http://waynesword.palomar.edu/1wayindx.htm>).

### Description de l'espèce

*L. minor* est une petite plante coloniale possédant un seul thalle plat, arrondi à elliptique-obové, à l'aspect de feuille (tige discoïde). Chaque plante mesure de 2 à 4 mm de longueur et comprend un seul thalle ou, dans le cas d'une colonie, plusieurs thalles (3 à 5) (Hillman, 1961; ITM, 1990). Le thalle est une structure complexe représentant à la fois la feuille et la tige (Hillman, 1961), son extrémité distale étant foliaire et son extrémité proximale étant axiale (Arber, 1963). Le thalle est constitué en grande partie de cellules chlorenchymateuses, séparées par d'importantes lacunes, remplies d'air ou d'autres gaz, qui le font flotter (Hillman, 1961).

Les thalles de *L. minor* sont obscurément trinervés, et leur face dorsale lisse est convexe ou quelque peu aplatie. La face dorsale possède une petite papille centrale, qui n'est cependant pas proéminente (Hillman, 1961; Britton et Brown, 1970). Habituellement, elle est traversée par une ligne médiane de papilles plus petites, jusque près de la pointe (Godfrey et Wooten, 1979). La face inférieure du thalle est convexe (rarement concave, comme lorsque la lumière ou les nutriments sont insuffisants pendant la croissance) (Godfrey et Wooten, 1979). Quand les thalles sont frais, ils sont lustrés et verts à vert lime (Godfrey et Wooten, 1979).

La plante possède une seule racine ou radicelle qui prend naissance dans une gaine profonde située au centre de la face inférieure de chaque thalle (Hillman, 1961). La radicelle prend naissance au nœud qui se trouve juste sous l'épiderme inférieur; d'un diamètre habituellement inférieur à 0,5 mm, elle est dépourvue de tissus vasculaires et dotée d'une coiffe obtuse ou subtronquée (Hillman, 1961; Britton et Brown, 1970). Comme toute la face inférieure des thalles peut absorber les nutriments du milieu et que les plantes peuvent croître sans entrave dans des conditions qui empêchent totalement l'allongement des radicelles, on connaît mal l'importance fonctionnelle de ces dernières (Hillman, 1961). Des auteurs (V. Arber, 1920, dans Hillman, 1966) ont avancé qu'elles servent principalement d'organe d'ancrage pour empêcher les thalles de chavirer et pour former les enchevêtrements qui favorisent la dispersion et la protection contre les mouvements de l'eau (Hillman, 1961).

### **Répartition et écologie**

Cosmopolite, *L. minor* est présente presque partout dans le monde (Godfrey et Wooten, 1979). Elle est largement répandue dans toute l'Amérique du Nord, sauf dans l'extrême nord et dans les Bahamas. On la trouve aussi en Europe, en Asie, en Afrique et en Australie (Britton et Brown, 1970). En Amérique du Nord, on la trouve de Terre-Neuve à l'Alaska et au sud jusqu'en Californie, au Texas et en Floride (Newmaster et coll., 1997). Au Canada, sa répartition vers le nord atteint le Grand lac des Esclaves, dans les Territoires du Nord-Ouest; le lac Athabasca, en Alberta et en Saskatchewan; Churchill, au Manitoba; la baie James, en Ontario; la Côte-Nord et l'île d'Anticosti, au Québec; Terre-Neuve, le Nouveau-Brunswick, l'Île-du-Prince-Édouard et la Nouvelle-Écosse (Scoggan, 1978).

La lenticule mineure croît dans les milieux stagnants des zones tropicale à tempérée, des eaux douces aux estuaires saumâtres et dans une large gamme de conditions trophiques (Hillman et Culley, 1978). On peut la trouver dans l'eau calme ou faiblement courante des étangs d'eau douce, des marais, des lacs et des cours d'eau tranquilles. On peut observer sa floraison dans les marais, les tourbières oligotrophes, les petits étangs et les fossés aux eaux stagnantes, riches en nutriments et en matière organique. On la trouve souvent près des sorties d'égout (ITM, 1990).

Les lenticules forment un élément essentiel de l'écosystème des eaux stagnantes et peu profondes. Elles font partie intégrante de la chaîne alimentaire, fournissant de la nourriture à la sauvagine et aux oiseaux des marais tels que les foulques, les canards noirs, les canards colverts, les sarcelles, les canards branchus, les petits garrots et les râles. Les petits mammifères, notamment le rat musqué et le castor, s'en nourrissent parfois. Ces plantes fournissent aussi de la nourriture, un abri, de l'ombrage et un substrat aux poissons et aux invertébrés aquatiques (Jenner et Janssen-Mommen, 1989; Taraldsen et Norberg-King, 1990; APHA et coll., 1992; Newmaster et coll., 1997). Dans les conditions favorables à la croissance, elles peuvent se multiplier rapidement et former un tapis dense, constitué de divers genres et espèces (Riemer, 1993), dominé par une seule espèce (Wang, 1987; ASTM, 1991).

### **Biologie de la reproduction**

Les *Lemna* sont des organismes à croissance rapide, qui se reproduisent rapidement aussi, comparativement aux autres plantes vasculaires à fleurs (Hillman, 1961; APHA et coll., 1992). La reproduction de *L. minor* est habituellement végétative (c.-à-d. asexuée). Les nouveaux thalles, ou thalles « filles », se forment à partir de deux poches situées de chaque côté de l'extrémité la plus étroite d'un thalle préexistant, le thalle « mère », très près du point où prend naissance la radicelle (Hillman, 1961). Cette extrémité du thalle est habituellement dite « basale » ou « proximale », car chez le thalle fille fixé au thalle mère, elle constitue le point le plus rapproché du thalle mère. L'extrémité large du thalle est dite « distale » (Hillman, 1961). Chaque thalle fille engendre à son tour un thalle, habituellement quand il est encore fixé au thalle mère. Les groupes de thalles fixés les uns aux autres forment des colonies (Hillman, 1961). Chez les *Lemna*, les thalles filles se forment à tour de rôle de chaque côté du thalle mère, leur développement se faisant plus rapidement dans une poche que dans l'autre. Les clones de la même espèce diffèrent par le côté où se formera le premier thalle fille, ce côté restant normalement constant dans le clone (Hillman, 1961).

Chez *L. minor*, la floraison (c.-à-d. la reproduction sexuée) est rare et ne survient que lorsque les conditions du milieu changent. On l'a associée à la photopériode et à des températures élevées (Landolt, 1957, dans Hillman, 1961). D'après les connaissances actuelles, le thalle ne produit qu'une seule fleur durant son existence. La fleur prend naissance dans la partie du méristème, ou à proximité, qui donne naissance aux thalles filles (Hillman, 1961). Chaque fleur consiste en un seul pistil ampoulé (qui mûrit le premier) et d'une ou deux étamines (qui mûrissent successivement) (Hillman, 1961; Newmaster et coll., 1997). Au cours de leur développement, ces organes sont entourés d'une spathe membraneuse, ouverte à son sommet, comme un sac (Hillman, 1961).

Le fruit est symétrique, ovoïde ou ellipsoïde, dépourvu d'ailes, et la graine est dotée de 12 à 15 nervures profondes et inégales, ainsi que d'un hile proéminent (Britton et Brown, 1970; Godfrey et Wooten, 1979).

**Annexe F****Techniques de culture axénique des *Lemna* (Acreman, 2006)**

Diverses espèces de *Lemna* (lenticules) — des macrophytes vasculaires aquatiques de la famille des Lemnaceae — peuvent être cultivées dans des conditions axéniques en milieu liquide ou sur gélose nutritive à l'aide de méthodes semblables à celles utilisées pour la culture de tissus végétaux. Les cultures axéniques sont exemptes de contaminants et, littéralement, d'« espèces vivantes étrangères ». Deux éléments sont essentiels à la culture axénique des *Lemna* : de bonnes techniques stériles et l'utilisation d'une hotte à flux laminaire. Il est aussi indispensable de surveiller les cultures de près et de vérifier régulièrement si elles sont contaminées. *Une règle de base à appliquer à l'égard de toute culture axénique consiste à traiter la zone de manipulation des cultures de la même façon qu'un bloc opératoire.* Une culture axénique est précieuse; si elle devient contaminée, il n'est pas toujours facile de l'assainir. Il faut toujours prévoir de nombreuses cultures filles pour s'assurer qu'au moins une culture reste stérile. Les conseils fournis ici devraient contribuer à réduire la contamination éventuelle des cultures.

***Maintien de la propreté du laboratoire***

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

***Hotte à flux laminaire : fonctionnement et entretien***

Il est très important d'utiliser une hotte à flux laminaire pour le maintien des cultures axéniques, et de bonnes procédures d'entretien sont essentielles au rendement de la hotte. Si l'on manipule les cultures axéniques en l'absence d'une hotte à flux laminaire, on expose celles-ci à une contamination à long terme. On peut se procurer des hottes peu coûteuses, dont le prix varie entre 1 000 \$ et 3 000 \$, auprès de Enviro Corporation, 1185 Mt. Aetna Road, Hagerstown, MD 21740, États-Unis (tél. : 1-800-645-1610).

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



7 ans. Il convient de vérifier régulièrement le filtre pour détecter toute fissure ou tout dommage attribuable à des instruments coupants. Un professionnel d'une entreprise spécialisée dans les filtres (p. ex. H.E.P.A. Filter Services Inc.; tél. : 1-800-669-0037) devrait vérifier chaque année la vitesse d'écoulement laminaire afin de repérer toute zone obstruée ou endommagée.

S'il n'existe pas de service d'évaluation ou si votre budget ne vous permet pas d'assumer les coûts d'un tel service, vous pouvez vérifier l'efficacité de la hotte à l'aide de plaques à la gélose pour essais de stérilité (v. la rubrique « Essai de stérilité des *Lemna* » ci-dessous). Il est indiqué de vérifier périodiquement l'efficacité de la hotte au moyen de cette méthode entre les visites du spécialiste des filtres. Répartir les plaques au centre de la table de travail et les laisser ouvertes pendant au moins 24 h, avec la hotte en marche. Noter l'emplacement de chaque plaque numérotée. Fermer les plaques, les sceller à l'aide de deux feuilles de Parafilm et les laisser dans un endroit chaud et sombre pendant au moins 5 jours afin de surveiller la croissance bactérienne ou fongique. Si ce test montre que certaines parties du filtre HEPA sont défectueuses, il est possible de réparer le filtre en injectant un produit d'étanchéité à base de silicone, à la condition que les zones endommagées soient peu étendues. Les réparations étendues entraîneront une certaine turbulence de l'air dans la zone de travail. Idéalement, on devrait confier les réparations à une entreprise spécialisée dans l'équipement doté de filtres HEPA.

En théorie, les hottes à flux laminaire devraient être laissées en marche en permanence. Si cela n'est pas possible, il convient d'installer une lampe ultraviolette germicide afin de stériliser toutes les surfaces. Le ventilateur soufflant de la hotte devrait être mis en marche au moins 30 min avant l'utilisation afin de s'assurer que l'air présent dans la hotte est stérile.

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

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

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

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

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

### ***Stérilisation des anses et autres instruments***

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

### ***Nettoyage des mains***

Avant de procéder à une manipulation ou à un repiquage, enlevez vos bagues et lavez vos mains à fond avec un savon antibactérien, puis avec un nettoyant (p. ex. One-Step, Endure ou éthanol dilué à 70 %). Portez une attention particulière aux parties de vos mains qui peuvent entrer en contact avec les récipients de culture ou les anses de transfert. Des gants d'examen (p. ex. Nitrile) peuvent être utilisés; dans ce cas, il faut les vaporiser d'éthanol avant de manipuler les cultures.

### ***Préparation et stérilisation des milieux d'essai***

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

Pour savoir si la température voulue a été atteinte, on devrait apposer, sur l'extérieur des récipients contenant le milieu d'essai et sur les emballages du matériel à stériliser, une bandelette indicatrice thermosensible qui change de couleur. De telles bandelettes NE SONT PAS une garantie de stérilité – elles indiquent seulement qu'une procédure de stérilisation a été appliquée. Il est impératif de vérifier que les volumes importants de milieu d'essai ou que les charges élevées placés dans l'autoclave ont atteint la température de stérilisation voulue. On peut se servir de bioindicateurs vendus sur le marché dans des ampoules scellées (p. ex. Raven Biological Laboratories), ou encore d'intégrateurs chimiques à bande de couleur (p. ex. STEAMplus Steam Sterilization Integrator, de SPS Medical). Il existe une autre méthode de rechange simple : on place un petit morceau de ruban à autoclave dans une pipette Pasteur,

on scelle la pointe de celle-ci à la chaleur et on bouche l'autre extrémité à l'aide d'un tampon ouaté. Après avoir attaché une ficelle à la pipette, on abaisse celle-ci dans le milieu, en maintenant l'extrémité dotée du tampon ouaté à 10–15 cm au-dessus de la surface du liquide. On fixe au moyen d'une bande adhésive l'autre extrémité de la ficelle sur l'extérieur du flacon, ce qui permet de retirer facilement l'indicateur. On récupère l'indicateur une fois l'opération terminée et l'on confirme que sa couleur a changé également. Cette dernière méthode n'est pas aussi fiable que celle faisant appel à des bioindicateurs ou à des intégrateurs chimiques à bande de couleur.

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

On ne devrait pas remplir à plus des deux tiers de leur capacité les bouteilles et les tubes renfermant le milieu d'essai, et ce, pour éviter tout débordement causé par l'ébullition. Si l'on utilise des bouteilles munies d'un bouchon à vis, il faut laisser celui-ci légèrement dévissé. Les flacons peuvent être bouchés de manière lâche à l'aide d'une bonde faite de ouate non absorbante recouverte d'étamine et d'une « jupe » carrée faite de Bio-Shield Wrap (VWR 59100-234) ou d'une feuille d'aluminium. Après autoclavage, la soupape de sûreté de l'autoclave ne devrait pas être ouverte tant que la température n'a pas baissé à moins de 80 °C. Du fait que le pH du milieu s'élève pendant l'autoclavage, attendre au moins une journée avant d'utiliser le milieu pour que le pH se stabilise à la valeur établie avant la stérilisation.

Le procédé d'autoclavage peut avoir des effets néfastes sur le milieu, étant donné que des composants de ce dernier peuvent se désagréger après une exposition prolongée à la chaleur. À l'occasion, il peut y avoir précipitation du phosphate (blanc) et du fer (jaune). Pour contourner ce problème, on peut stériliser séparément les solutions de fer et de phosphate, puis les ajouter en aseptie après l'autoclavage. On peut aussi avoir recours à la stérilisation sur filtre (pores de 0,22 µm ou moins).

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

### **Techniques de transfert**

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

- Tous les récipients de culture, outils de transfert, pipettes avec tampon ouaté et milieux doivent être stérilisés et prêts à l'emploi. Les milieux de culture devraient être maintenus à la température ambiante.

- Les anses devraient d'abord être trempées dans l'éthanol dilué à 95 % avant d'être stérilisées au moyen d'un stérilisateur à flamme ou électrique pendant 15 secondes, soit jusqu'à ce qu'elles soient chauffées au rouge. Les refroidir par contact avec la gélose ou un liquide stériles avant de les utiliser pour prélever les plantes. La flamme d'un brûleur à gaz stérilise efficacement les petits objets en verre ou en métal, comme les anses d'inoculation, mais il faut éviter de « roussir » les plantes en les mettant en contact avec les objets chauffés à la flamme.
- Dégager la hotte à flux laminaire pour que rien n'entrave l'air circulant entre le filtre HEPA et la zone de repiquage. Rien ne doit venir en contact avec le filtre HEPA.
- Nettoyer à fond la table de travail sous la hotte immédiatement avant chaque utilisation, tout en prenant soin de ne pas vaporiser de solution sur le filtre HEPA.
- Se laver les mains à fond ou enfiler des gants (voir ci-dessus) immédiatement avant de procéder au repiquage.
- Passer à la flamme toutes les ouvertures des récipients de culture en verre pendant 15 secondes avant et après le transfert de nouvelles cultures dans ces récipients.
- Pour réduire au minimum la contamination, toujours procéder aux transferts à au moins 6 po (15 cm) à l'intérieur du devant de la hotte afin de s'assurer que l'air de la pièce ne contamine pas la zone de travail. Dans la mesure du possible, exécuter l'opération à la hauteur des yeux.
- Ne rien toucher qui viendra en contact avec la culture; s'il y a contact, procéder à une nouvelle stérilisation avant de continuer.
- Pour les repiquages dans des tubes munis de bouchons à vis, dévisser légèrement ces derniers avant de prélever les plantes à transférer afin d'empêcher celles-ci de tomber de l'anse pendant l'ouverture de tubes dont le bouchon est vissé très serré.
- Éviter de parler, de chanter, de siffler, de tousser ou d'éternuer dans la direction des objets qui devraient être stériles. Les cheveux longs, s'ils ne sont pas attachés, peuvent être une source de contamination.
- Travailler rapidement afin de réduire au minimum le temps pendant lequel les récipients de culture sont ouverts.
- Dans la mesure du possible, ne pas toucher les extrémités des couvercles des boîtes de Petri. Tenir les couvercles par le dessus.
- Sceller toutes les boîtes de Petri à l'aide de deux feuilles de Parafilm ou de Duraseal. Examiner soigneusement les boîtes pour détecter toute fissure. (L'odeur du milieu de culture attire les acariens détriticoles, et ceux-ci peuvent ramper jusque dans les plaques stériles.)
- Tous les 2–3 jours, vérifier que les plaques ne sont pas contaminées.
- Pour de meilleurs résultats, transférer les cultures toutes les 2–3 semaines.

### **Essai de stérilité des Lemna**

Des contaminants comme les bactéries et les champignons microscopiques sont facilement visibles lorsque les *Lemna* sont cultivées dans un milieu enrichi de composants organiques (p. ex. le milieu E+ Hoagland). Si les plantes ne sont pas cultivées de façon courante dans un tel milieu, on devrait vérifier périodiquement qu'elles sont stériles en prélevant quelques sujets et en les plaçant dans un milieu E+ Hoagland renfermant 1 % de sucrose, 0,6 % de bactotryptone (ou de peptone) et 0,1 % d'extrait de levure. Cet essai peut se faire dans une culture liquide ou sur des plaques à la gélose. La contamination fongique ou bactérienne apparaît habituellement en quelques jours dans les solutions ou sur les plaques à la gélose. Si les solutions deviennent troubles ou que des colonies de bactéries ou de champignons croissent sur les plaques, on peut toujours avoir recours à la technique de décontamination décrite ci-dessus ou se procurer une nouvelle *culture axénique* d'une source extérieure.

### **Décontamination des Lemna**

Si les *Lemna* sont contaminées, on peut les stériliser de nouveau, mais il faut pour cela du temps et de la patience. Ainsi, les plantes formant des grappes clonales devraient être séparées les unes des autres. Chaque plante devrait être trempée dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (solution de blanchiment Clorox<sup>MC</sup> ou Purex<sup>MC</sup> à 10 %) pendant au moins 1 min. Traiter les plantes pendant un laps de temps variable afin de s'assurer que l'on dispose d'au moins une culture vivante stérile. Il faut veiller à rincer les plantes avec plusieurs nouveaux milieux stériles ou de l'eau stérile avant de les transférer dans un milieu de croissance dilué (p. ex. un milieu Hoagland modifié renfermant 1 % de sucre). Examiner les plantes après leur rinçage avec un milieu frais. Les plantes stérilisées adéquatement présenteront une petite partie verte dans la zone de bourgeonnement, le long du centre du thalle. S'il ne reste aucun bourgeon vert, le traitement a été trop long et la plante est morte. Étant donné qu'il ne reste qu'un petit bourgeon de croissance après la stérilisation de la surface, il peut s'écouler un certain temps avant que l'on dispose de suffisamment de matériel végétal pour les expériences.

D'après Landolt (1987), environ 1–10 % des plantes survivent habituellement à ce traitement et deviennent axéniques. Les plantes qui ont survécu (et qui ne sont pas contaminées ou infectées par une moisissure fongique ou des bactéries) peuvent être transférées dans un milieu enrichi, notamment un milieu E+ Hogland sous forme liquide ou sous forme solidifiée avec de la gélose Difaco-Bacto (1,25 %) dans des boîtes de Petri ou des tubes.

### **Conservation à long terme des Lemna grâce à la cryoconservation**

La cryoconservation est une technique permettant d'entreposer indéfiniment des cellules vivantes à des températures ultrabasses. Des souches utiles de *Lemna* peuvent être conservées à de telles températures dans la phase liquide ou gazeuse de l'azote liquide afin de préserver leurs caractéristiques génétiques et de maintenir des cultures à long terme sans avoir à procéder à des repiquages (Day, 1995; Kartha, 1985).

Les techniques employées doivent réduire au minimum la formation de cristaux de glace intracellulaire, qui endommagent les membranes et les parois cellulaires. Les procédures de base de la cryoconservation supposent l'élimination de l'eau libre par des agents osmotiques, puis l'ajout de cryoprotecteurs, comme le sucre ou le glycérol. On entrepose les cultures dans des cryovials, après quoi on les refroidit lentement jusqu'à -80 °C afin de réduire au minimum la formation de cristaux de glace avant de les immerger directement dans de l'azote liquide à -196 °C. On régénère les cultures en les décongelant rapidement dans un bain d'eau à 45 °C, puis on les repique dans un milieu frais.

Pour de plus amples renseignements, prière de consulter les sites Web suivants :

Armstrong, Wayne. Treatment of the Lemnaceae. Palomar University  
<http://waynesword.palomar.edu/1wayindx.htm>

Cross, John. The Charms of Duckweed.  
<http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/duckweed-charms.htm>

McCauley, D. Aseptic technique. GlobalRPh Inc.  
<http://www.globalrph.com/aseptic.htm>

**ANNEXE 1****Solutions pour la désinfection des surfaces de travail****Solution d'hypochlorite de sodium à 1 % (0,5 L)**

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

**Solution chlorée à partir d'une poudre**

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

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

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



## Annexe G

## Séries logarithmiques de concentrations convenant aux essais toxicologiques<sup>a</sup>

Colonne (nombre de concentrations entre 100 et 10 ou entre 10 et 1)<sup>b</sup>

1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,00	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

<sup>a</sup> Modifié d'après Rocchini et coll. (1982).

<sup>b</sup> Dans une colonne, on devrait choisir une série d'au moins sept concentrations successives. Les points médians entre les concentrations de la colonne (x) se trouvent dans la colonne (2x + 1). Les valeurs énumérées peuvent représenter des concentrations exprimées en masse par unité de masse (p. ex. mg/kg) ou en masse par unité de volume (p. ex. mg/L). Au besoin, on peut les multiplier ou les diviser par n'importe quelle puissance de 10. On pourrait utiliser la première colonne si le degré de toxicité est entaché de beaucoup d'incertitude. Il n'est pas recommandé d'utiliser des concentrations plus largement espacées. Pour les essais sur les effluents, on augmente rarement le gain de précision en choisissant les concentrations d'une colonne à droite de la colonne 3. Les valeurs plus rapprochées des colonnes 4 à 7 pourraient parfois être utiles pour les essais de produits chimiques dont le seuil d'effet est abrupt.

## Annexe H

## Méthodes d'essai biologique et documents d'orientation publiés par la Section de l'élaboration et de l'application des méthodes d'Environnement Canada<sup>a</sup>

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
<b>A. Méthodes d'essai biologique universelles</b>			
Essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/9	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines ( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )	SPE 1/RM/10	Juillet 1990	Mars 2000
Essai de létalité aiguë sur <i>Daphnia</i> spp.	SPE 1/RM/11	Juillet 1990	Mai 1996
Essai de reproduction et de survie du cladocère <i>Ceriodaphnia dubia</i>	SPE 1/RM/21 2 <sup>e</sup> édition	Février 2007	—
Essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule	SPE 1/RM/22	Février 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur la bactérie luminescente <i>Photobacterium phosphoreum</i>	SPE 1/RM/24	Novembre 1992	—
Essai d'inhibition de la croissance d'une algue d'eau douce	SPE 1/RM/25 2 <sup>e</sup> édition	Mars 2007	—
Essai de toxicité aiguë de sédiments chez des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/26	Décembre 1992	Octobre 1998
Essai sur la fécondation chez les échinides (oursins verts et oursins plats)	SPE 1/RM/27	Décembre 1992	Novembre 1997
Essai de toxicité sur des salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique)	SPE 1/RM/28 1 <sup>re</sup> édition	Décembre 1992	Janvier 1995
Essai de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique	SPE 1/RM/28 2 <sup>e</sup> édition	Juillet 1998	—

<sup>a</sup> Ces documents sont vendus à l'adresse suivante : Publications de la Protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada. Pour en commander des copies papier, prière d'envoyer un courriel à [epspubs@ec.gc.ca](mailto:epspubs@ec.gc.ca). Il est également possible de les télécharger gratuitement en format PDF à partir de l'adresse suivante : [http://www.etc-ete.ec.gc.ca/organization/bmd/bmd\\_publist\\_f.html](http://www.etc-ete.ec.gc.ca/organization/bmd/bmd_publist_f.html). Pour obtenir de plus amples renseignements ou pour formuler des commentaires, prière de communiquer avec le chef de la Division des méthodes biologiques, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa (Ont.) K1A 0H3, Canada.

Titre de la méthode d'essai ou du document d'orientation	Numéro du rapport	Date de publication	Modifications applicables
<b>A. Méthodes d'essai biologique universelles (suite)</b>			
Essai de survie et de croissance des larves dulcicoles de chironomes ( <i>Chironomus tentans</i> ou <i>Chironomus riparius</i> ) dans les sédiments	SPE 1/RM/32	Décembre 1997	—
Essai de survie et de croissance de l'amphipode dulcicole <i>Hyaella azteca</i> dans les sédiments	SPE 1/RM/33	Décembre 1997	—
Essai de mesure de l'inhibition de la croissance de la plante macroscopique dulcicole <i>Lemna minor</i>	SPE 1/RM/37 2 <sup>e</sup> édition	Janvier 2007	—
Essai de survie et de croissance des vers polychètes spionides ( <i>Polydora cornuta</i> ) dans les sédiments	SPE 1/RM/41	Décembre 2001	—
Essais pour déterminer la toxicité de sols contaminés pour les vers de terre <i>Eisenia andrei</i> , <i>Eisenia fetida</i> ou <i>Lumbricus terrestris</i>	SPE 1/RM/43	Juin 2004	—
Essai de mesure de la levée et de la croissance de plantes terrestres exposées à des contaminants dans le sol	SPE 1/RM/45	Février 2005	—
Essai de mesure de la survie et de la reproduction de collemboles exposés à des contaminants dans le sol (titre provisoire)	SPE 1/RM/47	2006	—
<b>B. Méthodes de référence<sup>b</sup></b>			
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 1 <sup>re</sup> édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez la truite arc-en-ciel	SPE 1/RM/13 2 <sup>e</sup> édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 1 <sup>re</sup> édition	Juillet 1990	Mai 1996, décembre 2000
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'effluents chez <i>Daphnia magna</i>	SPE 1/RM/14 2 <sup>e</sup> édition	Décembre 2000	—
Méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë d'un sédiment pour des amphipodes marins ou estuariens	SPE 1/RM/35	Décembre 1998	—
Méthode de référence servant à déterminer la toxicité des sédiments à l'aide d'une bactérie luminescente dans un essai en phase solide	SPE 1/RM/42	Avril 2002	—

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

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