

# Canada Gazette



# Gazette du Canada

## Part I

## Partie I

OTTAWA, SATURDAY, MARCH 11, 2006

OTTAWA, LE SAMEDI 11 MARS 2006

### NOTICE TO READERS

The *Canada Gazette* is published under authority of the *Statutory Instruments Act*. It consists of three parts as described below:

- Part I Material required by federal statute or regulation to be published in the *Canada Gazette* other than items identified for Parts II and III below — Published every Saturday
- Part II Statutory Instruments (Regulations) and other classes of statutory instruments and documents — Published January 11, 2006, and at least every second Wednesday thereafter
- Part III Public Acts of Parliament and their enactment proclamations — Published as soon as is reasonably practicable after Royal Assent

The *Canada Gazette* is available in most public libraries for consultation.

To subscribe to, or obtain copies of, the *Canada Gazette*, contact bookstores selling Government publications as listed in the telephone directory or write to Government of Canada Publications, Public Works and Government Services Canada, Ottawa, Canada K1A 0S5.

The *Canada Gazette* is also available free of charge on the Internet at <http://canadagazette.gc.ca>. It is accessible in Portable Document Format (PDF) and in HyperText Mark-up Language (HTML) as the alternate format. The on-line PDF format of Parts I, II and III is official since April 1, 2003, and is published simultaneously with the printed copy.

### AVIS AU LECTEUR

La *Gazette du Canada* est publiée conformément aux dispositions de la *Loi sur les textes réglementaires*. Elle est composée des trois parties suivantes :

- Partie I Textes devant être publiés dans la *Gazette du Canada* conformément aux exigences d'une loi fédérale ou d'un règlement fédéral et qui ne satisfait pas aux critères des Parties II et III — Publiée le samedi
- Partie II Textes réglementaires (Règlements) et autres catégories de textes réglementaires et de documents — Publiée le 11 janvier 2006 et au moins tous les deux mercredis par la suite
- Partie III Lois d'intérêt public du Parlement et les proclamations énonçant leur entrée en vigueur — Publiée aussitôt que possible après la sanction royale

On peut consulter la *Gazette du Canada* dans la plupart des bibliothèques publiques.

On peut s'abonner à la *Gazette du Canada* ou en obtenir des exemplaires en s'adressant aux agents libraires associés énumérés dans l'annuaire téléphonique ou en s'adressant à : Publications du gouvernement du Canada, Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, Ottawa, Canada K1A 0S5.

La *Gazette du Canada* est aussi offerte gratuitement sur Internet au <http://gazetteducanada.gc.ca>. La publication y est accessible en format de document portable (PDF) et en langage hypertexte (HTML) comme média substitut. Le format PDF en direct des Parties I, II et III est officiel depuis le 1<sup>er</sup> avril 2003 et est publié en même temps que la copie imprimée.

<i>Canada Gazette</i>	<i>Part I</i>	<i>Part II</i>	<i>Part III</i>
Yearly subscription			
Canada	\$135.00	\$67.50	\$28.50
Outside Canada	US\$135.00	US\$67.50	US\$28.50
Per copy			
Canada	\$2.95	\$3.50	\$4.50
Outside Canada	US\$2.95	US\$3.50	US\$4.50

<i>Gazette du Canada</i>	<i>Partie I</i>	<i>Partie II</i>	<i>Partie III</i>
Abonnement annuel			
Canada	135,00 \$	67,50 \$	28,50 \$
Extérieur du Canada	135,00 \$US	67,50 \$US	28,50 \$US
Exemplaire			
Canada	2,95 \$	3,50 \$	4,50 \$
Extérieur du Canada	2,95 \$US	3,50 \$US	4,50 \$US

## REQUESTS FOR INSERTION

Requests for insertion should be directed to the Canada Gazette Directorate, Public Works and Government Services Canada, 350 Albert Street, 5th Floor, Ottawa, Ontario K1A 0S5, (613) 996-2495 (telephone), (613) 991-3540 (fax).

Bilingual texts received as late as six working days before the desired Saturday's date of publication will, if time and other resources permit, be scheduled for publication that date.

Each client will receive a free copy of the *Canada Gazette* for every week during which a notice is published.

## DEMANDES D'INSERTION

Les demandes d'insertion doivent être envoyées à la Direction de la Gazette du Canada, Travaux publics et Services gouvernementaux Canada, 350, rue Albert, 5<sup>e</sup> étage, Ottawa (Ontario) K1A 0S5, (613) 996-2495 (téléphone), (613) 991-3540 (télécopieur).

Un texte bilingue reçu au plus tard six jours ouvrables avant la date de parution demandée paraîtra, le temps et autres ressources le permettant, le samedi visé.

Pour chaque semaine de parution d'un avis, le client recevra un exemplaire gratuit de la *Gazette du Canada*.

**DEPARTMENT OF THE ENVIRONMENT**

## CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT, 1999

*Notice, under subsection 109(5) of the Canadian Environmental Protection Act, 1999, of the Ministerial Conditions*

Whereas the Ministers of Health and of the Environment have assessed information pertaining to the living organism Fungus *Fusarium* species strain CK 46-8;

And whereas the Ministers suspect that the substance is toxic;

The Minister of the Environment hereby makes, under paragraph 109(1)(a) of the *Canadian Environmental Protection Act, 1999*, Ministerial Condition No. 13965 in accordance with the annexed text.

STÉPHANE DION  
*Minister of the Environment*

## CONDITIONS

(Section 109 of the *Canadian Environmental Protection Act, 1999*)

The Notifier may import or manufacture Fungus *Fusarium* species strain CK 46-8, hereafter the living organism, only in circumstances where the Notifier complies with the following terms:

*Use Restriction*

1. (1) The Notifier shall import the living organism to, or manufacture the living organism within, a contained facility only for the production and export of metabolites to be used as the starting material for the production of veterinary drugs.

1. (2) For the purposes of subitem 1(1) the term “contained facility” means the term as defined in subsection 1(1) of the *New Substances Notification Regulations (Organisms)*.

*No Release Into the Environment*

2. The living organism, including all vegetative cells and spores, must not be released into the environment.

*Waste Handling, Decontamination and Disposal Requirements*

3. (1) Aerosols and all gaseous wastes resulting from the manufacture of the living organism must be filtered through 0.2 micron filters.

**MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT**

## LOI CANADIENNE SUR LA PROTECTION DE L'ENVIRONNEMENT (1999)

*Avis, en vertu du paragraphe 109(5) de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999), des conditions ministérielles*

Attendu que le ministre de la Santé et le ministre de l'Environnement ont évalué les renseignements portant sur l'organisme vivant du champignon de l'espèce *Fusarium* de souche CK 46-8, dont ils disposent;

Attendu que les ministres soupçonnent que la substance est toxique;

Par les présentes, le ministre de l'Environnement impose, en vertu de l'alinéa 109(1)a) de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)*, la Condition ministérielle n° 13965 ci-après.

*Le ministre de l'Environnement*  
STÉPHANE DION

## CONDITIONS

(Article 109 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)*)

Le déclarant ne peut importer ou fabriquer le champignon de l'espèce *Fusarium* de souche CK 46-8, ci-après l'organisme vivant, que s'il respecte les conditions suivantes :

*Restriction concernant l'utilisation*

1. (1) Le déclarant doit importer l'organisme vivant ou le fabriquer dans une installation étanche, uniquement pour la fabrication et l'exportation de métabolites utilisés comme matière première dans la fabrication de médicaments à usage vétérinaire.

1. (2) Pour l'application du paragraphe 1(1), le terme « installation étanche » est défini dans le paragraphe 1(1) du *Règlement sur les renseignements concernant les substances nouvelles (organismes)*.

*Interdiction de rejet dans l'environnement*

2. Il ne doit pas y avoir de rejet dans l'environnement de l'organisme vivant, y compris de toute cellule végétative et de toute spore.

*Exigences en matière de décontamination, d'élimination et de manipulation des déchets*

3. (1) Les aérosols et tous les déchets gazeux résultant de la fabrication de l'organisme vivant doivent être filtrés à l'aide de filtres de 0,2 microns.

3. (2) Subject to subitem 3(4), all liquid and solid wastes resulting from the manufacture of the living organism, including the 0.2 micron filters referenced in subitem 3(1), or resulting from the decontamination of containers that held the living organism or its metabolites as set out in subitem 3(5), must be

(a) disinfected as detailed in subitem 3(3) prior to transport off-site for disposal, the latter as set out in item 4; and

(b) incinerated at a temperature of no less than 900°C by a facility authorized by the laws of the jurisdiction where the incineration will take place.

3. (3) Liquid and solid wastes requiring disinfection as set out in paragraph 3(2)(a) must be disinfected as follows:

(a) filters referenced in subitem 3(2) must be steam sterilized;

(b) solid wastes, not including the filters referenced in paragraph 3(3)(a) must be sterilized with sodium hypochlorite or steam; and

(c) liquid wastes must be sterilized at a temperature of at least 60°C for a minimum of 1 hour.

3. (4) All liquid wastes, not disinfected and incinerated as stated in subitem 3(2), resulting from the manufacture of the living organism or resulting from the decontamination of containers that held the living organism or its metabolites as set out in subitem 3(5) must be

(a) prior to transport offsite for disposal, as set out in item 4,

(i) disinfected to destroy the living organism to non-detectable levels as verified using the sampling protocol appended to this Ministerial Condition; and

(ii) treated to lower the three metabolites of interest, so that the weight of each metabolite for disposal is no more than 1.8 grams (for example 60 parts per billion in 30 000 litres) in any 30-day period; and then

(b) treated biologically at the notified disposal facility, provided it is authorized by the laws of the jurisdiction where the treatment will take place.

3. (5) Prior to being disposed of or reused for a different purpose, all containers that held liquid or solid wastes containing the living organism or metabolites at any stage of the manufacture or disposal process must be decontaminated to remove any residual living organism or metabolites, with any resulting liquid wastes disposed of according to subitems 3(2) or 3(4).

3. (6) Disposal of containers referenced in subitem 3(5), or residual solid or liquid wastes following incineration or biological treatment must be in accordance with the laws of the jurisdiction where disposal will take place.

#### *Transportation Requirements*

4. (1) Transportation offsite for disposal of all disinfected solid and liquid wastes to the disposal facilities must be done in accordance with the laws of the jurisdictions where transport occurs, using a conveyance constructed or equipped to contain leaks, spills or other such releases during transport.

4. (2) For the purposes of subitem 4(1), the term “conveyance” means the term as defined in section 216 of the *Canadian Environmental Protection Act, 1999*.

3. (2) Sous réserve du paragraphe 3(4), tous les déchets liquides et solides résultant de la fabrication de l'organisme vivant, y compris les filtres de 0,2 microns mentionnés au paragraphe 3(1), ou de la décontamination des contenants qui renfermaient l'organisme vivant ou ses métabolites tel qu'il est indiqué au paragraphe 3(5), doivent :

a) être désinfectés, de la façon décrite dans le paragraphe 3(3), avant le transport vers son lieu d'élimination, tel qu'il est indiqué à l'article 4;

b) être incinérés à une température non inférieure à 900 °C par une installation autorisée par les lois de la province ou du territoire où l'incinération sera effectuée.

3. (3) Les déchets liquides et solides nécessitant une désinfection, tel qu'il est énoncé à l'alinéa 3(2)a), doivent être désinfectés de la façon suivante :

a) les filtres mentionnés au paragraphe 3(2) doivent être stérilisés à la vapeur;

b) les déchets solides, autres que les filtres mentionnés à l'alinéa 3(3)a) doivent être stérilisés avec de l'hypochlorite de sodium ou à la vapeur;

c) les déchets liquides doivent être stérilisés à une température d'au moins 60 °C pour un minimum d'une heure.

3. (4) Tous les déchets liquides, non désinfectés et incinérés de la manière prescrite au paragraphe 3(2), résultant de la fabrication de l'organisme vivant ou de la décontamination des contenants qui renfermaient l'organisme vivant ou ses métabolites, tel qu'il est indiqué au paragraphe 3(5), doivent :

a) avant le transport vers leur lieu d'élimination, tel qu'il est indiqué à l'article 4,

(i) être désinfectés à des fins de destruction de l'organisme vivant à des niveaux non décelables confirmés par le protocole d'échantillonnage annexé à cette condition ministérielle;

(ii) être traités de manière à ramener les trois métabolites d'intérêt à un poids n'excédant pas 1,8 grammes (par exemple 60 ppb par 30 000 L) durant toute période de 30 jours; et ensuite

b) subir un traitement biologique dans l'installation d'élimination déclarée, pourvu que ce traitement soit autorisé par les lois de la province ou du territoire où le traitement sera effectué.

3. (5) Avant leur élimination ou leur réutilisation à une autre fin, tous les contenants qui renfermaient des déchets liquides ou solides ayant contenu l'organisme vivant ou des métabolites, et ce, à n'importe quelle étape du processus de fabrication ou d'élimination, doivent être décontaminés afin d'éliminer tout organisme vivant ou métabolite résiduel, et tout déchet liquide ainsi produit doit être éliminé conformément aux paragraphes 3(2) ou 3(4).

3. (6) Les contenants mentionnés au paragraphe 3(5) ou les déchets solides et(ou) liquides résiduels provenant de l'incinération ou du traitement biologique doivent être éliminés conformément aux lois de la province ou du territoire où l'élimination sera effectuée.

#### *Exigences en matière de transport*

4. (1) Le transport vers le lieu d'élimination de tous les déchets liquides et solides désinfectés vers l'installation d'élimination doit être effectué conformément aux lois de la province ou du territoire où a lieu le transport, par un moyen de transport construit ou équipé pour contenir les fuites, les déversements ou autres rejets durant le transport.

4. (2) Pour l'application du paragraphe 4(1), le terme « moyen de transport » est défini à l'article 216 de la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)*.

*Report and Remedial Measures*

5. (1) Where any release to the environment of the living organism or its metabolites occurs in contravention of the conditions set out in items 2 or 3, the Notifier shall, as soon as possible in the circumstances,

(a) notify an enforcement officer, designated under the *Canadian Environmental Protection Act, 1999*, of the closest Environment Canada office to where the release occurred and provide a written report on the matter, as set out in subitem 5(2), to the enforcement officer;

(b) take all necessary measures consistent with the protection of the environment and public safety to prevent any further release or dispersion of the living organism and its metabolites, and to remedy any dangerous condition or reduce or mitigate any danger to the environment or to human life or health that results from the release or may reasonably be expected to result from the release; and

(c) make a reasonable effort to notify any member of the public who may be adversely affected by the release.

5. (2) The written report, as referred to in paragraph 5(1)(a), shall contain the following:

(a) the name of the living organism and its metabolites;

(b) the name and telephone number of the person who had the charge, management or control of the living organism prior to the release;

(c) the date, time and exact location of the release;

(d) the names of the agencies notified or on-scene at the time of release;

(e) the estimated quantity of the release;

(f) the duration of the release and its release rate;

(g) the means of containment (from which the living organism was released) and a description of its condition;

(h) the surrounding area/environment affected and potential impact of release;

(i) complete sequence of events before and after the release;

(j) all measures taken pursuant to paragraphs 5(1)(b) and (c) of this Ministerial Condition; and

(k) all measures to be taken to prevent this type of release from re-occurring.

5. (3) Prior to transport off-site for disposal, as set out in item 4, of liquid wastes for biological treatment at the disposal facility, notice shall be provided to the Minister, at least 90 days in advance of using a disposal facility other than that referenced in paragraph 3(4)(b). The notice must contain the following information:

(a) name and civic address of the proposed disposal facility; and

(b) a description of the biological treatment and its efficacy in removing the living organism and its metabolites.

*Record-Keeping Requirements*

6. (1) The Notifier shall maintain electronic or paper records, with any documentation supporting the validity of the information contained in these records, indicating the following:

(a) the quantity of the living organism the Notifier imports or manufactures;

(b) the quantity of liquid and solid wastes generated and being transported off-site to the disposal facilities;

(c) a description of all disinfection, treatment and decontamination methods identified in item 3, and the efficacy of these methods;

*Rapports et correctifs*

5. (1) En cas de rejet dans l'environnement de l'organisme vivant ou de ses métabolites en violation des conditions énoncées aux articles 2 ou 3, le déclarant est tenu, dans les meilleurs délais possibles :

a) de signaler le rejet à un agent de l'autorité, désigné dans la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement (1999)*, du bureau d'Environnement Canada situé le plus près du lieu du rejet et de lui fournir un rapport écrit sur la situation, tel qu'il est énoncé au paragraphe 5(2);

b) de prendre toutes les mesures, compatibles avec la protection de l'environnement et la sécurité publique, indiquées pour prévenir tout autre rejet ou dispersion de l'organisme vivant ou de ses métabolites et pour remédier à toute situation dangereuse ou pour supprimer ou atténuer tout danger résultant du rejet, ou pouvant résulter du rejet, pour l'environnement ou pour la vie ou la santé humaine;

c) de s'efforcer d'avertir les membres du public auxquels le rejet pourrait causer un préjudice.

5. (2) Le rapport écrit, spécifié à l'alinéa 5(1)a), doit contenir les renseignements suivants :

a) le nom de l'organisme vivant et de ses métabolites;

b) les nom et numéro de téléphone de la personne qui avait toute autorité sur l'organisme vivant avant son rejet;

c) la date, l'heure et le lieu exact du rejet;

d) le nom des organismes qui ont été avisés du rejet ou qui sont sur les lieux au moment du rejet;

e) la quantité estimée de l'organisme vivant déversé;

f) la durée et le taux d'émission du rejet;

g) le réservoir duquel l'organisme vivant a été déversé et une description de sa condition;

h) les aires et l'environnement affecté ainsi que les impacts potentiels du rejet;

i) la chronologie des événements avant et après le rejet;

j) toutes les actions entreprises en vertu des alinéas 5(1)b) et c) de cette condition ministérielle;

k) toutes les actions qui vont être entreprises afin de prévenir que ce type de rejet ne se produise à nouveau.

5. (3) Avant le transport, tel qu'il est décrit à l'article 4, des déchets liquides vers le lieu d'élimination pour y subir un traitement biologique, un avis doit être fourni au ministre au moins 90 jours avant l'utilisation d'une installation d'élimination autre que celle mentionnée à l'alinéa 3(4)b). L'avis doit contenir les renseignements suivants :

a) les nom et adresse municipale de l'installation d'élimination proposée;

b) une description du traitement biologique et de son efficacité à éliminer l'organisme vivant et ses métabolites.

*Exigences en matière de tenue des registres*

6. (1) Le déclarant doit tenir des registres papier ou électroniques, accompagnés de toute documentation validant l'information qu'ils contiennent et indiquant :

a) la quantité d'organisme vivant qu'il importe ou fabrique;

b) la quantité de déchets liquides et solides produite et transportée à l'installation d'élimination;

c) une description de toutes les méthodes de désinfection, de traitement et de décontamination mentionnées à l'article 3 et de l'efficacité de ces méthodes;

- (d) data to demonstrate the absence of the living organism and concentrations of metabolites in each batch of liquid waste sent for biological treatment at the proposed disposal facility;
- (e) the name and civic address of the facility, in Canada, where the solid wastes will be incinerated; and
- (f) a description of the mode of transport for all disinfected liquid and solid wastes, and rationale for the choice.

6. (2) The Notifier shall maintain the electronic or paper records made in subitem 6(1) at the Notifier's principal place of business in Canada for a period of at least five years after they are made.

#### APPENDIX TO MINISTERIAL CONDITION NO. 13965

##### Protocol for the Detection of Fungus *Fusarium* Species Strain CK 46-8 in Wastewater

1. Introduction
2. Materials and special equipment
3. Wastewater sample collection
4. Procedures
  - 4.1 Preparation of media
  - 4.2 Controls
  - 4.3 Plating and incubation of wastewater samples
5. Interpretation
6. Record-keeping requirements
7. References

#### 1. Introduction

The following protocol is recommended for the detection of Fungus *Fusarium* species strain CK 46-8 (including vegetative cells and spores), hereafter the living organism, in water and wastewater. Sampling and handling of the samples must be done in accordance with appropriate microbiological practices, as set out in the *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* by the American Public Health Association, the American Water Works Association and the Water Pollution Control Federation, as amended from time to time (APHA, AWWA and WPCF, 1998).

#### 2. Materials and special equipment

Sterile sample containers (capable of holding 1 litre [L] sample with ample headspace to facilitate mixing of sample by shaking prior to analysis)

Sterile pipettes

Potato Dextrose Agar (PDA)

Chloramphenicol

Sterile spreadfilter with funnel or membrane filtration unit

0.45 micrometre ( $\mu\text{m}$ ) pore size sterile membrane filters

Membrane filter forceps

Sterile water

#### 3. Wastewater sample collection

Resuspend settleable solids and completely homogenize the wastewater. Take  $2 \times 1$  L of wastewater from each shipment batch prior to transport to the treatment facility. Testing of the samples must commence within a maximum of one day after collection. Do not pre-filter the collected samples.

d) des données prouvant l'absence de l'organisme vivant et les concentrations de métabolites dans chaque lot de déchets liquides qui a été envoyé pour subir un traitement biologique à l'installation d'élimination proposée;

e) le nom et l'adresse municipale de l'installation, au Canada, où les déchets solides seront incinérés;

f) une description du moyen de transport de tous les déchets liquides et solides désinfectés et la raison de ce choix.

6. (2) Le déclarant doit conserver les registres tenus, conformément au paragraphe 6(1), au bureau principal canadien de son entreprise pour une période d'au moins cinq ans après leur création.

#### APPENDICE À LA CONDITION MINISTÉRIELLE N° 13965

##### Protocole de détection du champignon de l'espèce *Fusarium* de souche CK 46-8 dans les eaux usées

1. Introduction
2. Matériel et équipement spécial
3. Prélèvement des échantillons d'eaux usées
4. Procédures
  - 4.1 Préparation du milieu de culture
  - 4.2 Témoins
  - 4.3 Mise en culture et incubation des échantillons d'eaux usées
5. Interprétation
6. Exigences relatives à la tenue des dossiers
7. Références

#### 1. Introduction

On recommande le protocole suivant pour la détection de champignons de l'espèce *Fusarium* de souche CK 46-8 (cellules végétatives et spores), ci-après l'organisme vivant, dans l'eau et les eaux usées. Le prélèvement et la manipulation des échantillons doivent se faire en conformité avec les pratiques microbiologiques appropriées, telles qu'elles figurent dans le manuel intitulé *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* par la American Public Health Association, la American Water Works Association et la Water Pollution Control Federation (APHA, AWWA et WPCF, 1998), et ses modifications successives.

#### 2. Matériel et équipement spécial

Récipients stériles pour échantillons (pouvant contenir un échantillon de 1 litre [L] avec un espace libre suffisant pour permettre de mélanger facilement l'échantillon par agitation avant son analyse)

Pipettes stériles

Gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA)

Chloramphénicol

Appareil de filtration avec entonnoir ou unité de filtration sur membrane, stérile

Membranes filtrantes stériles à pores de 0,45 micromètre ( $\mu\text{m}$ )

Pincettes à membranes filtrantes

Eau stérile

#### 3. Prélèvement des échantillons d'eaux usées

Remettre les solides en suspension et homogénéiser complètement l'échantillon d'eaux usées. Prélever  $2 \times 1$  L d'eaux usées dans chaque lot d'expédition avant le transport vers l'installation de traitement. L'analyse des échantillons doit être entreprise au plus tard dans un délai d'une journée suivant l'échantillonnage. Ne pas pré-filtrer les échantillons.

#### 4. Procedures

##### 4.1 Preparation of media

Potato Dextrose Agar (PDA) is the medium of choice for routine detection of *Fusarium* species (Leslie and Summerell, 2005). PDA must be prepared according to the manufacturer's instructions. The media must be autoclaved and cooled to 60°C before chloramphenicol is added to a final concentration of 170 micrograms per milliliter ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), in order to prevent bacterial growth (Sambrooke et al., 1989). Chloramphenicol stock solution must be prepared and stored according to the manufacturer's instructions.

##### 4.2 Controls

###### Media sterility check

Incubate two plates of each batch of the media at room temperature (20–25°C) for two weeks. Note if there is any growth after two days of incubation and repeat fourteen days after incubation. Media sterility check must be run whenever a new batch of media or reagents is used.

###### Positive controls

Positive controls provide assurance to demonstrate the validity of the experimental conditions, procedures and results.

Collect 2 × 50 ml fermentation broth samples prior to the heat-kill treatment of the wastewater. Select a dilution factor in order to obtain a discrete amount of colonies of the living organism. Proceed with the membrane-filter method for each fermentation dilution broth sample (refer to section 4.3).

##### 4.3 Plating and incubation of wastewater samples

###### Membrane-filter method

Label each PDA-chloramphenicol plate with sample identification, preparation date and analysis start date/time.

Homogenize the liquid uniformly. Using an aseptic technique, transfer one 50-ml aliquot of wastewater sample to a single funnel. Filter each sample under partial vacuum through a sterile membrane filter until all liquid has passed through. Rinse the filter with 100 ml of sterile water.

Using sterile forceps immediately remove the membrane filter and place it grid-side-up on the PDA-chloramphenicol medium with a rolling motion to avoid trapping air under the filter. Reseat the membrane filter if bubbles occur.

Repeat procedure three times for every 1-L wastewater sample collected.

Rinse forceps after each sample filtration using sterile water. Sanitize the membrane-filter unit according to the manufacturer's instructions between the analysis of each sample.

Incubate plates in an inverted position at room temperature (20–25°C) for two weeks. Note if there is any growth after seven days of incubation and repeat fourteen days after incubation.

#### 5. Interpretation

*Fusarium* species colonies develop a reddish coloration on PDA and will show taxonomic characteristics under microscopic examination.

#### 4. Procédures

##### 4.1 Préparation du milieu de culture

La PDA est le milieu de culture de choix pour la détection courante des *Fusarium* (Leslie et Summerell, 2005). Cette gélose doit être préparée suivant les instructions du fabricant. Le milieu de culture doit être passé à l'autoclave, puis refroidi à 60 °C avant l'ajout du chloramphénicol en concentration finale de 170 microgrammes par millilitre ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ceci afin d'éviter toute croissance bactérienne (Sambrooke et al., 1989). La solution-mère de chloramphénicol doit être préparée et entreposée conformément aux indications du fabricant.

##### 4.2 Témoins

###### Témoins de stérilité du milieu

Incuber deux boîtes de Pétri de chaque lot de milieu de culture à la température ambiante (20 à 25 °C) pendant deux semaines. Noter s'il y a croissance sur les boîtes au bout de deux et quatorze jours d'incubation. Il faut vérifier la stérilité des milieux chaque fois qu'un nouveau lot de milieux ou de réactifs est utilisé.

###### Témoins positifs

Les témoins positifs permettent de vérifier la validité des conditions expérimentales, des procédures et des résultats.

Recueillir deux échantillons de 50 ml de bouillon de fermentation avant le traitement d'inactivation par la chaleur des eaux usées. Choisir un facteur de dilution afin d'obtenir des colonies isolées de l'organisme vivant. Appliquer la méthode de filtration sur membrane pour chaque échantillon dilué de bouillon de fermentation (voir la section 4.3).

##### 4.3 Mise en culture et incubation des échantillons d'eaux usées

###### Méthode de filtration sur membrane

Placer une étiquette sur chaque boîte de PDA-chloramphénicol en identifiant l'échantillon et en indiquant la date de sa préparation ainsi que la date et l'heure du début de son analyse.

Homogénéiser le liquide de façon uniforme. En utilisant une technique aseptique, transférer une aliquote de 50 ml de l'échantillon d'eaux usées dans un entonnoir unique. Sous vide partiel, filtrer chaque échantillon sur membrane stérile, jusqu'à ce que tout le liquide ait traversé la membrane. Rincer le filtre avec 100 ml d'eau stérile.

À l'aide des pinces stériles, retirer immédiatement la membrane filtrante et la placer, côté quadrillé vers le haut, sur la gélose traitée au chloramphénicol, ceci en veillant à éviter l'emprisonnement d'air sous la membrane. Replacer cette dernière si des bulles d'air se forment.

Répéter la procédure trois fois pour chaque échantillon d'eaux usées de 1 L.

Laver les pinces avec de l'eau stérile après la filtration de chaque échantillon. Nettoyer l'unité de filtration sur membrane suivant les instructions du fabricant entre chaque analyse d'échantillon.

Incuber les boîtes en position inversée à la température ambiante (20 à 25 °C) pendant deux semaines. Noter s'il y a croissance après sept jours d'incubation et répéter après quatorze jours.

#### 5. Interprétation

Les *Fusarium* formeront, sur la PDA, des colonies rouges qui manifesteront des caractéristiques taxonomiques à l'examen microscopique.

## 6. Record-keeping requirements

Keep a record of all the test reports, dated and signed by the personnel who generated the data. The test reports should include a detailed description of the test procedures used for the wastewater samples and controls and all the raw data collected, including images of plates if available.

## 7. References

- American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. 2003. Recherche et dénombrement des coliformes totaux : méthode par filtration sur membrane. MA.700-col 1.0. Ministère de l'Environnement du Québec. 21 p.
- Health Canada, Health Products and Food Branch. 2003. Enumeration of Coliforms, Faecal Coliforms and of *E. coli* in Water in Sealed Containers and Prepackaged Ice Using the Hydrophobic Grid-membrane Filter (HGFM) Method. Official Method MFO-18, Part 2. Ottawa, Ontario. (Published on Health Canada's Web site at [www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1/mfo18\\_2-01\\_e.html](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1/mfo18_2-01_e.html)).
- Leslie, J. F. and Summerell, B. A. 2005. *Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. 300 p.
- Sambrooke, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2001. Method 1605: *Aeromonas* in Finished Water by Membrane Filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V). [www.epa.gov/nerlcwww/1605ot01.pdf](http://www.epa.gov/nerlcwww/1605ot01.pdf).

[10-1-o]

## 6. Exigences relatives à la tenue des dossiers

Conserver un dossier de tous les rapports d'analyse datés et signés par le personnel ayant produit les données. Les rapports d'analyse doivent comprendre une description détaillée des procédures d'essai appliquées aux échantillons d'eaux usées et aux témoins, ainsi que toutes les données brutes recueillies, y compris des images des plaques, si on dispose de telles images.

## 7. Références

- American Public Health Association, American Water Works Association et Water Pollution Control Federation. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th edition.
- Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. 2003. Recherche et dénombrement des coliformes totaux : méthode par filtration sur membrane. MA.700-col 1.0. Ministère de l'Environnement du Québec. 21 p.
- Santé Canada, Direction générale des produits de santé et des aliments. 2003. Dénombrement des coliformes, des coliformes fécaux et des *E. Coli* dans l'eau en contenants scellés et dans la glace préemballée au moyen de la méthode de la membrane filtrante quadrillée hydrophobe (MFQH). Méthode officielle MFO-18, Partie 2. Ottawa, Ontario. (Document affiché sur le site Web de Santé Canada, à l'adresse [www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1/mfo18\\_2-01\\_f.html](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1/mfo18_2-01_f.html)).
- Leslie, J. F. et Summerell, B. A. 2005. *Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing. 300 p.
- Sambrooke, J., Fritsch, E. F. et Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- U.S. Environmental Protection Agency. 2001. Method 1605: *Aeromonas* in Finished Water by Membrane Filtration using Ampicillin-Dextrin Agar with Vancomycin (ADA-V). [www.epa.gov/nerlcwww/1605ot01.pdf](http://www.epa.gov/nerlcwww/1605ot01.pdf).

[10-1-o]