AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

ACADEMIE DE NANCY-METZ

CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

presentée à l'université de Metz
pour obtenir le diplome de DOCTORAT
Specialité : TOXICOLOGIE

COMPARAISON DE TROIS TESTS DE TOXICITE SUR BACTERIES (BIOLUMINESCENCE - RESPIRATION - MINERALISATION DU GLUCOSE)

par

Christine RETEUNA

Soutenue le 22 Juin 1988, devant le Jury :

Melle P. VASSEUR Président

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ

022 420289 9

ACADEMIE DE NANCY-METZ

CENTRE DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

presentée à l'université de Metz
pour obtenir le diplome de DOCTORAT
Specialité : TOXICOLOGIE

COMPARAISON DE TROIS TESTS DE TOXICITE SUR BACTERIES (BIOLUMINESCENCE - RESPIRATION - MINERALISATION DU GLUCOSE)

UNIVERSITE DE METZ
BIBLIOTHEQUE

par

Christine RETEUNA

Soutenue le 22 Juin 1988, devant le Jury :

Melle	**P. VASSEUR**	**President**
MM	**R. CABRIDENC**	
MM	**J.C. BLOCK**	
Melle	**G. APROSI**	

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 19880205
Cote S/Mz 88/10
Loc Magasin

Cette étude a été effectuée à l'Institut de Recherche Chimique Appliquée.

Que le président de ma thèse, Mademoiselle Vasseur, qui a su me guider par la richesse de ses conseils ainsi que par sa rigueur scientifique, trouve dans ce travail l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur Cabridenc a été l'instigateur de cette thèse, qui s'est déroulée au sein de son laboratoire. Qu'il reçoive l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur Block pour avoir accepté de juger ce travail. Son attitude critique et ses encouragements ont été un soutien précieux.

Que Mademoiselle Aprosi trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour l'intérêt qu'elle a bien voulu me manifester en acceptant de se joindre à ce jury.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Lepailleur ainsi qu'au personnel du service Ecotoxicité pour leur collaboration et leur gentillesse durant ces années de recherche.

Que Nathalie qui a assuré la dactylographie de ce manuscrit reçoive ici mes remerciements.

A tous mes collègues et amis de l'Institut de Recherche Chimique Appliquée, j'adresse mon amical souvenir.

INTRODUCTION

La prévention des risques chimiques à l'égard de l'environnement est inféodée à l'évaluation de l'écotoxicité des substances chimiques. Cette connaissance peut notamment être appréhendée par la réalisation de tests de toxicité aiguë, qui constituent une approche simplifiée des effets à court terme des substances chimiques sur les milieux étudiés.

Parmi les bioessais de toxicité aiguë ayant trait à l'environnement aquatique, les tests bactériens sont encore peu utilisés et leurs performances sont très peu connues. Compte tenu de l'importance quantitative et qualitative du monde procaryote, nous avons choisi de nous intéresser aux essais de toxicité sur bactéries et d'étudier les performances de 3 tests qui diffèrent par leurs méthodologies, à savoir :

- Le test Microtox dont le principe consiste à enregistrer la luminescence d'une bactérie marine, Photobacterium phosphoreum.

- Le test Consommation d'oxygène de boues activées qui a fait l'objet d'une normalisation à l'ISO.

- Le test Minéralisation du glucose chez Escherichia coli dans lequel le taux de CO_2 libéré est mesuré.

Après une présentation sommaire des principaux tests de toxicité bactériens, une synthèse des connaissances bibliographiques actuelles sur les 3 bioessais qui font l'objet de cette thèse a été réalisée.

A l'issu de ce travail bibliographique, nous avons voulu répondre à un certain nombre de questions, et en particulier définir les conditions optimales de réalisation des tests Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli ; l'influence de divers facteurs physico-chimiques, composition du milieu, température d'incubation, durée de l'essai... a été recherchée.

Les performances des 3 tests de toxicité bactériens ont ensuite été déterminées au travers d'un screening portant sur 11 substances chimiques choisies parmi les polluants frequemment trouvés dans l'environnement.

Enfin, l'analyse des données expérimentales a été envisagée à partir des caractéristiques et des méthodologies spécifiques de chaque bioessai étudié, et au terme de cette discussion, les applications possibles des tests Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose ont été proposées.

1 - GENERALITES

La fabrication, le transport et l'utilisation en industrie mais également en agriculture de nombreuses substances chimiques a pour conséquence une dissémination de ces substances dans l'environnement et notamment dans les milieux aquatiques.

Les nuisances à l'égard de la faune, de la flore et même de l'homme ont été ignorées pendant de nombreuses années, et ce sont les grandes catastrophes écologiques telles que les marées noires et les intoxications mortelles au cadmium et au mercure survenues au Japon qui furent à l'origine d'une prise de conscience générale de la gravité des problèmes de pollution.

Une série de mesures législatives ont été prises par les pouvoirs publics, dont les plus importantes au niveau national concernent :

- la pollution des eaux, loi du 16 décembre 1964, qui règlemente les déversements et rejets. Le décret du 23 février 1973 a institué un mécanisme d'autorisation préalable à tout rejet. Et une taxation est opérée par les agences de bassin à l'encontre des pollueurs.

- la protection de la nature, loi du 19 juillet 1976, qui exige la réalisation d'une étude d'impact par toute entreprise susceptible d'avoir une influence sur le milieu naturel.

- le contrôle des produits chimiques, loi du 12 juillet 1977, modifiée le 21 octobre 1982, qui prévoit pour toute nouvelle substance l'établissement d'un dossier comportant notamment des informations sur la toxicité vis à vis de l'environnement.

Mais l'établissement d'une législation adéquate nécessite une connaissance approfondie des modalités de contamination, ainsi que des effets et des mécanismes d'action toxique des polluants sur les êtres vivants. L'étude de ces problèmes est du ressort de l'écotoxicologie.

Il y a environ 20 ans, les premiers tests d'écotoxicité aiguë sont apparus. Le principe de ces tests peut être résumé comme suit : dans des conditions standardisées, le modèle biologique choisi est exposé à des concentrations croissantes du produit à tester. Une relation dose-effet est établie en retenant comme critère de toxicité la létalité, la croissance ou une activité biochimique telle que la respiration. Et la concentration inhibitrice à 50 %, CI_{50}, est recherchée, assortie d'une estimation du seuil de toxicité.

Ces bioessais ont pour objectif de déterminer la toxicité à court terme des substances chimiques sur des organismes aquatiques appartenant à différents niveaux trophiques du milieu hydrique. A cet égard peuvent être utilisés divers modèles biologiques : bactéries, algues, protozoaires, mousses, microcrustacés, poissons...

Compte tenu de la différence de sensibilité des organismes considérés, liée à des niveaux d'organisation, des modes nutritionnels et des métabolismes spécifiques, il s'avère nécessaire d'utiliser une batterie de tests pour tenter d'apprécier la toxicité des substances chimiques. Et bien que les essais en laboratoire ne puissent jamais simuler les phénomènes susceptibles d'apparaître en milieu naturel, ces tests présentent un intérêt évident car ils permettent d'établir dans des conditions standardisées une comparaison significative des effets toxiques des substances. Du fait de leur simplicité, ils peuvent également être utilisés en routine dans le cadre du contrôle de la qualité de l'environnement, et du contrôle des rejets industriels ou urbains soupçonnés de polluer les milieux aquatiques.

Actuellement, les tests sur microcrustacés, poissons et algues unicellulaires sont les plus employés ; ils font d'ailleurs l'objet d'une normalisation nationale ou internationale.

Cependant, depuis quelques années un intérêt croissant semble être porté aux tests de toxicité bactériens, conséquence de la manipulation aisée des bactéries qui constituent un exceptionnel outil de laboratoire, permettant de réaliser rapidement des mesures à faible coût, et d'envisager l'automatisation d'appareils.

Les bactéries représentent une partie importante de la biomasse terrestre, participent à la transformation des molécules, et aux cycles de la matière (C, N, S), et à ce titre les essais d'écotoxicité sur bactéries mériteraient de prendre place dans l'arsenal des tests imposés par la législation. Leur utilisation augmenterait l'éventail des bioessais actuellement en cours, assurant ainsi une meilleure évaluation de la toxicité.

En fait, le principal grief porté à l'encontre des tests bactériens est leur faible sensibilité. Ce manque de sensibilité apparent peut être imputable au réactif biologique, au critère de toxicité retenu, aux conditions de réalisation des tests, ainsi qu'à nos moyens de détection.

Nous ferons dans la suite de cet exposé, une présentation sommaire du matériel bactérien, suivie d'une étude des critères d'évaluation de la toxicité et de l'ensemble des facteurs susceptibles d'influer sur le résultat des tests, qui permettront de mieux définir les limites et les qualités des bioessais bactériens.

2 - LES TESTS DE TOXICITE SUR BACTERIES

2.1. PRESENTATION DU MATERIEL BACTERIEN

Les bactéries comptent parmi les plus petits organismes connus doués de métabolisme et capables de croître et de se multiplier aux dépens de substances nutritives.

La structure de la cellule bactérienne est relativement simple ; la bactérie est en effet dépourvue des organites intracellulaires (mitochondrie, réticulum endoplasmique, membrane nucléaire...) qui compartimentent la cellule eucaryote, mais par contre l'ensemble des équipements enzymatiques responsables du fonctionnement des grandes voies de dégradation et de synthèse sont présents.

La stratégie de base de la cellule est de former, lors de la dégradation des éléments nutritifs, de l'ATP, du $NAD(P)H_2$ et des métabolites intermédiaires, qui seront utilisés au cours des biosynthèses des macromolécules nécessaires à la vie et à la division des bactéries.

La figure 1 schématise les principales voies métaboliques suivies par les bactéries hétérotrophes aérobies, qui sont les plus employées dans les bioessais bactériens. L'exemple du glucose a été choisi car ce substrat a fait l'objet de nombreux travaux.

La voie glycolytique est la voie préférentiellement utilisée par les bactéries pour la production d'énergie. Elle conduit à la formation de pyruvate.

Selon les besoins de la cellule, le glucose peut également être orienté vers la voie des pentose-phosphates qui assure la production de $NADPH_2$ et de sucres en C_5, accompagnée du rejet de CO_2.

L'acétyl Coenzyme A, formé à partir du pyruvate entre dans le cycle tricarboxylique de Krebs, qui outre son rôle de fournisseur de métabolites intermédiaires, conduit à la libération de CO_2 mais surtout à la production de $NADH_2$ et de $FADH_2$.

Ces coenzymes réduits vont être réoxydés au niveau de la chaîne respiratoire, siège des réactions d'oxydo-réduction qui permettent le transfert des électrons jusqu'à l'accepteur terminal, l'oxygène moléculaire.

A la chaîne respiratoire est couplée la synthèse d'ATP ou phosphorylation oxydative.

Les voies cataboliques qui conduisent à la formation d'ATP, de $NADPH_2$ et de métabolites intermédiaires sont le plus souvent distinctes des voies anaboliques qui utilisent ces éléments dans les réactions de biosynthèses. Mais un fonctionnement harmonieux de l'ensemble des réactions enzymatiques est assuré par les mécanismes de régulation.

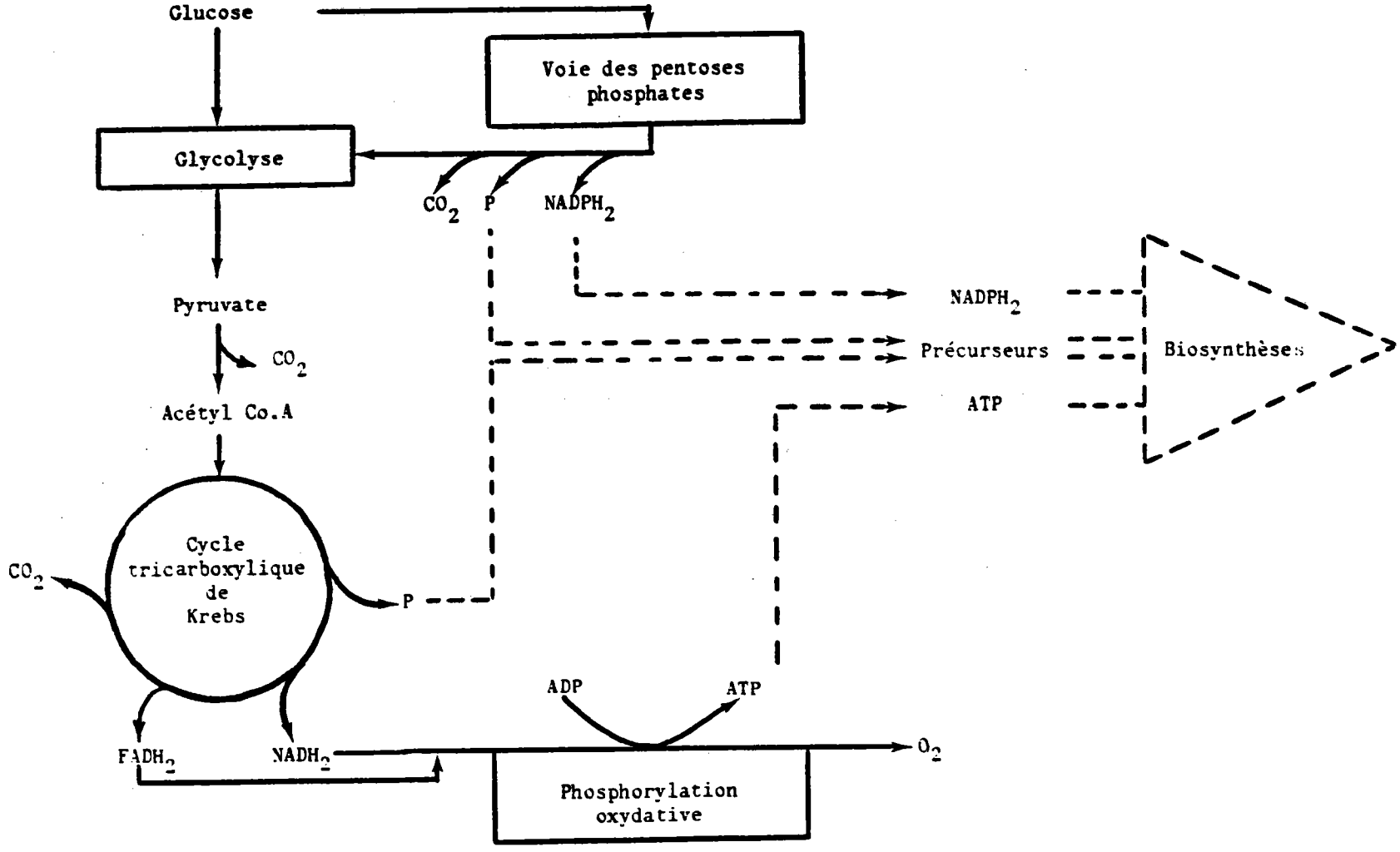


Figure 1 : Schéma du métabolisme du Glucose chez les bactéries hétérotrophes aérobies.

Voies cataboliques (—)
Voies anaboliques (---)
ATP = Adénosine triphosphate
NAD = Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
FAD = Flanine adénine dinucléotide

A partir de ce schéma général du métabolisme bactérien, un certain nombre de fonctions, plus ou moins spécifiques peuvent être choisies pour apprécier l'action inhibitrice des polluants.

2.2. LES PRINCIPAUX TESTS DE TOXICITE BACTERIENS

Il existe un très grand nombre de tests de toxicité bactériens, et ce chapitre n'a pas pour ambition de présenter une liste exhaustive de l'ensemble de ces tests. Ne seront abordés que les bioessais qui ont fait l'objet de nombreux travaux et les bioessais qui bien que peu développés présentent un intérêt quant aux réponses apportées dans des domaines bien particuliers.

Les tests de toxicité peuvent être regroupés en fonction des critères choisis pour évaluer un effet toxique. Ces critères peuvent concerner :

- le fonctionnement global de la cellule, à savoir la croissance, la production de chaleur, la mobilité.

- le fonctionnement de la chaine respiratoire, en particulier la consommation d'oxygène, l'activité déshydrogénasique et la synthèse d'ATP.

- l'assimilation d'un substrat carboné.

- des mécanismes plus particuliers tels que la luminescence, la formation de nitrites ou nitrates et la production de gaz.

2.2.1. Inhibition du fonctionnement global de la cellule bactérienne

- Mesure de la croissance

Placées dans des conditions optimales, les bactéries se caractérisent par une vitesse de croissance rapide (une division toutes les 20 minutes), et sous l'action de substances toxiques, cette cinétique peut être altérée ou même annulée.

La croissance des bactéries peut être suivie par numération en milieu gélosé ou en milieu liquide, en présence du toxique ou après une période d'exposition (LAFONT et ROMAND, 1983 ; LIU et KWASNIEWSKA, 1981 ; LOY et al., 1961 ; TREVORS et al., 1981 ; TREVORS et BASARABA, 1980).

La multiplication cellulaire est la résultante de nombreuses réactions biochimiques, et le contrôle de la croissance bactérienne représente donc un critère d'appréciation de la toxicité sur le fonctionnement global de la cellule.

- Mesures calorimétriques

Les réactions biochimiques qui ont lieu au sein de la cellule libèrent de l'énergie sous forme de chaleur, conséquence d'un rendement inférieur à 1. Et la quantité de chaleur ainsi produite est proportionnelle à l'activité métabolique des bactéries.

La diminution de chaleur consécutive à l'addition de substances toxiques renseigne sur l'existence de phénomènes d'inhibition concernant le métabolisme bactérien dans son ensemble.

BEAUBIEN et JOLICOEUR (1984, 1985) et BEAUBIEN et al. (1985 , 1986) ont étudié au moyen d'un microcalorimètre à flux la réponse thermique des bactéries aux toxiques, dans des conditions endogènes ou dans des conditions de saturation en substrat.

Cependant, les mesures calorimétriques restent dépendantes d'un appareillage sophistiqué, et ce test est encore limité à la recherche.

- Mesure de la mobilité

La mobilité des bactéries traduit indirectement le bon fonctionnement de la cellule.

Un test de toxicité sur la mobilité de Spirillum volutans a été proposé dès 1974 par BOWDRE et KRIEG (cité par BITTON, 1983).

Spirillum volutans est une bactérie en bâtonnet portant à chaque pôle des flagelles dont le mouvement devient anarchique ou est totalement inhibé en présence de toxiques.

Après la période d'exposition, l'obtention des résultats passe par une étape d'observation au microscope.

2.2.2. Inhibition du fonctionnement de la chaîne respiratoire

Les tests basés sur l'inhibition du fonctionnement de la chaîne respiratoire aérobie ne concernent que les microorganismes doués de métabolisme respiratoire, appartenant au groupe des aérobies strictes, des microaérophiles et des aérobies-anaérobies facultatives (Figure 2).

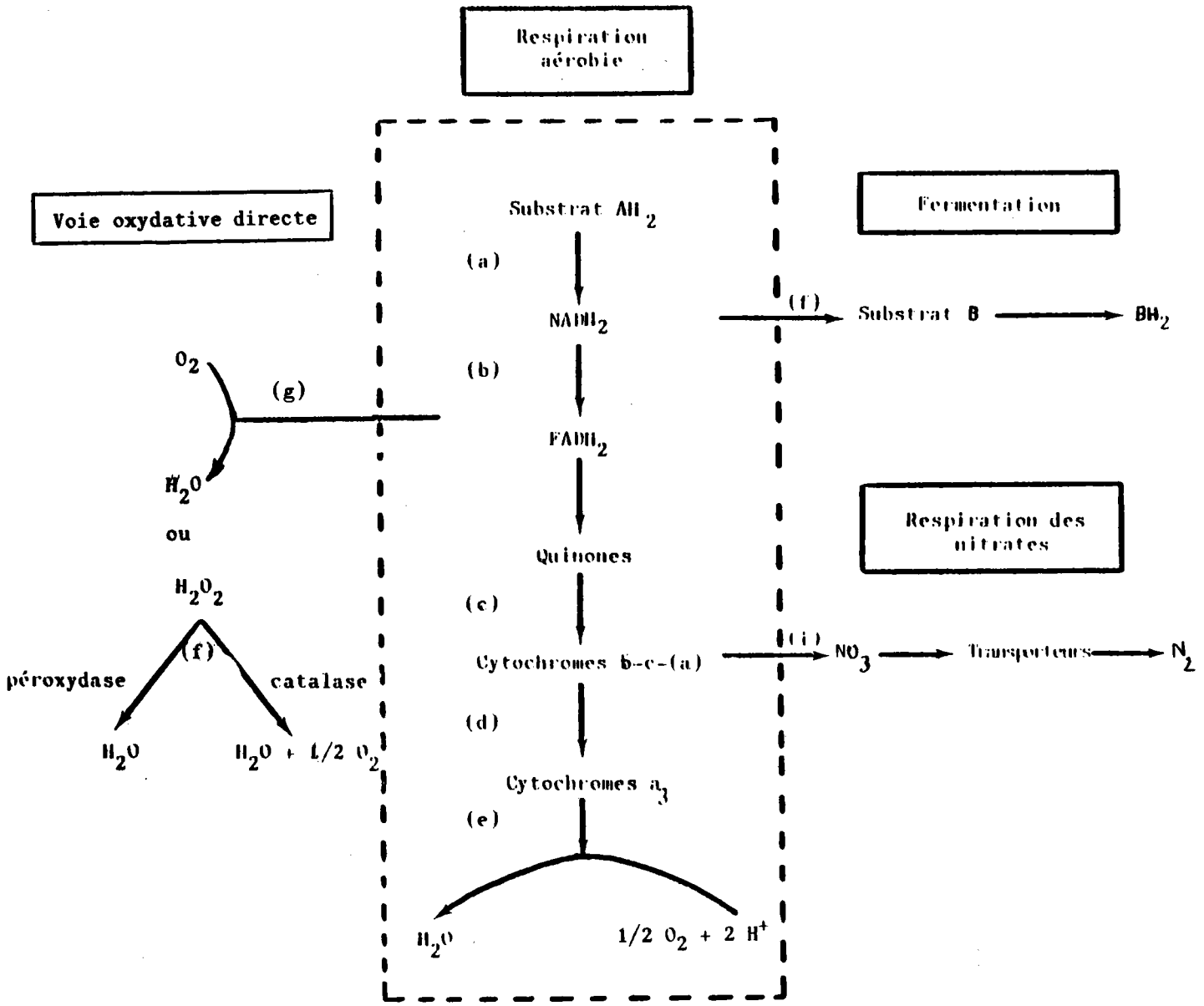


Figure 2 : Réactions d'oxydo-réduction utilisables par les bactéries hétérotrophes à des fins énergétiques (dans MARCHAL et al., 1982).

- Bactéries aérobies strictes : a - b - c - d - e = voie cytochromique aérobie
- Bactéries aérobies ou anaérobies facultatives :
  - . en aérobiose : a - b - c - d - e + g - f
  - . en anaérobiose : a - f (fermentations)
    a - b - c - i (respiration anaérobie)
- Bactéries anaérobies strictes : a - f (fermentations)
  a - b - c - i (respiration anaérobie)
  a - b - g (en présence d'O_2).

La chaîne respiratoire chez les bactéries est localisée au niveau de la membrane cytoplasmique et son fonctionnement se traduit par la consommation d'oxygène, la mobilisation des déshydrogénases et la synthèse d'ATP.

- Mesure de la consommation d'oxygène

L'oxygène est l'accepteur terminal du flux d'électrons qui transite le long de la chaîne respiratoire, et qui résulte de l'activité catabolique de la cellule (Figure 3).

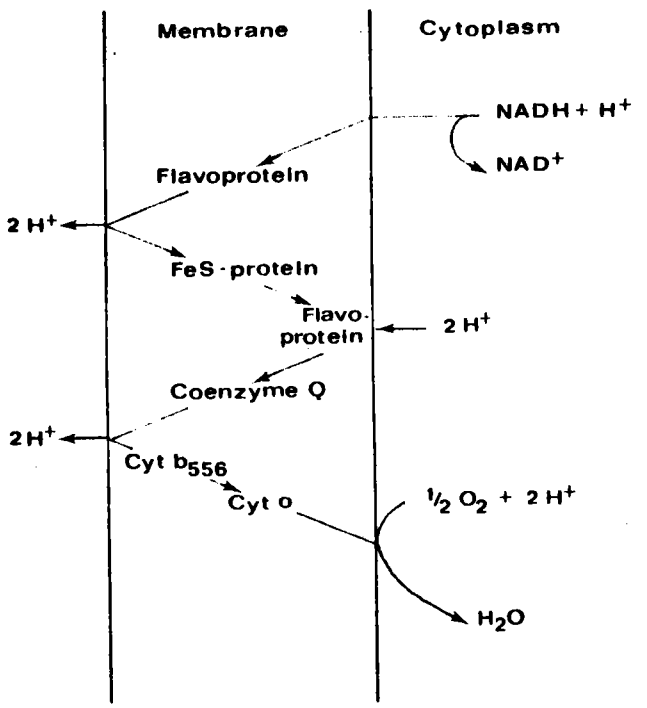


Figure 3 : Chaîne respiratoire d'Escherichia coli en milieu aérobie (GOTTSCHALK, 1986).

Une diminution du taux d'oxygène consommé, sous l'action de substances toxiques, reflète donc un ralentissement dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Dans les bioessais, la consommation d'oxygène par les bactéries est généralement mesurée en présence d'un substrat non limitant, par dosage potentiométrique de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel.

Ces mesures font l'objet d'une étude plus approfondie au chapitre 3.2.

- Mesure de l'activité déshydrogénasique

Les déshydrogénases sont des enzymes qui participent aux réactions d'oxydo-réduction des molécules par transfert d'hydrogène.

Dans la chaîne respiratoire, elles assurent les transferts d'hydrogène entre les coenzymes qui leur sont associés, NAD, flavoprotéines, coenzyme Q, et leur activité reflète l'intensité du flux d'électrons.

L'activité déshydrogénasique peut être mesurée au moyen de molécules organiques, qui du fait de leur potentiel d'oxydo-réduction vont jouer le rôle d'accepteur artificiel d'électrons, comme le bleu de méthylène, la rézazurine (LIU, 1981) les sels de tétrazolium, en particulier le chlorure de triphényl tétrazolium ou TTC (RYSSOLV-NIELSEN, 1975), et le chlorure de 2-(p-iodophényl)-3-(p-nitrophényl)-5-phényl tétrazolium ou INT (BITTON et al., 1986) (Figure 4).

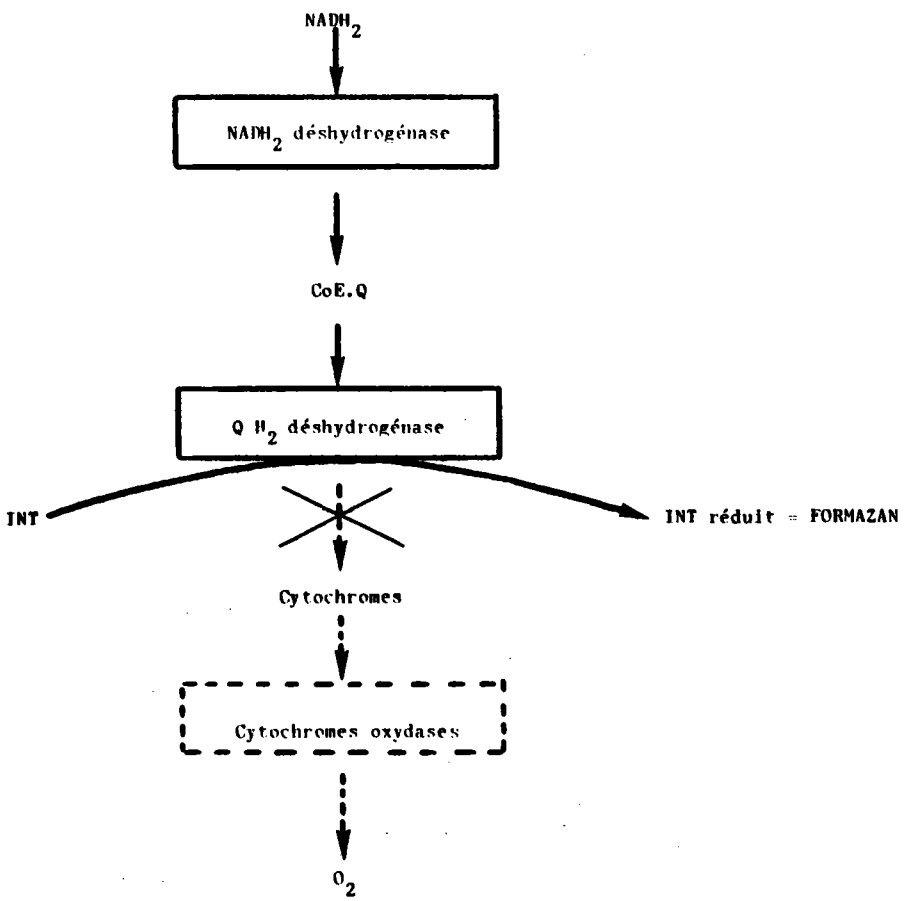


Figure 4 : Principe de la mesure de l'activité déshydrogénasique au moyen de l'INT.

- Mesure de la teneur en ATP

L'ATP est un nucléotide, composé d'adénine, de ribose et de phosphate, qui agit comme métabolite intermédiaire donneur d'énergie dans de nombreuses activités cellulaires telles que les réactions de biosynthèse, les transports actifs, la mobilité...

La synthèse d'ATP est couplée au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Selon la théorie chimiosmotique de Mitchell (1966), le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire s'accompagne de la création d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane, nécessaire au fonctionnement du système ATPasique (Figure 5).

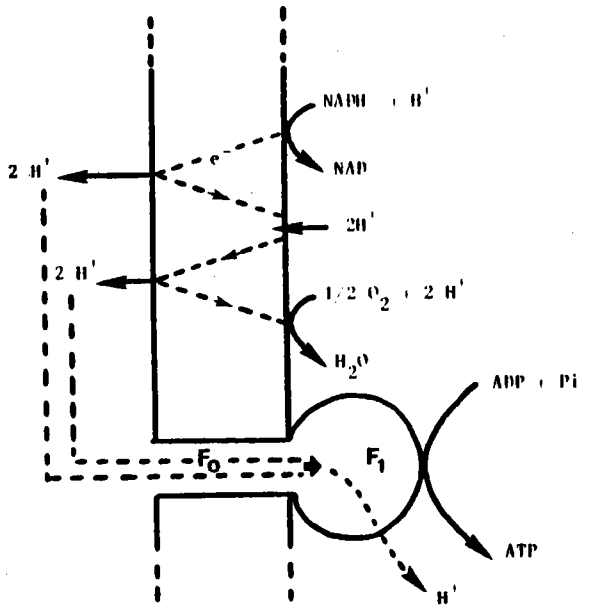


Figure 5 : Synthèse d'ATP selon la théorie chimiosmotique de Mitchell (d'après GOTTSCHALK, 1986).
L'ATP synthètase est constituée des sous-unités Fo et F_1 ; Fo assure le passage des protons à travers la membrane, et l'ATP est synthétisé au niveau de F_1.

Le dosage de l'ATP est réalisé par bioluminescence, après extraction du milieu cellulaire. Cette méthode utilise la capacité du système enzymatique luciférase à oxyder, en présence d'ATP, la luciférine ; cette oxydation s'accompagne d'une production de photons proportionnelle à la teneur en ATP du milieu :

$$\text{Luciférine} + \boxed{\text{ATP}} + O_2 \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{Luciférase}} \text{Oxyluciférine} + \text{AMP} + \text{PPi} + CO_2 + \boxed{h\nu}$$

Eu égard à son turn-over extrêmement élevé (l'ATP est consommé dans la minute qui suit sa formation), toute perturbation de la synthèse d'ATP par des agents toxiques se traduira immédiatement par une diminution de la concentration. Ainsi, la teneur en ATP peut être un indicateur de la vitalité des cellules bactériennes (MARTIN, 1983).

2.2.3. Inhibition de l'assimilation de substrat carboné

L'utilisation de substrat carboné est spécifique des bactéries hétérotrophes.

Dans les bioessais, le substrat généralement apporté est le glucose uniformément marqué, et l'effet inhibiteur des substances toxiques est évalué au travers des mesures de carbone radioactif fixé par les bactéries et de CO_2 marqué rejeté.

Pour les microorganismes aérobies stricts et aérobies-anaérobies facultatifs placés dans des conditions d'aérobiose, le CO_2 libéré provient principalement de la glycolyse, du cycle de Krebs, et de la voie des pentoses-phosphates, et il résulte de la minéralisation du substrat (Figure 1).

Une analyse détaillée des tests basés sur l'assimilation de substrat carboné est présentée au chapitre 3.3.

2.2.4. Inhibition de mécanismes particuliers

- Mesure de la bioluminescence

La bioluminescence résulte d'un ensemble de réactions biochimiques observées principalement chez des bactéries appartenant à 2 genres : Vibrio et Photobacterium.

Un test de toxicité qui met à profit cette propriété a été mis au point, et il est présenté au chapitre 3.1.

- Mesure de la formation des nitrites ou nitrates

La formation de nitrites ou de nitrates à partir d'ions ammonium résulte de l'activité de bactéries nitrifiantes autotrophes, Nitrosomonas sp. et Nitrobacter sp. :

$$NH_4^+ + 3/2\ O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H^+ + H_2O \quad (\text{Nitrosomonas sp.})$$

$$NO_2^- + 1/2\ O_2 \longrightarrow NO_3^- \quad (\text{Nitrobacter sp.}).$$

Ces bactéries chimiolithotrophes tirent leur énergie de l'oxydation de composés minéraux, en l'occurence l'ammoniaque ou les nitrites, et l'accepteur terminal d'électrons est l'oxygène.

L'effet des substances toxiques peut être évalué en suivant les cinétiques de diminution du substrat, par exemple les nitrites pour Nitrobacter (WILLIAMSON et NELSON, 1983).

- Mesure de la production de gaz

La production de gaz (méthane + CO_2) concerne les bactéries méthanogènes, rarement étudiées principalement pour des raisons techniques car elles se développent en anaérobiose. Pourtant les bactéries des habitats anoxiques sont capables d'intervenir de façon prépondérante dans la biodégradation des grosses molécules telles que la cellulose, et des substances peu solubles qui s'adsorbent sur les sédiments.

L'inhibition de la production de gaz par les substances chimiques n'a cependant été envisagée que dans le cadre de travaux de recherche (JOHNSON et YOUNG, 1983 ; PLAYNE et SMITH, 1983), et les bioessais proposés se caractérisent par des périodes d'incubation relativement longues (1 à plusieurs jours, voire plusieurs semaines), conséquence des faibles taux de croissance des anaérobies.

2.3. QUELQUES REMARQUES SUR LES TESTS DE TOXICITE BACTERIENS

Suite à cette présentation des principaux tests de toxicité bactériens, nous conclurons par quelques réflexions sur les critères d'évaluation et les mesures de la toxicité, le choix du réactif bactérien, et l'influence des conditions expérimentales sur les résultats des tests.

2.3.1. Critères d'évaluation et mesure de la toxicité

La classification précédente des tests de toxicité sur bactéries est basée sur la nature du critère choisi pour évaluer la toxicité. Nous avons distingué :

- les critères généraux liés au fonctionnement global de la cellule, croissance, émission de chaleur, mobilité.

- les critères plus spécifiques tels que la consommation d'oxygène ou la bioluminescence.

Le choix d'un signal tel que la croissance peut sembler à priori plus judicieux car il intègre toute perturbation susceptible de se produire à n'importe quel niveau du métabolisme cellulaire.

Mais même les mesures considérées comme plus spécifiques telles que la bioluminescence, reflètent également les effets inhibiteurs des substances chimiques ; en effet, toute perturbation importante en un point de la cellule se répercutera sur les différentes voies métaboliques par l'intermédiaire des mécanismes de régulation qui établissent des passerelles entre les milliers de réactions se produisant au sein des bactéries.

Par contre, nos moyens de détection de la réponse des bactéries aux toxiques interviennent probablement pour une part importante dans la sensibilité et la durée des tests.

Ainsi, la mesure d'un effet inhibiteur sur la consommation d'oxygène nécessite une variation importante de la concentration en oxygène dissous dans le milieu réactionnel pour que nous puissions la détecter. Il est donc nécessaire d'exposer des populations denses de microorganismes au toxique pendant des périodes relativement longues, avec pour conséquence une possibilité de multiplication et un risque accru de sélectionner des mutants résistants. De même, un effet inhibiteur sur la croissance ne sera mis en évidence qu'après de très nombreuses divisions.

Les mesures de radioactivité, de bioluminescence, d'ATP ou d'activité enzymatique semblent présenter un seuil de détection plus faible.

2.3.2. Choix du réactif bactérien

- Nature des bactéries

Pour des raisons avant tout pratiques, les bactéries hétérotrophes aérobies strictes et aérobies-anaérobies facultatives représentent le groupe le plus utilisé dans les tests de toxicité (Pseudomonas, Aeromonas, Escherichia coli, les boues activées...).

L'effet toxique des substances chimiques peut également être recherché sur des bactéries plus spécialisées telles que les bactéries nitrifiantes ou les bactéries méthanogènes.

Au sein d'un groupe, le choix des souches est fonction de leur représentativité vis à vis de l'environnement et des habitudes du laboratoire, mais ne repose pas réellement sur leur sensibilité spécifique aux toxiques qui reste très peu connue.

- Souche pure ou population mixte

Les tests de toxicité sont réalisés sur souches pures cultivées en laboratoire, ou sur populations mixtes le plus souvent prélevées dans les milieux naturels.

Travailler sur un échantillon d'eau avec sa propre population bactérienne parait évidemment plus représentatif des évènements qui peuvent survenir dans l'environnement. Néanmoins, ce choix pose un certain nombre de problèmes.

D'une part, il est extrêmement difficile de conserver en laboratoire de tels échantillons. Ils évoluent obligatoirement et les effets de paroi du matériel de prélèvement ne sont pas négligeables.

D'autre part, les caractéristiques du milieu peuvent varier de façon importante d'un échantillon à l'autre.

Un autre facteur important et inconnu est le passé des bactéries, qui compte tenu de leurs capacités d'adaptation et de leur mémoire biochimique, va nécessairement interférer sur leurs réponses aux toxiques.

Il en résulte que les tests sur populations naturelles se caractérisent par une bonne valeur prédictive mais une mauvaise répétabilité (BLOCK et al., 1988).

A l'opposé, les tests sur souches pures présentent une plus faible valeur prédictive mais une répétabilité correcte à condition toutefois que les cultures en laboratoire soient parfaitement standardisées. C'est pourquoi, il est absolument indispensable de réaliser les bioessais sur des concentrations précises en bactéries présentant des caractéristiques physiologiques définies par les conditions de croissance, l'âge de la culture... (TREVORS et al., 1981).

2.3.3. Conditions expérimentales

D'une façon générale, les caractéristiques physico-chimiques du milieu réactionnel, en particulier la température, le pH, la dureté, la concentration en oxygène, et en substrat... vont interférer sur la réponse du test, d'une part en agissant directement sur l'état physiologique des bactéries, et d'autre part en modifiant la spéciation des toxiques et donc par voie de conséquence leur biodisponibilité et leur toxicité vis à vis du réactif biologique.

A titre d'exemple, les bioessais tels que les tests de croissance, d'émission de chaleur ou de consommation d'oxygène qui nécessitent un substrat abondant, vont engendrer des phénomènes de complexation notamment avec les métaux, ce qui a pour conséquence de diminuer les effets inhibiteurs de ces toxiques.

Dans la mesure du possible il sera intéressant d'évaluer l'importance de ces phénomènes d'interaction notamment pour l'interprétation des résultats, et en tout état de cause les essais devront être réalisés selon des méthodologies parfaitement standardisées.

3 - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE :

. INHIBITION DE LA BIOLUMINESCENCE DE PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM

. INHIBITION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE

. INHIBITION DE LA MINERALISATION DU GLUCOSE

Après cette présentation générale des tests de toxicité bactériens, nous allons maintenant aborder l'analyse bibliographique relative aux 3 bioessais qui font l'objet de cette thèse.

3.1. INHIBITION DE LA BIOLUMINESCENCE DE *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

3.1.1. Principe

Si la capacité de certaines bactéries à émettre de la lumière est connue depuis longtemps, c'est à partir de 1978 que BULICH et GREENE ont mis à profit cette propriété en proposant un test de toxicité, appelé test Microtox ; leur choix s'est porté sur Photobacterium phosphoreum, achromobacter luminescent qui se développe dans l'eau de mer et dans les organes luminescents de certains poissons.

Le principe du test consiste à comparer la luminescence des bactéries avant et après addition de substances toxiques.

3.1.2. La luminescence bactérienne

NEALSON et HASTINGS (1979) ont étudié le mécanisme de la luminescence bactérienne, et ils ont proposé un schéma dans lequel le système luminescent est en concurrence avec la chaîne respiratoire pour l'utilisation des coenzymes réduits NADH (Figure 6).

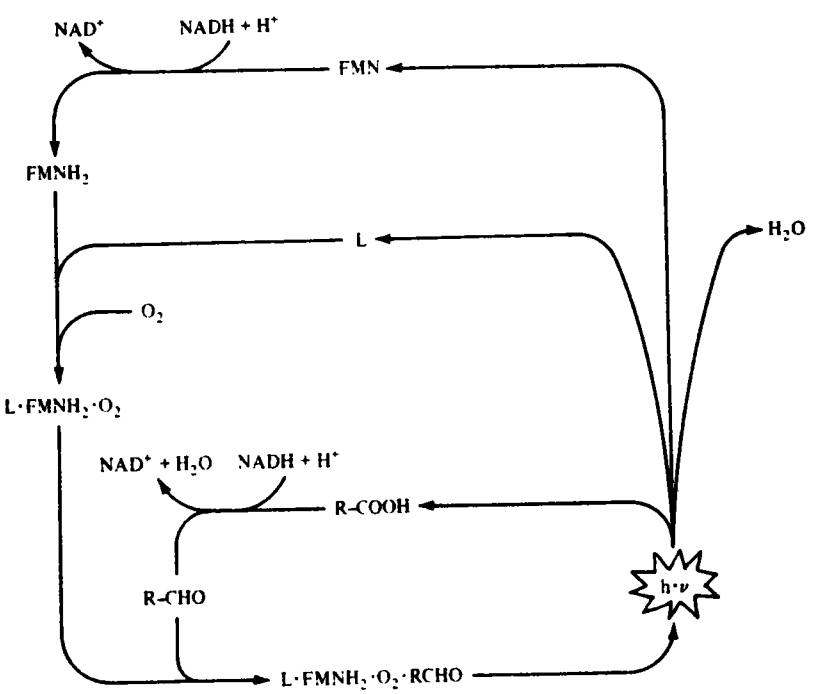


Figure 6 : Mécanisme biochimique de la luminescence (dans GOTTSCHALK, 1986).

Les enzymes qui interviennent dans le cycle de production de la lumière sont :

- une luciférase qui en présence de $FMNH_2$, d'oxygène et d'aldéhyde va permettre l'émission de lumière. Une petite protéine, la lumazine participerait à la formation du complexe excité final (VERVOORT et al., 1983).

- les NAD(P)H, FMN oxydoréductases qui assurent la réduction de la FMN en utilisant soit le NADH, soit le NADPH.

- les enzymes du métabolisme des aldéhydes, les acides réductases, qui seraient impliquées dans la production d'aldéhyde à longue chaîne à partir de l'acide correspondant (CLINE et HASTINGS, 1974).

La localisation de la luciférase reste imprécise. Bien qu'elle soit généralement retrouvée dans la fraction soluble du cytoplasme, de nombreux auteurs pensent qu'elle agit en liaison avec le système membranaire (DANILOV et al., 1982) ; BALAKRISHNAN et LANGERMAN, 1977 ; NE'EMAN et al., 1977 ; ENGELBRECHT et al., 1983).

Les ions phosphates stabiliseraient la structure de la luciférase (HOLZMAN et BALDWIN, 1980).

3.1.3. Influence des conditions expérimentales

Depuis sa mise au point, le test Microtox a été utilisé afin d'évaluer la toxicité de substances chimiques pures, organiques et minérales, ainsi que d'effluents complexes. Et de nombreux travaux ont permis de préciser l'influence de la durée et de la température de l'essai sur la réponse aux toxiques de Photobacterium phosphoreum.

- Durée d'exposition

Dans les premières publications sur le test Microtox présentées par BULICH, la durée de l'essai (contact toxique-bactéries) était fixée à 5 min. Par la suite, de nombreux auteurs ont étudié l'évolution de la réponse bactérienne en fonction de la durée d'exposition aux toxiques.

Les tableaux 1a, 1b et 1c regroupent les résultats d'essais Microtox sur des substances chimiques pures, pour différents temps d'exposition compris entre 5 et 60 minutes. Et une classification a été établie en fonction de la rapidité d'action des toxiques sur la bioluminescence :

- les substances dites à action rapide montrent un effet inhibiteur maximum après 5 min. d'incubation (Tableau 1a). Ces toxiques sont généralement de nature organique et l'on peut citer comme exemple le phénol et ses dérivés, les hydrocarbures benzéniques, les alcanes cycliques, l'acétone, le méthanol... Le Cr^{3+} est le seul toxique minéral qui ait montré une action rapide.

- les substances dites à action intermédiaire voient leurs effets inhibiteurs augmenter surtout durant les 15 premières minutes (Tableau 1b). Cette classe regroupe des toxiques organiques tels que les détergents, le laurylsulfate de sodium, le dodecylsulfate de sodium... mais également des toxiques minéraux comme l'arsenic et le plomb.

- les substances dites à action lente ont un effet toxique maximal après 30 min. d'incubation (Tableau 1c). Ces toxiques sont essentiellement de nature minérale : sels de cuivre, cadmium, zinc, nickel, sélénium et les cyanures.

Le Cr^{6+} et le Hg^{++} apparaissent dans les tableaux 1b et 1c. Ces résultats divergents soulignent la nécessité de travaux supplémentaires afin de définir le comportement de ces 2 substances vis à vis de Photobacterium phosphoreum.

La classification établie précédemment à partir d'études sur des substances chimiques pures a été confirmée par des travaux sur des milieux complexes (DANOUX, 1982 ; CALLEJA et al., 1986).

Lors de la détermination de la toxicité d'échantillons de composition chimique inconnue au moyen du test Microtox, il conviendra donc de rechercher la durée d'incubation qui assure la sensibilité optimale des essais.

Tableau 1a : Influence de la durée d'exposition sur la toxicité exprimée par la CI_{50} en mg/l (θ = 15°C) ; substances dites à action rapide.

Substance chimique	CI_{50} (mg/l) pour différents temps d'exposition en min.						Références
	5	10	15	20	30	60	
3-5 dichlorophénol	3,2	3	2,9	-	-	-	DUTKA et al., 1983
Phénol	28	31,9	34,3	-	-	-	
Toluène	218	216	-	-	-	-	FERARD et al., 1983
Xylène	75	73	-	-	-	-	
Ethylbenzène	5,5	6,1	-	-	-	-	
Chlorobenzène	14,6	18	-	-	-	-	
Cyclohexane	85,5	93	-	-	-	-	
Cyclohexanone	25	21,3	-	-	-	-	
Acetone	12364	-	12601	-	13213	-	GREENE et al., 1985
Méthanol	158000	-	284400	-	323900	-	
Phénol	24,5	28,1	26,3	26,4	-	-	QURESHI et al., 1984
Cr^{3+}	10,7	12,6	15,3	15,8	16	-	
Phénol	25	-	28	-	32	-	MICROTOX APPLICATION NOTES - M.102 - 1981
Cyclohexanone	10	-	11	-	12	-	

Tableau 1b : Influence de la durée d'exposition sur la toxicité exprimée par la CI_{50} en mg/l (θ = 15°C) ; substances dites à action intermédiaire

Substance chimique	CI_{50} (mg/l) pour différents temps d'exposition en min.						Références
	5	10	15	20	30	60	
Chlorure de cetyl trimethyl ammonium	1,35	-	0,98	-	0,86	-	DUTKA et al., 1983
Lauryl sulfate de sodium	3,19	-	2,1	-	1,8	-	
Hg^{++}	0,064	-	0,049	-	0,046	-	
Arsenate de sodium	3,57	-	1,73	-	1,60	-	GREENE et al., 1985
Arsenite de sodium	24,67	-	18,39	-	16,60	-	
Arsenic trioxyde	73,73	-	43,56	-	33,39	-	
Dodecylsulfate de Na	1,78	1,94	0,90	0,78	-	-	QURESHI et al., 1984
Pb^{++}	2,06	0,78	0,46	0,39	0,31	-	
Lauryl sulfate de sodium	1,2	-	0,7	-	0,5	-	MICROTOX APPLICATION NOTES - M.102 - 1981
Pentachlorophenate de sodium	1	-	0,7	-	0,6	-	
Na As O_2 comme As^{5+}	40	-	26	-	26	-	
$K_2Cr_2O_7$ comme Cr^{6+}	22	-	18	-	15	-	
$Pb(NO_3)_2$ comme Pb^{++}	1,4	-	0,6	-	0,4	-	

Tableau 1c : Influence de la durée d'exposition sur la toxicité exprimée par la CI_{50} en mg/l (θ = 15°C) ; substances dites à action lente.

Substance chimique	CI_{50} (mg/l) pour différents temps d'exposition en min.						Références
	5	10	15	20	30	60	
Cu^{++}	1,21	-	0,28	-	0,23	0,12	GREENE et al., 1985
Cd^{++}	102,6	-	25,4	-	13,8	3,8	
CN^{-}	4,77	-	1,40	-	0,61	-	
Hg^{++}	0,06	-	0,02	-	0,01	-	
Zn^{++}	11,98	-	1,56	-	0,86	0,68	
Cu^{++}	1,84	1,98	0,28	0,18	0,13	-	QURESHI et al., 1984
Cd^{++}	154	70,8	41,4	27,2	14,9	-	
Cr^{6+}	38,6	39,5	26,9	24	16,8	-	
Ni^{++}	1056	1073	251	136	42,2	-	
Se^{4+}	215,2	53,9	33,4	29,1	19,5	-	
Zn^{++}	55,5	64,7	6,08	3,60	1,44	-	
Cd^{++}	-	-	44,2	-	19,5	-	ROBRA, 1979
Cu^{++}	1,5	1,05	0,62	0,5	-	-	VASSEUR et al.*, 1984[a]
Cd^{++}	-	-	-	>10	5	2,5	VASSEUR et al., 1986
Zn^{++}	4	1,7	-	1	0,75	-	
Cu^{++}	3,5	-	0,8	-	0,4	-	MICROTOX APPLICATION NOTES - M.102 - 1981
Cd^{++}	100	-	20	-	8	-	
CN^{-}	12	-	4	-	2,5	-	
Ni^{++}	410	-	100	-	20	-	
Zn^{++}	26	-	4	-	2	-	

* Essai en milieu marin naturel

- Température d'exposition

Les données bibliographiques concernant l'influence de la température d'exposition sur la réponse de Photobacterium phosphoreum aux toxiques sont peu nombreuses, et la plupart des essais sont effectués à 15°C.

FERARD et al. (1983) ont montré que la toxicité des métaux, cadmium, cuivre, fer, zinc, plomb à l'exception du chrome, est augmentée si l'on passe de 15 à 20°C, la durée d'exposition étant de 10 minutes.

D'après VASSEUR et al. (1984), l'augmentation du facteur température de 15 à 20°C a pour conséquence d'accroître la sensibilité des bactéries au cadmium et au zinc mais reste sans effet sur la toxicité du chrome et du cuivre, les essais étant réalisés après 20 min. d'exposition.

Pour le benzène une température de 20°C favorise la volatilisation du toxique et s'oppose donc à la détermination d'une CI_{50} (VASSEUR et al., 1986). L'augmentation de la température est donc à proscrire pour les composés volatiles. Et le plus souvent, ce facteur ne modifie que faiblement les résultats.

3.1.4. Influence des paramètres physico-chimiques

L'interaction des facteurs physico-chimiques sur la toxicité des substances testées a été évoquée par DUTKA et KWAN (1981), BULICH et al. (1981) ainsi que QURESHI et al. (1982). Ces auteurs ont mis l'accent sur les problèmes que pouvaient poser la coloration des échantillons, leur teneur en oxygène ainsi que certaines valeurs de salinité, dureté et pH dans l'évaluation de la toxicité.

- Coloration

En ce qui concerne l'absorption possible de la luminescence par les échantillons de couleur brun-rouge, une solution a été trouvée dans l'adoption d'un système double cuve qui permet de prendre en compte la diminution de la luminescence bactérienne due à la coloration.

- Teneur en oxygène

La teneur en oxygène de l'échantillon peut interférer sur la toxicité mesurée. DANOUX (1982) a démontré que la concentration en oxygène dans le milieu réactionnel devait être supérieure à 3 mg/l pour ne pas affecter la bioluminescence.

Il est intéressant de noter que les inhibiteurs de la chaîne respiratoire ne provoquent pas d'activation de la luminescence. Compte tenu de nos connaissances sur ce mécanisme, on aurait pu penser qu'un blocage au niveau de la chaîne respiratoire permettrait de détourner vers le système luminescent les électrons fournis par les coenzymes réduits NADH et favoriserait ainsi l'émission de photons.

- Salinité

La salinité de l'échantillon peut interférer sur la réponse de Photobacterium phosphoreum (VASSEUR et al., 1984[a]).
Ainsi, la toxicité du cadmium et du zinc est réduite lorsque la concentration en NaCl passe de 1,5 à 4 %, mais ce paramètre est sans effet sur la toxicité du benzène et du pentachlorophénol. Les ions Na^+ et Cl^- sont tous deux responsables de la diminution de nocivité des métaux (VASSEUR et al., 1986).

- Dureté

Le calcium, d'une part stimule la bioluminescence, et d'autre part diminue la toxicité des métaux, cadmium, zinc, et des substances organiques, comme le benzène et le pentachlorophénol (VASSEUR et al., 1986).
Les auteurs remarquent que dans les bioessais, la toxicité des métaux est souvent inversement corrélée à la dureté du milieu et ils émettent l'hypothèse d'une compétition entre Ca^{++} et les cations métalliques.

- pH et solutions tampons

La société Beckman préconise d'effectuer les mesures à un pH voisin de 6,7. Généralement, un pH compris entre 5,5 et 8,5 n'interfère pas directement sur la réponse de Photobacterium phosphoreum.

VASSEUR et al. (1986) soulignent que les pH alcalins favorisent les formes hydroxydes des métaux qui sont souvent moins toxiques, vraisemblablement par suite d'une plus faible solubilité et donc d'une plus faible disponibilité. Et les auteurs préconisent d'ajuster si nécessaire le pH à 6,5 avec HCl ou NaOH, dans une optique de standardisation des essais.

QURESHI et al. (1984) s'opposent à l'ajustement du pH et conseillent de tester les échantillons tels quels, afin de préserver l'intégrité et la stabilité du milieu. Ils ont montré que l'ajustement à pH 6,7 avec NaOH de solutions de cuivre provoque la formation de précipités.

VASSEUR et al. (1986) et QURESHI et al. (1984) s'accordent à reconnaitre que les solutions tampons ne sont pas toutes sans effet sur les résultats des tests. Ces dernières agissent soit directement sur la bioluminescence en l'inhibant (tampon acétate), soit indirectement en complexant les toxiques (diminution de la toxicité de Zn^{++} et de Cd^{++} par les tampons citrates et phosphates à pH acide).

Compte tenu de l'état actuel de nos connaissances, l'utilisation de solutions tampons dans le milieu réactionnel du test Microtox ne semble pas appropriée.

- En conclusion

L'ensemble de ces travaux démontrent l'importance des paramètres physico-chimiques du milieu, notamment dans l'évaluation de la toxicité d'effluents complexes où l'interaction de nombreuses composantes peut masquer ou au contraire accentuer les phénomènes toxiques.

En tout état état de cause, il paraît nécessaire dans le cas d'échantillons complexes de contrôler l'oxygène, le pH, la salinité, la dureté, et de réaliser les essais en tenant compte des caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon, soit en utilisant un témoin de même composition, soit en ajustant les différents facteurs aux valeurs utilisées habituellement.

3.1.5. Répétabilité

La répétabilité du test Microtox a été étudiée par de nombreux auteurs et le tableau 2 regroupe l'ensemble de ces travaux.

BULICH et al. (1981) et la société Beckman ont choisi de travailler avec une seule substance testée sur un très grand nombre d'essais. Pour le laurylsulfate de sodium, le coefficient de variation ainsi obtenu est de 18,2 %.

D'autre part, de nombreuses publications mentionnent la variabilité des résultats lors de screening sur des substances chimiques pures organiques et minérales (BAZIN et al., sous presse ; CURTIS et al., 1982 ; FERARD et al., 1983 ; QURESHI et al., 1984 ; ROBRA, 1979 ; VASSEUR et al., 1986). Les coefficients de variation fluctuent entre 1 et 37 %, avec une majorité de valeurs comprises entre 15 et 20 %.

Tableau 2 : Données bibliographiques concernant la répétabilité du bioessai Microtox.

Substance testée	Nombre de répétitions	Conditions de l'essai : température (θ°C) et durée d'exposition (t. en min.)	Coefficient de variation CV(%) ou CI_{50} (mg/l)	Références
Lauryl sulfate de sodium	81	θ = 15°C t = 5 min.	18,2 %	BULICH et al., 1981
Pentachlorophenate de Na	30	θ = 15°C t = 15 min.	$0,28 < CI_{50} < 0,43$	BECKMAN cité par DUTKA et KWAN, 1981
Substances organiques pures	$\geqslant 2$	θ = 15°C t = 5 min.	$1 \leqslant CV \leqslant 23$ $\overline{CV}$ = 10 %	CURTIS et al., 1982
" " "	$\geqslant 3$	θ = 15°C t = 10 min.	$5 < CV < 36$	BAZIN et al., (sous presse)
" " "	$\geqslant 3$	θ = 15°C t = 5 min.	$6,2 < CV < 28,8$	FERARD et al., 1983
" " "	$\geqslant 6$	θ = 15°C t = 15 min.	$4,9 < CV < 15$	ROBRA, 1979
" " "	3	θ = 15 ou 20°C t = 10 min.	$15 < CV < 37$	VASSEUR et al., 1986
Substances minérales pures	$\geqslant 3$	θ = 15°C t = 10 min	$3,4 < CV < 26$	FERARD et al., 1983
" " "	2	θ = 15°C t = 15 min.	$3 < CV < 15$	QURESHI et al., 1984
" " "	$\geqslant 6$	θ = 15°C t = 30 min.	$2,8 < CV < 8,3$	ROBRA, 1979
" " "	3	θ = 20°C t = 10 min.	$17,5 < CV < 27,5$	VASSEUR et al., 1986
Effluents complexes	$\geqslant 3$	θ = 15°C t = 10 min.	$1,5 < CV < 44,7$	FERARD et al., 1983
" "	3	θ = 15°C t = 10 min.	$3 < CV < 21$	VASSEUR et al., 1984c
" "	3	θ = 15°C t = 10 min.	$\overline{CV}$ = 27,6 %	VASSEUR et al., 1984b

Enfin, les études sur des effluents complexes (FERARD et al., 1983 ; VASSEUR et al., 1984b, 1984c) permettent également de juger de la répétabilité du test Microtox, caractérisée par des coefficients de variation compris entre 1,5 et 45 %

L'ensemble de ces travaux permet de conclure à une répétabilité acceptable du bioessai Microtox.

De plus, il convient de préciser que ces résultats peuvent être quelque peu pessimistes quant aux performances réelles du test. GREENE et al. (1985) ont en effet démontré que l'augmentation de la période d'incubation de 5 à 30 min. dans le cas du cuivre, conduisait à une plus grande sensibilité, mais aussi à une meilleure répétabilité de l'essai, (Tableau 3).

Tableau 3 : Influence de la durée d'exposition sur la répétabilité du test Microtox (θ = 15°C), d'après GREENE et al., 1985.

Exposition (min.)	CI_{50}-Cu^{++} (mg/l)	Coefficient de variation (%)
5	1,21	68
15	-	46
30	0,23	26

Or, en ce qui concerne les travaux présentés dans le tableau 2, les conditions expérimentales qui assurent la variabilité minimum des résultats ne sont pas toujours recherchées.

3.1.6. Sensibilité du test Microtox et comparaison avec les autres bioessais

Afin de situer le test Microtox par rapport aux autres tests de toxicité, des études comparatives ont été réalisées notamment avec les tests Daphnies et Poissons, qui sont les 2 bioessais les plus employés dans le contrôle de la pollution aquatique.

Le tableau 4 regroupe les principaux travaux effectués sur des milieux complexes, effluents ou lixiviats. La comparaison apparait en terme de sensibilité aux toxiques et de concordance, la concordance étant caractérisée par le pourcentage d'échantillons testés qui donnent le même type de réponse (toxique ou non toxique) avec les bioessais étudiés.

Tableau 4 : Sensibilité comparée des tests Microtox, Daphnies et Poissons.

Echantillon testé	Bioessais	Concordance[a] (%)	Sensibilité[b]	Références
100 effluents industriels et urbains	Microtox-Poissons	76*	≃	PELTIER et WEBER, 1980
	Microtox-Daphnies	63*	-	
257 effluents industriels et urbains	Microtox-Poissons	86*	≃	BULICH, 1982
	Microtox-Daphnies	73*	-	
Extraits aqueux de déchets solides	Microtox-Poissons	84**	≃	BULICH, 1984
39 effluents industriels (dérivés organiques)	Microtox-Daphnies	92***	≃	VASSEUR et al., 1984[c]
Lixiviats (pesticides et métaux)	Microtox-Daphnies	91****	-	CALLEJA et al., 1986
38 effluents (surtout dérivés organiques)	Microtox-Daphnies	65****	+	GRANGE et PECHEUX, 1984

(a) Concordance : % d'échantillons qui donne le même type de réponse, toxique ou non toxique, avec les tests comparés.

L'échantillon est considéré comme toxique si :

* Une CI_{50} est déterminée

** $CI_{50} \leqslant$ 780 mg/l

*** $CI_{50} \leqslant$ 45 % de dilution de l'échantillon

**** $CI_{50} \leqslant$ 50 % de dilution de l'échantillon

(b) Sensibilité : + Le test Microtox est le plus sensible

≃ Les deux tests ont la même sensibilité

- Le test Microtox est le moins sensible

Pour les tests Microtox et Poissons, la concordance est élevée et se situe autour de 80 % de réponses identiques (PELTIER et WEBER, 1980 ; BULICH, 1982, 1984). La sensibilité de ces deux tests est équivalente, et la probabilité de détecter la toxicité d'un effluent avec le test Microtox est proportionnelle à la toxicité de cet effluent à l'égard du test Poisson.

Les études comparatives entre les tests Microtox et Daphnies montrent également un taux élevé de concordance, puisque le pourcentage de réponses identiques fluctuent entre 63 et 92 % selon les auteurs (PELTIER et WEBER, 1980 ; BULICH, 1982 ; VASSEUR et al., 1984 ; CALLEJA et al., 1986 ; GRANGE et PECHEUX, 1984). Et le taux de concordance entre ces 2 bioessais est d'autant plus important que la toxicité des échantillons est plus marquée vis à vis du test Daphnies.

En ce qui concerne la sensibilité spécifique des essais Microtox et Daphnies, elle est fonction de la composition chimique des échantillons testés (VASSEUR et al., 1984[c]).

D'une façon générale, il semblerait que les tests Daphnies et Microtox présentent des réponses similaires, en terme de sensibilité, pour des rejets de nature organique, alors que dans le cas d'échantillons riches en toxiques minéraux, le test Daphnie serait plus sensible (QURESHI et al., 1982 ; FERARD et al., 1983).

Il convient cependant de nuancer quelque peu ces conclusions car les essais Microtox sur les toxiques minéraux ne sont généralement pas effectués dans les conditions optimales de sensibilité. En effet, pour les travaux présentés dans le tableau 4, les durées d'exposition n'ont pas été poursuivies au delà de 5 à 10 minutes. La sensibilité du bioessai Microtox à l'égard des toxiques minéraux est donc probablement sous-estimée.

De nombreux auteurs ont également recherché l'existence de corrélations directes entre les tests Microtox-Poissons, Microtox-Daphnies, Microtox-Algues pour tenter de prédire les concentrations inhibitrices à 50 % ou les concentrations létales à 50 % (BULICH et al., 1981 ; CHANG et al., 1981 ; CURTIS et al., 1982 ; DE ZWART et SLOOF, 1983 ; RIBO et KAISER, 1983). Précisons que ce type de corrélation n'est le plus souvent établi que sur un petit nombre de substances chimiques voisines, et il ne parait pas raisonnable de vouloir déduire par exemple la CL_{50} -poissons des résultats obtenus sur Microtox. En effet, les réactifs biologiques appartiennent à des niveaux de complexité différents, et présentent des sensibilités spécifiques aux polluants.

Les études comparatives entre tests de toxicité bactériens ont été conduites par DUTKA et KWAN (1981, 1983), et elles révèlent le test Microtox comme le bioessai le plus sensible comparativement aux autres tests bactériens mesurant la mobilité, la consommation d'oxygène, l'activité déshydrogénasique ou la croissance. Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par GREENE et al. (1985) et COLEMAN et QURESHY (1985).

Signalons enfin que lors de travaux sur des substances chimiques pures, le test Microtox s'est révélé insensible aux insecticides organochlorés et à la plupart des organophosphorés, ainsi qu'aux herbicides, phytohormones, dérivés des urées et triazines (BAZIN et al., sous presse ; MILLER et al., 1985). Par contre, les pesticides de la classe des carbamates et des dithiocarbamates ont montré une toxicité marquée vis à vis de Photobacterium phosphoreum (RETEUNA et al., 1987). GRANGE et PECHEUX (1984) mentionnent une faible sensibilité aux cyanures et au chrome du test Microtox, et à l'opposé une forte toxicité des détergents.

De l'ensemble de ces travaux, on peut en conclure que le test Microtox est aussi sensible voire plus sensible que le test Daphnie aux échantillons de nature organique, exception faite de certains pesticides, mais moins sensible que ce dernier aux toxiques minéraux. Les tests Microtox et Poissons révèlent le plus souvent des résultats très proches. Quant aux autres tests bactériens, leur sensibilité aux toxiques est nettement inférieure à celle du test Microtox.

3.1.7. Applications du test Microtox

Les applications envisagées pour le test Microtox sont variées et peuvent concerner l'évaluation de la toxicité de substances chimiques pures, d'effluents et de lixiviats, le contrôle des eaux en entrée de station d'épuration et la détection de pollutions dans les milieux aquatiques.

- Les substances chimiques

La recherche systématique de la toxicité de substances chimiques pures a été l'une des premières applications du test Microtox, visant à définir les performances de ce bioessai.

- Les effluents

Ce test bactérien a été appliqué à de nombreux effluents complexes afin d'en déterminer la toxicité éventuelle (DELISTRATY, 1984 ; LEBSAK et al., 1981 ; PEAKE et LEAN, 1982 ; VASSEUR et al., 1984[c]).

De nombreux auteurs ont souligné que du fait de sa simplicité et de sa rapidité, le test Microtox est particulièrement adapté au screening de toxicité à grande échelle des effluents industriels (BULICH, 1982 ; DUTKA et KWAN, 1981 ; PELTIER et WEBER, 1980), et à l'heure actuelle il constitue un outil de contrôle de la pollution des rejets largement utilisé par l'Agence de Protection de l'Environnement (EPA) aux USA.

GRANGE et PECHEUX (1984) s'opposent cependant à son emploi dans le cas des usines de traitement de surface car Photobacterium phosphoreum montre une faible sensibilité au chrome.

- Les stations d'épuration

De nombreux auteurs ont également envisagé d'employer le test Microtox comme système d'alerte en entrée de station d'épuration biologique, afin d'éviter les chocs toxiques sur les microorganismes (BULICH, 1982 ; PELTIER et WEBER, 1980).

La société Beckman propose d'établir sur une période suffisamment longue la toxicité moyenne des eaux usées entrant dans la station, et d'utiliser cette valeur qui correspond à un niveau normal de pollution comme point de comparaison permettant de détecter les eaux susceptibles de perturber l'épuration biologique. Cette application est cependant contestée par KING (1984) et GRANGE et PECHEUX (1984) qui trouvent le test Microtox beaucoup trop sensible à la pollution organique, en particulier aux détergents ; cette pollution de fond pourrait masquer les apports d'autres toxiques auxquels le test serait moins sensible.

L'utilisation de ce bioessai dans l'évaluation des risques au niveau des stations d'épuration reste donc à vérifier.

- Les eaux de surface, les eaux souterraines, le milieu marin

Le test Microtox est aussi proposé en tant que système de détection de pollutions dans les eaux de surface (GRANGE et PECHEUX, 1984), dans les eaux souterraines (Microtox Application Notes, 105, 1982) et dans le milieu marin (VASSEUR et al., 1984[a]). Afin de répondre à ce type d'application, l'automatisation des mesures a été entreprise par la société OTV-CGE (Paris).

- Les lixiviats

Actuellement, il n'existe pas de procédures normalisées qui permettent une classification des déchets solides en fonction de leur toxicité, et divers travaux sur les lixiviats ont montré que le test Microtox pouvait être envisagé dans le cadre d'une politique de gestion des déchets d'origine industrielle ou domestique (CALLEJA et al., 1986 ; Microtox Application Notes, 105, 1982).

- Conclusions

Les possibilités d'utilisation du test Microtox sont nombreuses et variées, mais il existe encore des domaines d'application qui nécessitent de plus amples recherches afin de mieux évaluer les performances de ce bioessai.

La simplicité de ce test quasiment miniaturisé (1 ml de solution requis pour chaque mesure de toxicité) et sa rapidité permettent de réaliser des plans expérimentaux importants avec la prise en compte de plusieurs facteurs capables d'interagir sur la toxicité (BOIS et al., 1986).

VASSEUR et al. (1988) a ainsi mis en évidence des phénomènes de synergie extrêmement importants entre le cuivre et des dithiocarbamates, zinèbe et manèbe, pour des concentrations aussi faibles que celles rencontrées dans les milieux naturels.

Ces résultats dénoncent la politique de protection de l'environnement basée sur des concentrations limites établies avec des toxiques isolés, alors que même de très faibles quantités peuvent entraîner par des phénomènes de synergie des effets toxiques puissants.

L'existence de bioessais simples et rapides permettant l'étude de ces interactions, contribuera certainement à une meilleure évaluation des risques des substances chimiques vis à vis de l'environnement.

3.2. INHIBITION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE

3.2.1. Principe

Le principe du test consiste à évaluer la diminution de la consommation d'oxygène de microorganismes sous l'action de substances toxiques ajoutées au milieu réactionnel, par comparaison à un témoin réalisé simultanément.

3.2.2. Les mesures respirométriques

La respiration aérobie s'accompagne de la consommation d'oxygène et de la libération de CO_2 et d'eau.

Les premiers appareils permettant d'étudier la respiration avaient pour principe de mesurer dans une enceinte rigoureusement close, les variations subies par la phase gazeuse en contact avec le milieu réactionnel.

L'assimilation d'oxygène par les microorganismes (le CO_2 rejeté étant capté par de la potasse), peut être mis en évidence par différents procédés :

- Dans les respiromètres à pression constante, le volume gazeux est limité par un volume de liquide, phase gazeuse et phase liquide en équilibre. Lorsque la pression partielle en oxygène diminue, la colonne de liquide se déplace, et sa migration mesure indirectement l'oxygène consommé.

- Dans les respiromètres à volume constant, le volume de la phase gazeuse n'est pas modifié et l'on mesure la diminution de pression, témoin de la consommation d'oxygène par le milieu biologique.

Certains respiromètres maintiennent la pression partielle d'oxygène dans la phase gazeuse à sa valeur initiale, grâce à un apport mesuré d'oxygène provenant de réserves ou de l'électrolyse de l'eau.

Parmi les nombreux respiromètres, nous citerons à titre d'exemple le respiromètre de Warburg, (Figure 7).

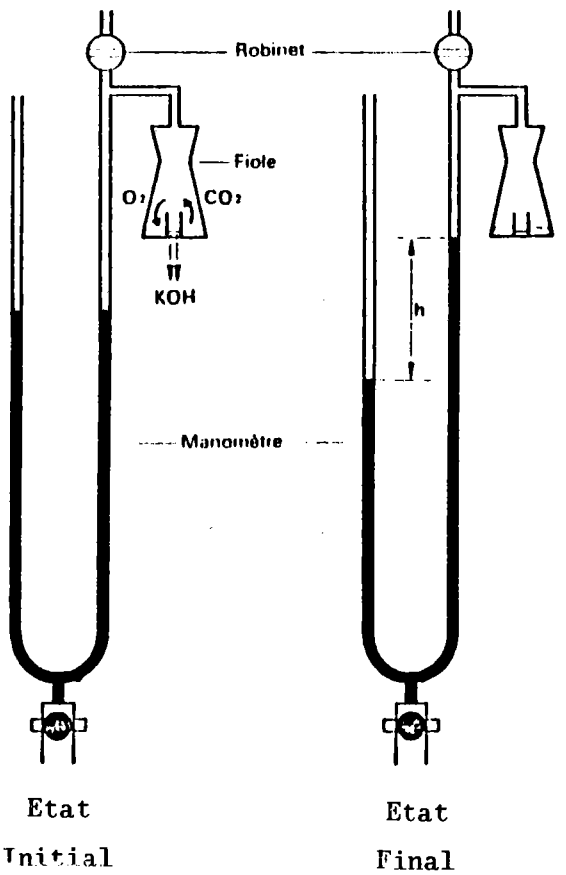


Figure 7 : Le Respiromètre de Warburg (dans LECLERC et al., 1983).

Par la suite, les techniques électrochimiques ont permis de mesurer directement la concentration en oxygène dissous dans le milieu réactionnel au moyen d'une électrode spécifique. Cette méthode est évidemment beaucoup plus simple et rapide que les mesures sur les échanges gazeux, mais on ne dose l'oxygène que sur une gamme restreinte de concentrations liées à sa solubilité dans l'eau.

3.2.3. La consommation d'oxygène des boues activées

La consommation d'oxygène des boues activées a fait l'objet de nombreuses recherches. Avant de passer en revue ces travaux, il convient de faire un bref rappel sur les boues activées, et en particulier sur leur nature et sur leur rôle.

- Les boues activées

Le terme de boues activées est un terme commercial donné à l'un des procédés biologiques d'épuration des eaux urbaines.

Les boues activées sont un véritable microcosme où il est admis que les bactéries jouent le rôle principal. De nombreuses espèces bactériennes participent à la formation du floc, mais ce sont les Aeromonas, les Enterobacteriaceae et surtout les aérobies strictes comme Pseudomonas, Flavobacterium et Cytophaga qui sont les plus fréquentes (LECLERC et al., 1977).
Les protozoaires se développent aux dépends des bactéries. On rencontre des amibes, des ciliés libres (Paramecium, Colpidium) ou pédonculés et fixés (Vorticelles, Opercularia). Les métazoaires (Rotifères, Nématodes) peuvent également être présents au sein des boues activées (DEGREMONT, 1978).
Les champignons (Geotrichum, Sporotrichum), ainsi que les bactéries filamenteuses comme Sphaerotilus natans prolifèrent dans certaines conditions, et perturbent le phénomène de floculation.

L'épuration des eaux usées résulte d'une part de la biodégradation par les microorganismes des matières organiques en solution, ce processus étant favorisé par l'apport continu d'oxygène qui stimule la croissance, et d'autre part du phénomène de floculation qui élimine une partie des matières organiques en solution et en suspension.

- L'activité respiratoire des boues activées

Les mesures de consommation d'oxygène des boues activées posent le problème de définir la part que prennent les différents organismes dans l'activité respiratoire. Il semblerait que la consommation d'oxygène en présence de substrat soit principalement le fait des bactéries, les autres microorganismes n'intervenant pas significativement (MONTGOMERY, 1967). Et parmi les bactéries hétérotrophes, ce sont surtout les aérobies strictes et aérobies-anaérobies facultatives (utilisant leur métabolisme respiratoire) qui interviennent de façon prépondérante, à condition toutefois que le milieu ne soit pas limitant en oxygène.

La plupart des travaux sur la respiration portent évidemment sur les boues activées considérées dans leur globalité.

LAMB et al. (1964) ont étudié les relations respiration - substrat - microorganismes. Si le milieu réactionnel ne contient pas de substrat, on parle de respiration endogène. L'addition de substrat s'accompagne d'une augmentation de l'oxygène assimilé, lié à l'oxydation des substances biodégradables, et la respiration est dite exogène.

Le suivi des cinétiques de diminution de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel permet de calculer la vitesse de consommation de l'oxygène par les boues activées. Cette vitesse mesurée pour différentes concentrations en substrat respecte l'équation de Michaelis-Menten (Figure 8). Ainsi, pour de faibles teneurs en substrat, la vitesse augmente proportionnellement à la concentration, puis lorsque le substrat n'est plus limitant, la vitesse atteint sa valeur maximale "Vmax".

La vitesse de consommation de l'oxygène dissous est directement proportionnelle à la concentration en boues activées (Figure 9). Et il en résulte que le taux de consommation spécifique de l'oxygène, exprimé en mg d'O_2 par heure et par gramme de matière en suspension (MES) est une constante caractéristique de la boue activée et du substrat non limitant utilisé. En réalité, ce taux fluctue journellement pour une boue activée donnée ; en effet, dans les stations d'épuration, la variabilité de nombreux paramètres comme par exemple le débit et la charge organique des eaux usées, s'oppose au maintien des microorganismes dans un état stable.

La vitesse de consommation spécifique de l'oxygène constitue un bon indicateur de l'activité métabolique des boues activées. Et dans les tests de toxicité, l'effet inhibiteur des polluants est le plus souvent mesuré par la diminution de cette vitesse.

3.2.4. Les tests d'inhibition de la consommation d'oxygène

Les tests d'inhibition de la consommation d'oxygène sont réalisés suivant des modalités différentes selon les auteurs. Mais dans tous les cas, on retrouve un milieu nutritif contenant des substances biodégradables qui favorisent la consommation d'oxygène par les microorganismes, et l'on mesure l'effet inhibiteur des toxiques sur les processus respiratoires.

Les essais peuvent être conduits sur une période assez longue (5 à 15 jours) lorsque la charge en microorganismes est faible, ou bien sur une période très courte de quelques minutes à quelques heures.

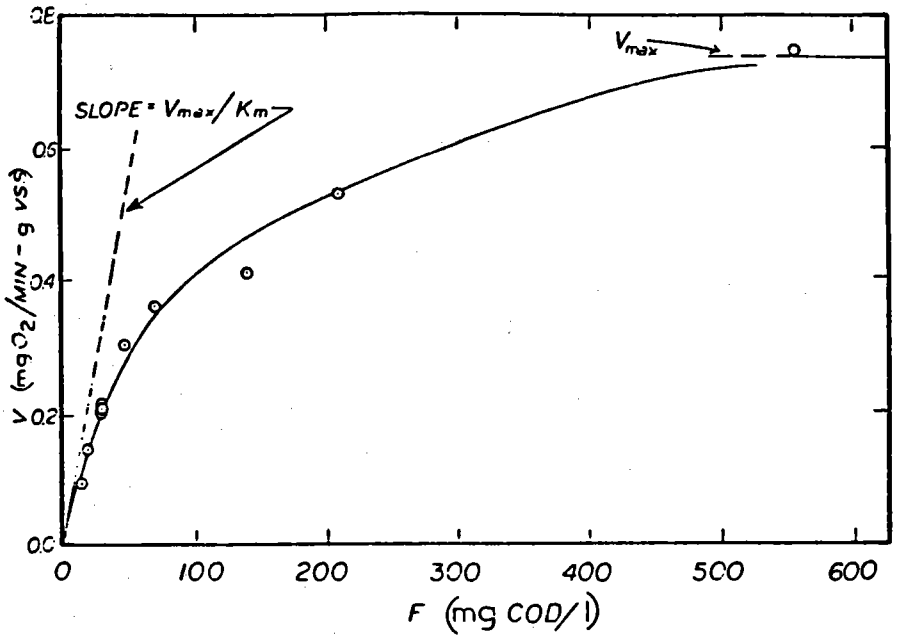


Figure 8 : Vitesse de consommation spécifique de l'oxygène dissous par des boues activées en fonction de la concentration en substrat (NEUFELD et HERMANN, 1975).

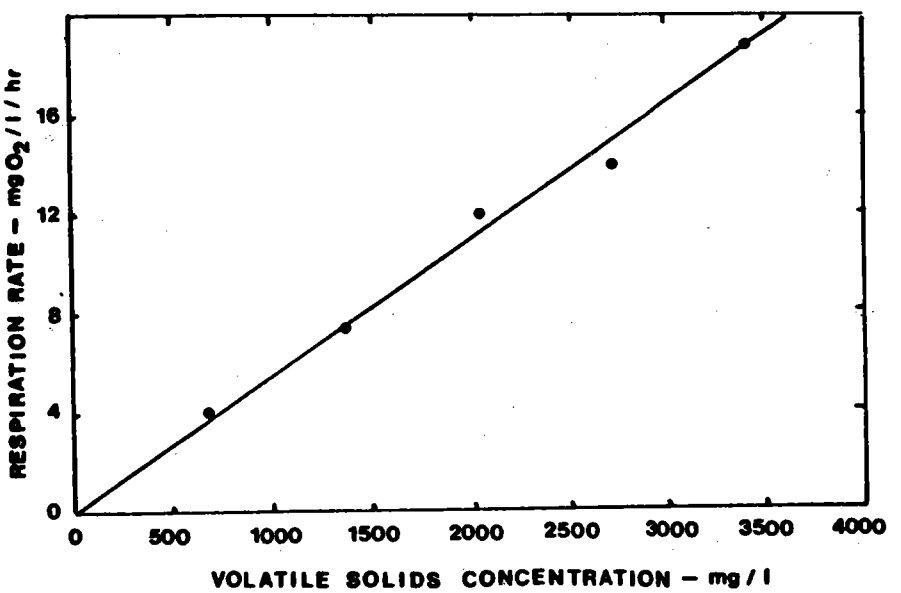


Figure 9 : Vitesse de consommation de l'oxygène dissous en fonction de la concentration en boues activées (LAMB et al., 1964).

Dans le premier cas, les mesures sont ponctuelles. MOWAT (1976) a utilisé le "BOD" test (Biochemical Oxygen Demand) qui est l'équivalent du test français "DBO" (Demande Biochimique en Oxygène, Norme AFNOR T90-103) d'une durée de 5 ou 15 jours, pour évaluer la toxicité de polluants métalliques. Ce test est habituellement employé pour déterminer la charge organique biodégradable d'un échantillon. Mais il permet également de déceler la présence de toxiques qui inhibent la consommation d'oxygène.
Les auteurs soulignent qu'une période d'incubation de 15 jours diminue la sensibilité du test et ils émettent l'hypothèse d'un phénomène d'adaptation des microorganismes aux toxiques.

Lorsque l'oxygène consommé est mesuré sur une période plus courte, c'est la toxicité immédiate du produit qui est évaluée. On évite ainsi des modifications importantes de la biomasse bactérienne et des modifications d'équilibre entre les différents groupes de microorganismes, suite à des phénomènes d'adaptation.
L'intérêt de ces essais à court terme réside également dans la possibilité de réaliser des cinétiques, plus riches en information que des mesures ponctuelles. Différentes modalités peuvent être suivies dans le cadre de ces bioessais :

- Evaluation de l'inhibition par les toxiques du taux d'assimilation d'oxygène des microorganismes, qui est calculé à partir des cinétiques de diminution de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel durant une période déterminée et en présence de différentes concentrations de la substance testée (THERIEN et al., 1984).

- Même principe de suivi des cinétiques de diminution de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel en présence du produit testé, mais la toxicité est évaluée par la mesure du temps nécessaire pour obtenir 50 % de la concentration initiale en oxygène (BAUER et al., 1981 ; GREENE et al., 1985 ; MILLER et al., 1985).

- Le protocole expérimental le plus souvent adopté consiste à exposer les boues activées au toxique en présence d'un substrat non limitant et d'oxygène durant 3 heures, puis à suivre les cinétiques de diminution de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel pendant une courte période d'une dizaine de minutes. Et l'inhibition de la vitesse d'assimilation d'oxygène des microorganismes permet d'évaluer la toxicité de la substance testée (BROWN et al., 1981 ; DUTKA et al., 1983 ; DUTKA et KWAN, 1984 ; KING, 1984 ; KING et PAINTER, 1985, 1986 ; YOSHIOKA et al., 1986).
  Cette méthode a fait l'objet d'une normalisation par l'ISO (Norme 8192 partie B), par l'OCDE (Norme 209), et elle est actuellement à l'étude à l' AFNOR (T95 A).

Les tests de toxicité basés sur les mesures de consommation d'oxygène sont le plus souvent réalisés sur des boues activées. Mais, nous signalons également quelques travaux sur souches pures, notamment sur Azotobacter vinelandii, une bactérie fixatrice d'azote (TAM et TREVORS, 1981), et sur Aerobacter sp. (PARKER, 1982).

3.2.5. Influence des paramètres physico-chimiques

Les résultats des tests peuvent être influencés par de nombreux paramètres tels que les caractéristiques physico-chimiques du milieu réactionnel, son mode d'aération, ou encore le potentiel redox de l'échantillon.

- Conditions d'aération du milieu

YOSHIOKA et al. (1986) ont montré que la durée de la période d'aération du milieu réactionnel (entre 30 min. et 3 heures), ainsi que la puissance d'aération (entre 0,5 et 2,5 l/min.), avaient peu d'effet sur la toxicité du 3-5 dichlorophénol déterminée selon la norme OCDE.

- Milieu réactionnel

Le milieu réactionnel par ses caractéristiques physico-chimiques (pH, composition chimique du substrat...) peut interférer sur la réponse des bactéries, notamment en agissant sur la spéciation des toxiques. MOWAT (1976) signale que l'eau de dilution du test "BOD" provoque des phénomènes de précipitation et de complexation, par exemple précipitation de l'argent par les chlorures, du plomb par les phosphates, et du chrome à pH 7,2.

- Interférences liées à l'échantillon

BEAUBIEN (1982) mentionne qu'une brusque diminution de la concentration en oxygène dissous n'est pas forcément la conséquence d'une forte activité respiratoire des bactéries, mais peut être liée à des phénomènes physico-chimiques. Les toxiques à fort pouvoir oxydo-réducteur modifient la concentration en oxygène indépendemment de tout processus biologique (PATTERSON et al., 1970).

Enfin GREENE et al. (1985) abordent le problème de l'interférence directe des toxiques sur les sondes à oxygène dont les membranes peuvent être altérées par les détergents, les huiles, les graisses, le méthanol et l'acétone.

3.2.6. Répétabilité

KING et PAINTER (1986) ont présenté des travaux intéressants sur la répétabilité du test "Inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées" réalisé selon la norme ISO 8192, partie B principalement.
Pour un échantillon unique de boues activées, les coefficients de variation fluctuent en moyenne autour de 9 %, ce qui est satisfaisant.
Par contre, la variabilité des résultats pour des boues activées prélevées dans une même station d'épuration ou issues de diverses stations, se traduit par des coefficients de variation élevés, compris entre 24 et 76 % selon les toxiques testés.
La faible répétabilité des résultats est attribuée par les auteurs à la nature variable des boues activées, aussi bien au niveau de la composition et de l'état physiologique des microorganismes, qu'au niveau de la fraction non vivante, matières organiques ou minérales solubles ou en suspension, qui peuvent interagir avec les toxiques testés.

Les méthodes proposées dans les normes ISO, OCDE ou AFNOR préconisent d'ailleurs d'exprimer la toxicité non pas par des valeurs précises, mais en terme d'ordre de grandeur de la CI_{50} (par exemple CI_{50} comprise entre 10 et 100 mg/l).

YOSHIOKA et al., (1986) estiment cependant que la méthode proposée par l'OCDE présente une bonne répétabilité ; ces auteurs ont obtenu pour le 3-5 dichlorophénol, une CI_{50} comprise entre 20 et 25 mg/l avec des boues activées de différentes origines. Mais dans la proposition OCDE, les boues activées sont lavées 3 fois puis remises en suspension dans une solution, et ce traitement supprime la variabilité liée au milieu, ce qui assure vraisemblablement une meilleure répétabilité du test.

Dans les travaux de BROWN et al. (1981), les boues activées sont également lavées, puis ajustées à une concentration donnée et alimentées par addition, 24 h avant le test, d'un milieu nutritif. Les résultats obtenus avec le 3-5 dichlorophénol par 5 laboratoires conduisent à un coefficient de variation acceptable de 28 %.

Il conviendra donc dans un but d'amélioration de la répétabilité du test, de prélever les boues activées dans un type précis de station d'épuration, et de standardiser au mieux le réactif biologique, notamment en lavant les boues, ce qui permet d'éliminer les apports exogènes, et en ajustant leur concentration dans un milieu de composition définie.

3.2.7. Sensibilité du test Inhibition de la consommation d'oxygène et comparaison avec les autres bioessais

La concentration et l'état physiologique des microorganismes, ainsi que la composition du milieu nutritif, peuvent interférer sur la sensibilité des tests d'inhibition de la consommation d'oxygène des boues activées. Ainsi, l'augmentation des matières en suspension (MES), et de la charge organique s'accompagne d'une diminution des effets inhibiteurs des métaux (MOWAT, 1976). La toxicité du 3-5 dichlorophénol est également moindre pour des concentration en boues activées qui s'élèvent de 3 à 5 g/l en MES (YOSHIOKA et al., 1986). Enfin, d'après KING et PAINTER (1986), les boues qui respirent activement sont plus sensibles à l'action des toxiques que les boues en phase endogène.

Compte tenu de l'importance de ces facteurs, nous signalons que dans les études comparatives, le protocole généralement suivi par la plupart des auteurs est celui de la norme ISO 8192, avec des boues activées de station urbaine à la concentration de 1,5 g/l en matière sèche et un substrat constitué d'un effluent synthétique.

La sensibilité du test consommation d'oxygène de boues activées apparait comme étant inférieure à celle du test Microtox (KING, 1984) et du test Spirillum volutans, et équivalente à celle du test activité deshydrogénasique (DUTKA et al., 1983).
D'autre part, GREENE et al. (1985) obtiennent des CI_{50} plus faibles avec le test consommation d'oxygène mais réalisé sur Escherichia coli, qu'avec le test activité deshydrogénasique sur boues activées.
Enfin, les travaux de MILLER et al. (1985) révèlent que les insecticides organochlorés et les phytohormones n'ont aucun effet toxique sur la respiration des boues activées.

En conclusion, nous retiendrons que le test "inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées" est généralement moins sensible que les tests Microtox, Daphnies et Poissons. Mais, il convient de rester prudent vis à vis de ces résultats, car les études comparatives sont peu nombreuses et portent sur un nombre limité de substances chimiques.

Quant à la comparaison avec les autres tests de toxicité bactériens (activité deshydrogénasique, croissance, mobilité de Spirillum volutans...) les données bibliographiques restent insuffisantes pour établir une véritable classification.

3.2.8. Applications du test Inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées

Dans une étude menée conjointement sur la toxicité du 3-5 dichlorophénol évaluée au moyen de différents tests de toxicité bactériens, et sur le fonctionnement d'un pilote de boues activées exposé à ce toxique, BROECKER et ZAHN (1977) ont mis en évidence l'existence d'une corrélation entre les résultats du test Warburg d'une durée de 20 heures, du test consommation d'oxygène mesurée sur 2 heures, et les concentrations en 3-5 dichlorophénol qui perturbent les procédés de biodégradation au sein du pilote (mesure de la DCO entrée-sortie).

Le test inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées pourrait donc être un bon outil de contrôle des eaux usées en entrée de station d'épuration afin d'éviter les chocs toxiques qui diminuent les rendements de traitement.

Ce point de vue est partagé par KING (1984) qui précise que la sensibilité relativement faible du test Consommation d'oxygène pourrait paradoxalement être un avantage dans le cas des stations d'épuration, permettant de disposer d'un système d'alerte qui ne soit pas trop sensible, évitant ainsi les interventions mal adaptées au risque réellement encouru par les boues activées.

Dans le cadre de cette application, la répétabilité n'est pas un paramètre essentiel puisque les boues utilisées dans le test sont celles qui reçoivent l'effluent. Même si la variabilité des résultats est importante, la marge de sécurité nécessaire pour éviter tout choc toxique permet de pallier à cet inconvénient.

La variabilité des résultats est plus préjudiciable à l'évaluation de la toxicité des substances chimiques. Ce test n'est d'ailleurs préconisé que comme test préliminaire pour le screening de toxicité, suivi de bioessais plus précis (KING et PAINTER, 1986).

YOSHIOKA et al. (1986) portent un jugement beaucoup plus sévère ; ce test ne peut selon eux prétendre à l'évaluation de la toxicité des produits chimiques vis à vis de l'environnement du fait de sa trop faible sensibilité aux polluants.

Les avis divergents portés à l'encontre du test consommation d'oxygène de boues activées incitent à effectuer des travaux complémentaires pour mieux définir les domaines d'application de ce bioessai.

3.3. INHIBITION DE LA MINERALISATION DU GLUCOSE

3.3.1. Assimilation hétérotrophe des bactéries

La matière organique dissoute dans les milieux aquatiques est principalement utilisée par les bactéries hétérotrophes comme substrat.

Les bactéries utilisent la matière organique dissoute dans un double but ; comme matériaux de construction pour bâtir leur propre édifice cellulaire, et comme combustible dont l'oxydation fournit l'énergie nécessaire à leur maintenance, leurs biosynthèses, leurs mouvements...

Parmi le carbone assimilé, une partie demeure donc dans la cellule et un faible pourcentage est rejeté sous forme de produits solubles extracellulaires, tandis que la fraction respirée est émise dans le milieu ambiant sous forme de CO_2, produit ultime du catabolisme du carbone (HERBLAND ET BOIS, 1974).

Dans les eaux naturelles, les bactéries hétérotrophes jouent un rôle primordial dans le cycle de la matière organique. Elles assurent l'épuration des eaux et la remise en circulation des éléments minéraux. Cette minéralisation s'effectue à deux niveaux, par les bactéries directement et indirectement par voie trophique par les consommateurs bactériens, les protozoaires par exemple.

3.3.2. Le potentiel hétérotrophe

- Signification

La mesure de l'assimilation hétérotrophe permet donc de quantifier le rôle joué par les bactéries dans le cycle de la matière. Cette mesure contribue également à l'estimation de la production bactérienne qui est un des critères d'évaluation de l'état de "santé" des écosystèmes.

Les composés organiques dissous présents dans les milieux naturels sont extrêmement variés. Et il est impossible de reproduire en laboratoire les conditions de terrain. C'est pourquoi, une seule substance universellement répandue et facilement biodégradable par la plupart des microorganismes hétérotrophes est choisie comme substrat carboné. Il s'agit le plus souvent du glucose uniformement marqué au carbone 14 ($U\text{-}^{14}C$), mais le glutamate, l'acétate ou le pyruvate sont aussi utilisés.

Cette méthode simplifiée avec une seule substance organique étudiée ne permet pas réellement de mesurer l'assimilation hétérotrophe, mais elle permet d'évaluer le "potentiel hétérotrophe", c'est à dire la capacité métabolique des bactéries à utiliser un substrat particulier.

Les techniques autoradiographiques associées à la mesure du potentiel hétérotrophe ont montré que seule une proportion variable de bactéries sur la population totale assimile le substrat. Ainsi, STANLEY et STALEY (1977) lors de l'étude de l'assimilation d'acétate U-^{14}C par une population de microorganismes de station de lagunage, ont mis en évidence des différences d'activité selon les types morphologiques, et 20 à 25 % des bactéries ne sont pas marquées. Les protozoaires ne semblent pas intervenir dans l'assimilation de l'acétate.

DELATTRE et LECLERC (1980) ont comparé sur 116 échantillons d'eau de mer, la production bactérienne totale estimée en chambre de diffusion, et le potentiel hétérotrophe net (respiration déduite) mesuré sur du glucose U-^{14}C. Une relation hautement significative existe entre les deux mesures ; l'assimilation du carbone à partir du glucose représente 1/50ème de la production bactérienne totale.

D'après ces auteurs, le potentiel hétérotrophe ne peut en aucun cas donner une estimation directe de la biomasse, mais il reflète l'intensité de la production bactérienne et l'intensité de l'épuration des solutés organiques.

- Détermination

L'évaluation du potentiel hétérotrophe d'une population bactérienne consiste à déterminer la vitesse maximale d'assimilation du substrat "Vmax", ainsi que son temps de turn-over "T".

S'inspirant des travaux de PARSONS et STRICKLAND (1962) sur l'eau de mer, WRIGHT et HOBBIE (1965, 1966) ont été les premiers à mesurer le potentiel hétérotrophe des populations de microorganismes d'eau douce.

Un échantillon d'eau est incubé en présence de différentes concentrations d'un substrat carboné radioactif. Après un temps d'incubation donné, les bactéries sont récupérées par filtration et la radioactivité fixée par les microorganismes est mesurée. La vitesse d'assimilation "v" est donnée par l'équation :

$$v = \frac{f \cdot |S|}{t}$$

f = fraction de radioactivité assimilée par les microorganismes
S = concentration en substrat dans le milieu réactionnel (ug/l)
= Sa + Sn, c'est à dire Sa la concentration additionnée et Sn la concentration dans le milieu naturel
t = temps d'incubation (heure).

Le temps d'incubation choisi doit assurer une mesure stable de la vitesse "v" non modifiée par la diminution du substrat dans le milieu lors de l'assimilation.

WRIGTH et HOBBIE ont montré que la vitesse de consommation de faibles concentrations en glucose ou en acétate est une fonction hyperbolique de la concentration en substrat. Elle augmente d'abord rapidement pour atteindre ensuite un maximum correspondant à la saturation en substrat. Ce mode d'assimilation obéit à une cinétique de type Michaelis-Menten (Annexe 1, figure 1).
La linéarisation de cette équation (Annexe 1, figure 2), appliquée aux mesures de la radioactivité incorporée dans les bactéries permet d'obtenir :

$$t/f = \frac{K + |Sn|}{Vmax} + \frac{1}{Vmax} \cdot |Sa|$$

Cette droite (annexe 1, figure 3) nous donne la vitesse maximale d'assimilation du substrat Vmax, qui est l'inverse de la pente, et le temps de turn-over T du substrat naturel Sn qui correspond à $K + |Sn|/Vmax$.

La Vmax et T caractérisent le potentiel hétérotrophe des eaux analysées.

HOBBIE et CRAWFORD (1969) ont amélioré la mesure du potentiel hétérotrophe en dosant le CO_2 radioactif émis par minéralisation du substrat, en plus de la radioactivité incorporée dans la biomasse bactérienne.

L'expérience est réalisée dans un système clos et le CO_2 est capté après acidification. La phényléthylamine sur papier filtre est l'agent absorbant, et la radioactivité comptée sur ce papier correspond au CO_2 libéré.

Les mesures simultanées de la radioactivité provenant du CO_2 et de la radioactivité fixée par les bactéries permettent une meilleure estimation du substrat consommé par les bactéries et conduisent généralement à une valeur plus élevée de la Vmax d'assimilation et à un temps de turn-over plus faible,lors de la détermination du potentiel hétérotrophe (HOBBIE et al., 1968).

- Inhibition

De nombreux auteurs ont évalué les effets inhibiteurs de traitements physiques ou chimiques sur le potentiel hétérotrophe.

DUNSTALL et SCHWARZ (1983) ont étudié les effets de l'élévation de la température et des chocs mécaniques consécutifs au passage dans des centrales hydro-électriques, sur le potentiel hétérotrophe de microorganismes de lac mesuré avec l'acide glutamique U-^{14}C.
L'augmentation de la température et le stress mécanique ont tous deux des effets significatifs mais ils ne présentent pas d'interaction. Le stress mécanique provoque une diminution de 57 % du potentiel hétérotrophe. Et l'assimilation de glutamate est augmentée de 6,4 % pour chaque élévation de 1°C, à condition que la température reste inférieure à 30°C.
Sur le terrain, les effets cumulés de la température et du stress mécanique pourraient accroître la productivité bactérienne.

DELATTRE et LECLERC (1980) ont évalué l'impact des chlorations liées au fonctionnement d'une centrale nucléaire sur la Vmax d'assimilation du glucose marqué en milieu marin. Les mesures ont été réalisées à partir d'une installation en laboratoire servant de modèle.
L'activité hétérotrophe des bactéries est fortement inhibée par la présence de chlore à des concentrations inférieures à 0,015 mg/l. Et les auteurs mentionnent que le potentiel hétérotrophe est une technique sensible pour l'évaluation des pollutions.

FERRONI et al. (1983) ont aussi utilisé cette méthode pour évaluer les effets de stress acide sur des eaux de lac.
Ils ont notamment démontré que sur un lac neutre et bien tamponné, l'acidification simulée (pH égal à 5 et 5,5) entraîne une diminution de la Vmax d'assimilation du glucose et une augmentation du temps de turn-over.

HUET et al. (1980) ont d'ailleurs proposé un test de toxicité basé sur l'inhibition du potentiel hétérotrophe de populations bactériennes de rivière. L'effet inhibiteur de différentes concentrations en toxique sur la vitesse maximale d'assimilation du glucose U-^{14}C est déterminé (Figure 10), ce qui permet de calculer une CI_{50}-Vmax pour chaque toxique testé (Figure 11).
La répétabilité de la méthode pour des prélèvements d'eau de même origine est caractérisée par des coefficients de variation autour de 38 %, et pour des prélèvements issus de différentes rivières, les coefficients de variation s'élèvent à 42, 89, 30,3 et 30,4 % respectivement pour $CuSO_4$, $HgCl_2$, le tétrapropylbenzène sulfonate et le p-nitrophénol. La variabilité des résultats reste donc importante bien que les auteurs aient pris soin d'éviter les rivières polluées, notamment en prélevant les échantillons d'eau dans des stations de charge organique inférieure à 10 mg/l en COT, contenant un nombre limité de germes compris entre 10^4 et 10^5 bactéries par ml.
En ce qui concerne la sensibilité, les CI_{50}-Vmax de quelques toxiques sont relevées dans le tableau 5.

3.3.3. Problèmes posés par la détermination du potentiel hétérotrophe

La mesure du potentiel hétérotrophe pose cependant quelques fois des problèmes. Il arrive en effet que l'équation de Michaelis-Menten ne soit pas observée (DELATTRE et LECLERC, 1980). Et bien que STANLEY et STALEY (1977) aient obtenu une cinétique du type Michaelis-Menten avec une population de station de lagunage et des concentrations en acétate atteignant 30 mg/l, le plus souvent les populations microbiennes prélevées dans des zones à forte concentration en solutés organiques, révèlent des cinétiques de type diffusionnel.

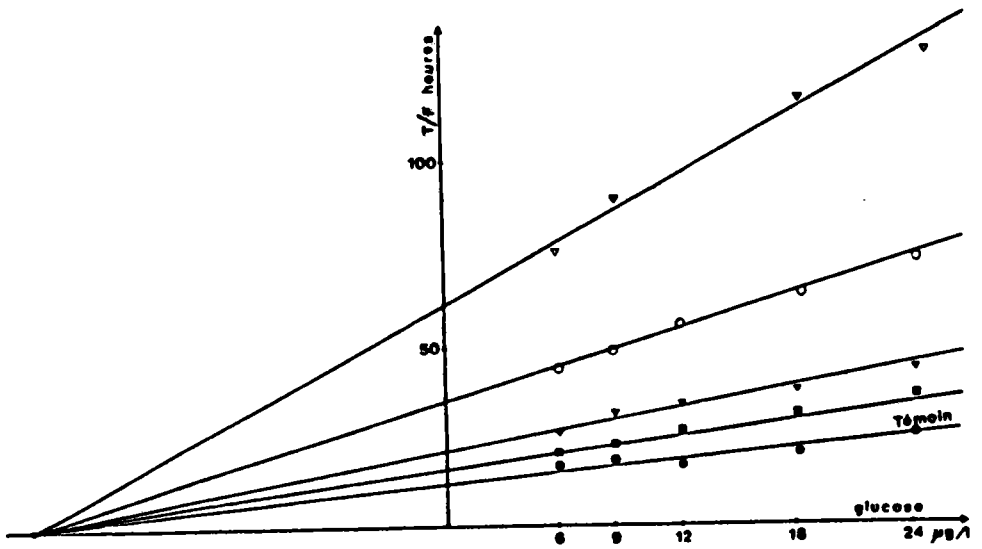


Figure 10 : Effet inhibiteur du p-nitrophénol à ● 40 mg/l, ▼ 60 mg/l, ○ 80 mg/l et ▽ 100 mg/l sur la Vmax d'assimilation du glucose (HUET et al., 1980).

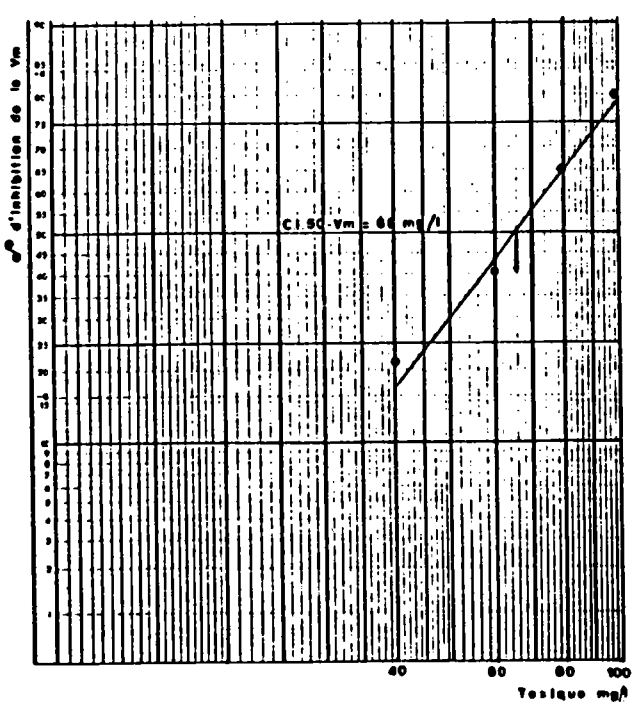


Figure 11 : Détermination de la CI_{50}-Vmax du p-nitrophénol (HUET et al., 1980).

Tableau 5 : Détermination de la CI_{50}-Vmax de quelques produits chimiques (HUET et al., 1980).

TOXIQUE	C.I. 50 - Vmax mg/litre
$HgCl_2$	0,0085
$CuSO_4$	0,05
$NiCl_2$	0,7
Hilamin	0,75
Dobanol	1,25
KCN	1,5
T.P.B.S.	8
$K_2Cr_2O_7$	12
L.A.S.	20
Formol	25
p-nitrophénol	64
Phénol	240
$NaNO_2$	2.800
Acétonitrile	12.000
Alcool éthylique	23.000

WRIGHT et HOBBIE (1965, 1966) en étudiant l'assimilation de glucose et d'acétate sur une gamme étendue de concentrations ont révélé la coexistence de 2 mécanismes d'assimilation.
Pour de faibles concentrations en substrat (<100 µg/l), la cinétique obtenue est de type Michaelis-Menten. Ce mode d'assimilation correspond à un transport actif du substrat, que les auteurs attribuent aux bactéries.
Pour des concentrations en substrat plus fortes (500 µg/l à 5 mg/l), la vitesse d'assimilation augmente proportionnellemnt à la concentration, et la réaction est d'ordre zéro. Cela correspond à un mode de transport diffusionnel, et les algues seraient responsables de ce type de cinétique.
Dans le milieux peu pollués, ce sont donc principalement les bactéries qui consommeraient les substances organiques, et quand la charge organique augmente, les algues interviendraient de façon prédominante.

CAMPBELL et COUTURE (1976) constatent également lors d'une étude sur des eaux de rivière que la diffusion prédomine pour les prélèvements proches des rejets domestiques, alors que l'assimilation par transport actif croît à mesure que l'on s'éloigne de ces points de pollution.

Les valeurs extrêmes de pH et de température dans les milieux aquatiques apparaissent aussi comme peu favorables à l'obtention des cinétiques de Michaelis-Menten. Ainsi, FERRONI et al. (1983) n'ont pu observer les cinétiques de type Michaelis-Menten pour des lacs naturellement très acides en conditions hivernales, que les mesures soient réalisées au pH in situ ou à des pH expérimentaux plus élevés. L'étude de l'assimilation du glucose en fonction du temps ne montre aucune corrélation entre la radioactivité fixée par les bactéries et la durée d'incubation.

La même étude a été menée durant l'été (LEDUC et FERRONI, 1984), et il s'avère que même lorsque le glucose assimilé augmente linéairement en fonction du temps d'incubation, la cinétique de Michaelis-Menten peut ne pas être obtenue.
Ce phénomène s'est d'ailleurs reproduit pour un lac moyennement acide présentant un taux de consommation de substrat radioactif non négligeable (FERRONI et LEDUC, 1984).

Avec un modèle mathématique, WILLIAMS (1973) a étudié dans quels cas la population microbienne ne répond pas au modèle de Michaelis-Menten. Il constate qu'à une plus forte hétérogénéité des espèces, notamment au niveau de la constante d'assimilation K, correspond une moins bonne approximation de la cinétique de Michaelis-Menten. Et les temps de turn-over sont plus élevés que ceux prédits.

Cependant, HUET et al. (1980) avec des cultures pures à priori plus homogènes au niveau de la constante d'assimilation n'a obtenu que des cinétiques de type diffusionnel.

L'ensemble de ces résultats met l'accent sur l'utilisation empirique de la cinétique de Michaelis-Menten lors de l'évaluation du potentiel hétérotrophe, et sur les limites de cette méthode.

3.3.4. Les autres approches basées sur l'assimilation de substrat carboné radioactif

La détermination des vitesses d'assimilation de différentes concentrations en substrat carboné est nécessaire à l'évaluation du potentiel hétérotrophe, notamment au calcul de Vmax et T.

Une autre approche consiste à n'utiliser qu'une seule concentration en substrat carboné et à suivre la cinétique d'assimilation des microorganismes. Il ne s'agit plus alors du potentiel hétérotrophe tel qu'il a été décrit précédemment, mais d'une mesure de l'activité hétérotrophe des bactéries caractérisée par la vitesse initiale "v" d'assimilation d'un substrat particulier.

Ainsi, HERBLAND et BOIS (1974) ont mesuré le glucose incorporé et minéralisé par la microflore marine après 3 heures d'incubation et en présence de 1,8 µg/l de glucose.
Sur cette période, le CO_2 rejeté et la radioactivité fixée par les bactéries augmentent linéairement.

De la même manière, un test de toxicité sur boues activées a été proposé par LARSON et SCHAEFFER (1982). Et l'inhibition du glucose assimilé est mesuré après 15 min. d'incubation.

Les CI_{50} obtenues avec le 3-5 dichlorophénol et le mercure sont respectivement égales à 13,5 et 5,8 mg/l. Mais la répétabilité du test n'a pas été étudiée. Les auteurs ont montré que la libération du CO_2 était linéaire durant 15 min. et représentait 15 % du glucose initial présent dans le milieu réactionnel.

JONAS et al. (1984) ont étudié la toxicité du mercure, de l'étain et de leurs dérivés organiques sur l'incorporation de la thymidine tritiée et sur l'incorporation et la minéralisation du glutamate marqué au ^{14}C après une période d'incubation d'une heure et en présence d'une concentration unique en substrat.
Lors de travaux préliminaires, ils ont vérifié que la thymidine tritiée et le glutamate U-^{14}C fixés par les bactéries ainsi que le CO_2 libéré, augmentaient linéairement durant plus d'une heure.

La comparaison avec un test de viabilité démontre que les mesures d'assimilation de substances organiques marquées sont plus sensibles à la présence de toxiques que les tests de croissance. Les concentration minimales inhibitrices obtenues sont faibles :

	Test d'assimilation	Test de viabilité
- méthylmercure :	$< 0,5$ µg/l	$< 0,5$ µg/l
- chlorure mercurique :	< 1 µg/l	< 1 µg/l
- chlorure de tributylétain :	< 5 µg/l	< 100 µg/l
- chlorure d'étain :	< 5 mg/l	< 50 mg/l

BARNHART et WESTAL (1983) ont également mesuré l'effet des toxiques sur l'assimilation d'une concentration donnée en substrat carboné (100 µg/l d'acétate) par une population microbienne naturelle ; les microorganismes sont préalablement exposés au toxique durant 30 min., puis la quantité d'acétate incorporé est mesurée après une heure d'incubation.
Les auteurs se sont surtout intéressés à la répétabilité du test. Et le tableau 6 regroupe les CI_{50} du diquat et du cadmium obtenues avec des communautés microbiennes prélevées en amont et en aval de rejets.

Tableau 6 : CI_{50} du cadmium et du diquat mesurées sur l'assimilation de substrat carboné par des populations microbiennes naturelles (BARNHART et WESTAL, 1983).

Prélèvement	Substance testée	Echantillon de zone peu polluée	Echantillon de zone très polluée
Fleuve	Cadmium	0,49	1,85
	Diquat	$0,1.10^{-4}$	0,06
Rivière	Cadmium	0,39	0,66
	Diquat	0,002	0,05

Ces résultats démontrent que les toxiques testés sont moins nocifs vis à vis de bactéries prélevées dans des zones polluées ; l'explication est à rechercher dans une biodisponibilité plus faible des toxiques ou une plus grande résistance des microorganismes. Le site de prélèvement n'est donc pas anodin sur les résultats des tests.
Les auteurs précisent que ce test doit être envisagé lors d'études d'impact de polluants sur des milieux aquatiques précis avec utilisation de la microflore locale. Alors que les tests standardisés avec des réactifs biologiques de laboratoire mesurent la toxicité potentielle de substances ou d'effluents.
Enfin, la comparaison de ce test basé sur l'assimilation d'acétate et les tests Daphnies, Poissons (Pimephales promelas) et Algues (Selenastrum capricornutum) révèle une plus faible sensibilité du test bactérien.

3.3.5. Problèmes liés aux mesures de la radioactivité fixée par les bactéries

CAMPBELL et BAKER (1978) soulignent la possibilité d'artéfacts lors de la filtration réalisée pour récupérer les bactéries. La membrane filtrante peut adsorber le substrat radioactif soluble. L'importance de ce phénomène dépend du volume filtré, de la concentration en radioisotope et de la pression de filtration.

- PFAENDER et BARTHOLOMEY (1982) préconisent un rinçage des membranes avec un mélange 50 % éthanol-eau qui assure une désorption du matériel radioactif sans altérer les microorganismes et sans phénomène de relargage de la partie réellement assimilée.
Il faut cependant préciser que ce type de protocole n'est dans la pratique généralement pas employé lors des mesures de potentiel ou d'activité hétérotrophe. Les membranes sont le plus souvent rincées avec de l'eau, ou assez rarement avec du glucose froid.

JONAS et al. (1984) abordent un autre problème, lié à l'acidification du milieu réalisée pour tuer les bactéries après la période d'incubation et permettre le piégeage du CO_2 . Les auteurs constatent que l'acidification provoque une diminution du matériel radioactif mesuré au niveau des bactéries. Pour le glutamate, cette perte est de 37 % par rapport aux bactéries filtrées directement sans acidification, et elle est attribuée à une désorption du matériel radioactif sous l'effet de l'acide. Mais cette explication n'est confortée par aucune preuve expérimentale.

D'après GRIFFITHS et al. (1974), les pertes de matériel radioactif après acidification s'élèvent à 77 % pour le glutamate - pourcentage beaucoup plus fort que celui obtenu par JONAS et al. (1984) - à 65 % pour l'alanine et chutent à 34 % pour la leucine et 21 % pour l'aspartate.
De plus, l'étude des cinétiques, sur une période de 6 heures, de la radioactivité fixée par les bactéries montre une déviation à la linéarité qui apparaît plus tôt lorsque la réaction est stoppée directement par filtration.

La radioactivité comptée au niveau des bactéries est donc sujette à certaines variations liées à l'adsorption des substances marquées sur la membrane filtrante, sur les bactéries, et à l'interaction des techniques utilisées pour arrêter la réaction sur ces mécanismes d'adsorption et peut-être également sur des phénomènes de relargage.

3.3.6. Les mesures de minéralisation d'un substrat carboné

L'évaluation de la minéralisation d'un substrat carboné radioactif (i.e. la production de CO_2 radioactif) par des microorganismes ne semble pas poser de véritables problèmes techniques. Il faut seulement veiller à ce que le CO_2 soit totalement fixé par l'absorbant.

NOUVION (1983) a montré qu'à partir de 4 heures d'agitation, la fraction piégée par la phényléthylamine atteint une valeur asymptotique, et cette durée a été considérée comme assurant une fixation correcte du CO_2.

JONAS et al. (1984) ont obtenu 86 % d'efficacité dans le captage du CO_2 par l'hydroxyde de hyamine après 1 heure d'agitation.

HERBLAND et BOIS (1974) précisent que l'acidification du milieu permet de stopper la réaction mais également de faire dégazer le CO_2. Et 92 % du CO_2 est piégé par l'hydroxyde de hyamine après 4 heures d'agitation. Mais les auteurs précisent que ce taux de récupération du CO_2 n'est valable que dans les conditions précises de l'essai ; la taille de la fiole, la nature et la concentration en absorbant modifient l'efficacité du piégeage.

Nous avons vu précédemment, lors de l'inventaire des travaux sur l'assimilation hétérotrophe d'une concentration donnée en substrat marqué, que le CO_2 libéré et la radioactivité fixée par les bactéries augmentaient linéairement au cours de l'incubation. Il y a donc proportionnalité entre la fraction minéralisée représentée par le $^{14}CO_2$, et la fraction totale assimilée qui prend en compte le $^{14}CO_2$ et le ^{14}C fixé par les bactéries.

GRIFFITHS et al. (1974) ont calculé que la minéralisation du glutamate représentait 62 % du glutamate total assimilé lorsque les bactéries sont récupérées après acidification. Si les bactéries sont récupérées directement par filtration, ce rapport est un peu plus faible.

HOBBIE et CRAWFORD (1969) ont également montré que la radioactivité mesurée au niveau du CO_2 libéré était proportionnelle à la radioactivité totale assimilée sur une période d'une heure. Mais le pourcentage minéralisé varie avec la nature du substrat. Il est élevé pour l'acide aspartique et l'acide glutamique, 60 %, ce qui est logique car ces deux substances entrent rapidement dans le cycle de Krebs, pour le glucose il représente 30 %, et pour la lysine et l'arginine il chute à environ 10 %. La mesure du CO_2 libéré reflète donc l'activité hétérotrophe des bactéries.

De plus, JONAS et al. (1984) ont montré que les effets inhibiteurs de différentes concentrations en toxiques sont du même ordre de grandeur sur l'incorporation et sur la respiration du glutamate U-^{14}C, ce dont témoignent des courbes dose-effet très proches.

La mise au point d'un test de toxicité bactérien basé sur l'inhibition de la minéralisation d'un substrat carboné radioactif semble donc une voie de recherche intéressante.

Une approche originale a d'ailleurs été menée par DORWARD et BARISAS (1984) dans la détection de polluants dans l'eau au moyen d'une électrode à Escherichia coli. La méthode repose sur la mesure potentiométrique du CO_2 émis en présence de glucose par les cellules d'Escherichia coli immobilisées à la surface de l'électrode. L'inhibition par des toxiques du processus de minéralisation provoque une diminution du CO_2 émis qui est enregistrée. Cette technique nécessite cependant la régénération de l'électrode après chaque stress toxique subi par les bactéries, ce qui limite la faisabilité du test. Et le seuil de détection relativement élevé des électrodes à CO_2 est également un obstacle à l'optimisation de ce bioessai.

4 - ETUDE EXPERIMENTALE DU TEST "INHIBITION DE LA BIOLUMINESCENCE DE PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM"

Ce chapitre consacré à l'étude expérimentale du test Microtox comporte une partie "Matériel et Méthodes" qui décrit la méthodologie du test, et une partie "Résultats" dans laquelle nos travaux sont présentés. L'analyse bibliographique ayant souligné l'influence des conditions expérimentales sur la sensibilité des bactéries aux toxiques, aux dérivés minéraux en particulier, nous avons voulu voir dans quelle mesure la durée et la température d'incubation modifiaient les CI_{50} du 3-5 dichlorophénol et de $CuSO_4$.
La répétabilité du test a ensuite été évaluée sur ces 2 substances dans des conditions optimales de réalisation des essais. Enfin, les CI_{50} de 11 substances chimiques ont été recherchées.

4.1. MATERIEL ET METHODES

4.1.1. Réactifs

- Réactif biologique

Le réactif biologique est une bactérie marine, Photobacterium phosphoreum, fournie par la société Beckman sous forme lyophilisée en flacons de verre contenant approximativement 10^8 bactéries (686023, Beckman). Les flacons sont stockés à 4°C.

Au moment de l'emploi, la suspension bactérienne est reconstituée par addition d'1 ml d'eau distillée ultrapure (686018, Beckman), préalablemnt refroidie à 3°C. Il est nécessaire de laisser la suspension bactérienne se stabiliser pendant quelques minutes avant de commencer les tests.

Les bactéries conservent une activité luminescente exploitable pendant au moins 4 heures.

- Réactifs chimiques

Le milieu réactionnel du test Microtox est une solution de NaCl 2 % (686020, Beckman).

Les substances chimiques étudiées ont été choisies parmi les polluants minéraux et organiques les plus courants des milieux aquatiques.

Les dérivés suivants ont été testés :

- le sulfate de cuivre : $CuSO_4$ (2791, Merck),
- le chlorure de cadmium monohydrate : $CdCl_2, H_2O$ (2011, Merck),
- le chlorure de zinc : $ZnCl_2$ (8816, Merck),
- le dichromate de potassium : $K_2Cr_2O_7$ (26781297, Prolabo),
- le 3-5 dichlorophénol : 3-5 DCP (821768, Merck),
- le benzène (21803291, Prolabo)
- le dibromo 1-2 éthane (34418, Labosi)
- la diéthylamine (803010, Merck),
- l'acide dodécylbenzène sulfonique (803911, Montanoir),
- l'atrazine (35702, Riedel de Haën),
- le malathion (35736, Riedel de Haën).

Pour les substances peu solubles telles que l'atrazine et le malathion, un tiers-solvant a été utilisé, respectivement le DMSO à 0,2 % et l'acétone à 0,01 %. A ces concentrations, nos essais ont montré que le tiers-solvant n'a pas d'effet inhibiteur sur la luminescence bactérienne.

4.1.2. Matériel

Les mesures de luminescence bactérienne sont réalisées à l'aide d'un appareil Microtox, modèle 2055, commercialisé par la société Beckman.

le Microtox est un photomètre comportant :

- 15 puits thermostatés (réglables entre 10 et 25°C) assurant l'incubation des solutions à tester,

- une loge à température constante (+ 3°C) pour la conservation de la souche durant l'essai,

- une tourelle de mesure thermostatée (thermostat couplé avec les puits d'incubation).

Le photomètre dispose d'un affichage numérique permettant de contrôler la tension électrique de la cellule de mesure (700 mV), la température (puits, loge et tourelle) et de visualiser les valeurs de bioluminescence.

L'appareil est relié à un enregistreur dont le tracé est un pic de hauteur proportionnelle à la luminescence mesurée.

4.1.3. Mode opératoire

Le mode opératoire est le suivant :

- Préparation d'une gamme de dilution du toxique à tester contenant 2 % de NaCl, et d'un témoin sans toxique, qui sont ensuite placés dans l'incubateur pour stabilisation à la température du test.

- Préparation des tubes de mesures contenant 500 µl d'une solution de NaCl 2 %, et stabilisation pendant quelques minutes dans l'incubateur.

- Ajout, dans les tubes de mesure, de 10 µl de suspension bactérienne reconstituée et stabilisation 10 min. à la température du test.

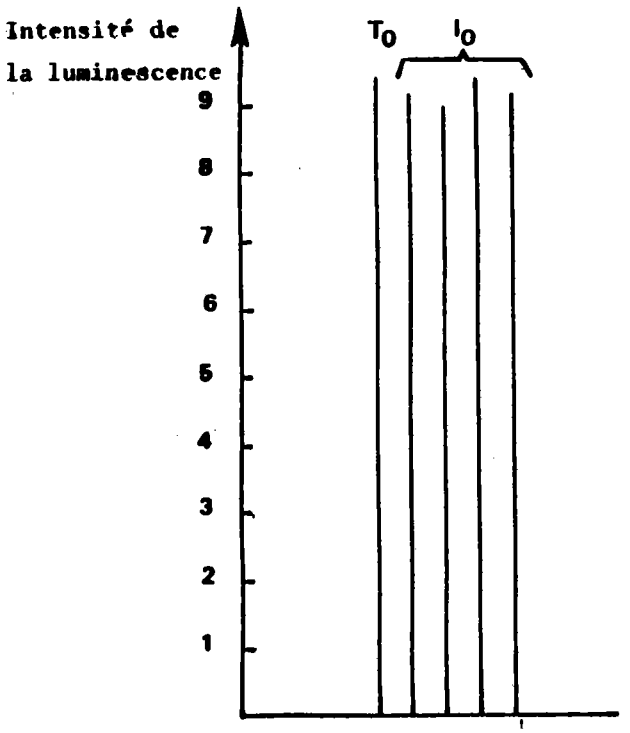
- Mesure de la luminescence initiale Io, et sélection des tubes de mesure présentant une luminescence voisine.

- Ajout de 500 µl de chacune des différentes dilutions de la solution de toxique, ainsi que 500 µl de solution saline à 2 % pour le témoin, dans les tubes de mesures sélectionnés (temps to).

- Après le temps d'incubation désiré (5 minutes ou plus), mesure de la bioluminescence résiduelle It.

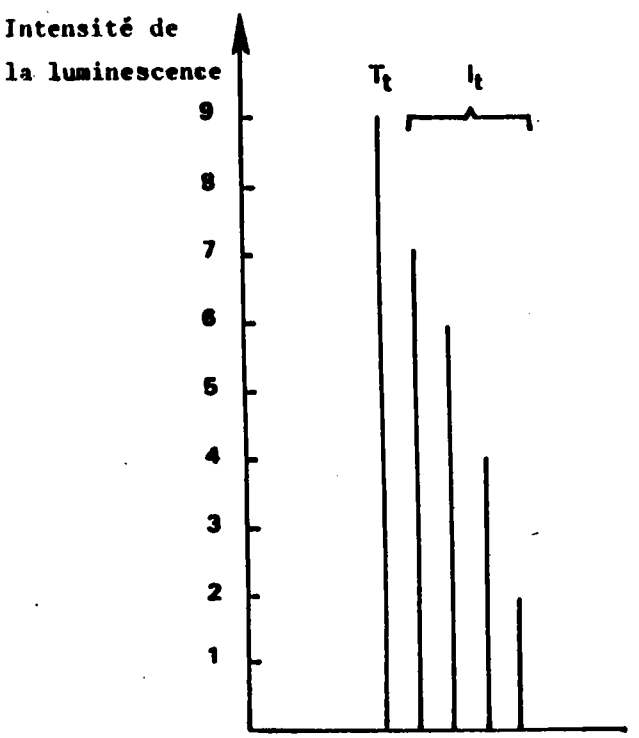
Un schéma de l'enregistrement de la bioluminescence est donné dans la figure 12.

Remarque : La méthodologie précédente ne permet de tester au mieux qu'une concentration égale à 45 % de l'effluent brut ou de la solution initiale, ce qui est gênant pour des échantillons de faible toxicité ou encore des substances peu solubles.
Le protocole expérimental peut être modifié en ne diluant les 10 µl de suspension bactérienne qu'avec 90 µl de NaCl 2 %. Les 900 µl de la dilution sont ensuite ajoutés, ce qui permet de tester la solution toxique initiale ou l'effluent brut à la concentration de 90 %.



(1) Enregistrement de la bioluminescence initiale dans le tube témoin To et dans les tubes essais Io

(2) Addition au temps to des différentes dilutions de la substance testée dans les tubes essais



(3) Enregistrement de la bioluminescence restante dans le tube témoin T_t et dans les tubes essais I_t, après un temps d'incubation t

Figure 12 : Schéma de l'enregistrement de la bioluminescence.

4.1.4. Expression des résultats

L'évaluation de la CI_{50}, ou concentration qui entraîne 50 % de diminution de la bioluminescence après un temps de contact "t" à une température "θ", peut être obtenue par 2 méthodes de calcul :

- Calcul du pourcentage de diminution de l'intensité lumineuse par rapport à l'intensité initiale ($\Delta\%$)

$$\Delta\ \% = \frac{Io - It}{Io} \times 100$$

En fait, $\Delta\ \%$ est calculé en pondérant Io par le rapport des intensités lumineuses du témoin au temps 0 et t : $F = \frac{Tt}{To}$

Ce facteur F prend en compte la modification spontanée de la bioluminescence bactérienne au cours du temps, en dehors de tout phénomène toxique.
L'expression de $\Delta\%$ devient :

$$\Delta\ \% = \frac{(Io \times F) - It}{Io \times F} \times 100$$

Io = bioluminescence de la suspension bactérienne au temps 0
It = bioluminescence de la suspension bactérienne au temps t
To = bioluminescence de la suspension témoin au temps 0
Tt = bioluminescence de la suspension témoin au temps t.

Les valeurs de $\Delta\%$ ainsi calculées pour chaque dilution de la solution à tester sont reportées sur un papier semi-logarithmique, et la partie linéaire centrale de la courbe sigmoidale permet, par interpolation, d'obtenir en abscisse la CI_{50} qui correspond à un Δ égal à 50 %.

- Calcul du rapport Γ de la diminution de l'intensité lumineuse sur l'intensité résiduelle

$$\Gamma = \frac{(Io \times F) - It}{It}$$

Les valeurs de Γ ainsi que les concentrations en toxique reportées sur papier log-log permettent d'obtenir une droite de régression. A Γ égal à 1 correspond en abscisse la CI_{50} qui ne doit être déduite que par interpolation.

Dans nos travaux, nous avons utilisé le rapport Γ. Les droites dose-effet ainsi que les CI_{50} ont été obtenues par calcul de régression linéaire.

Lorsqu'il n'est pas possible d'atteindre 50 % d'inhibition de la luminescence du fait d'une trop faible toxicité, les résultats sont exprimés par les valeurs de Δ % obtenues.

4.2. RESULTATS

4.2.1. Influence de la durée d'incubation

- Etude sur le 3-5 dichlorophénol

La CI_{50} du 3-5 dichlorophénol a été déterminée à une température de 15°C après 5, 10 et 15 min. d'incubation, et 2 répétitions ont été réalisées avec le même réactif biologique (Tableau 7).

Tableau 7 : Variation de la CI_{50}-15°C (mg/l) du 3-5 dichlorophénol en fonction de la durée de l'essai.

Durée de l'essai (min.)	CI_{50} (mg/l) 1er essai	CI_{50} (mg/l) 2ème essai	CI_{50}-moyenne (mg/l)
5	4,3	4,7	4,5
10	4,0	4,4	4,2
15	3,9	4,4	4,2

La CI_{50} diminue légèrement au cours du temps. La CI_{50}-15 min. représente pour les essais 1 et 2, respectivement 91 et 95 % de la CI_{50}-5 min.

Cette étude qui vise à comparer les résultats de 2 essais après 5, 10 et 15 min. de contact toxique-bactéries, peut s'apparenter à un plan expérimental à deux facteurs, le facteur "essai" et le facteur "temps". Et l'analyse de variance ne met pas en évidence d'effet significatif du facteur temps d'incubation avec un risque α égal à 5 %.

La toxicité du 3-5 dichlorophénol sera donc étudiée après 5 min. d'incubation.

- Etude sur le sulfate de cuivre

La CI_{50} du sulfate de cuivre a été déterminée pour différents temps d'incubation variant de 5 à 80 min. et une température de 15°C ; à partir d'un même réactif biologique, 3 essais ont été menés jusqu'à 40 min. et le 1er essai a été poursuivi jusqu'à 80 min. (Tableau 8).

Tableau 8 : Variation de la CI_{50}-15°C (mg/l) de $CuSO_4$ en fonction de la durée de l'essai.

Durée de l'essai (min.)	CI_{50} (mg/l) 1er essai	CI_{50} (mg/l) 2ème essai	CI_{50} (mg/l) 3ème essai	CI_{50}-moyenne (mg/l)
5	2,14	1,98	1,69	1,94
10	1,43	1,74	1,60	1,59
15	1,40	1,11	1,14	1,22
20	0,82	0,75	0,80	0,79
30	0,46	0,46	0,48	0,47
40	0,46	0,35	0,37	0,39
50	0,42	-	-	-
60	0,38	-	-	-
70	0,35	-	-	-
80	0,32	-	-	-

Les résultats obtenus avec les essais 1, 2 et 3 pour des durées d'exposition variant de 5 à 40 min., traités au moyen de l'analyse de variance selon un plan expérimental à 2 facteurs, le facteur "temps" et le facteur "essai", conduisent à un effet significatif du facteur "temps" avec un risque α égal à 1 $^{o}/_{oo}$.

La figure 13 nous montre que la CI_{50} diminue très fortement au cours des 20 premières minutes. La CI_{50}-20 min. ne représente plus qu'environ 41 % de la CI_{50}-5 min. Après 30 min., la CI_{50} tend vers une valeur asymptotique.

Un temps de contact de 30 min. entre $CuSO_4$ et le réactif bactérien nous semble donc un bon compromis permettant d'accroître la sensibilité et la précision de la mesure tout en assurant une réponse suffisamment rapide pour un test de toxicité.

4.2.2. Influence de la température d'incubation

L'influence de la température sur la toxicité de $CuSO_4$ a été recherchée en déterminant la CI_{50} successivement à 15 et 20°C à l'aide du même réactif bactérien. Les résultats sont reportés dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9 : Influence de la température sur la CI_{50}-30 min. (mg/l) de $CuSO_4$.

Température de l'essai (°C)	Nombre d'essais	CI_{50}-30 min. (mg/l)	CI_{50}-moyenne (mg/l)
15	3	0,24 0,28 0,26	0,26
20	2	0,23 0,27	0,25

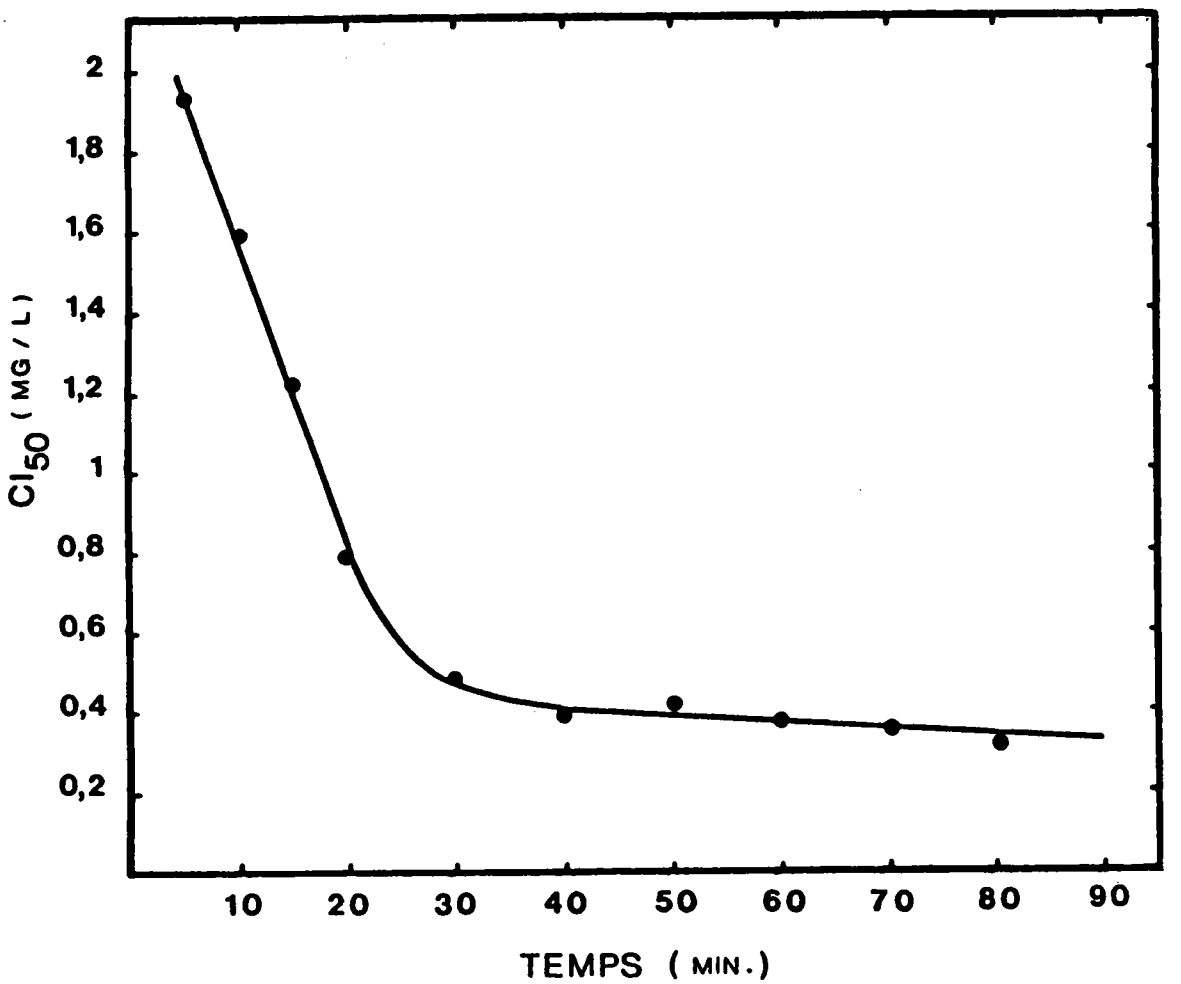


Figure 13 : Evolution de la toxicité de $CuSO_4$ sur Photobacterium phosphoreum en fonction de la durée de l'essai (θ = 15°C).

Le test de Student qui permet de comparer les CI_{50}- moyennes obtenues à 15 et à 20°C ne met pas en évidence de différence significative avec un risque α égal à 5 %.

Nous réaliserons donc les essais de toxicité de $CuSO_4$ à la même température que ceux du 3-5 dichlorophénol, soit 15°C.

4.2.3. Etude de la répétabilité

La répétabilité du test Microtox sera appréciée par la variabilité (exprimée en terme de coefficient de variation), des CI_{50} du 3-5 dichlorophénol et de $CuSO_4$ déterminées avec différents lots bactériens et différentes solutions mères de toxique.

- Toxicité du 3-5 dichlorophénol

La toxicité du 3-5 dichlorophénol, illustrée par un exemple de droite dose-effet (Figure 14), a été mesurée à la température de 15°C et pour une durée d'essai de 5 minutes.

Avec une même suspension bactérienne, 3 répétitions au moins ont été réalisées et 4 lots bactériens différents ont été testés. Le tableau 10 rend compte des résultats.

Les coefficients de variation obtenus avec un même réactif biologique fluctuent de 0,4 à environ 10 %.

La CI_{50} moyenne calculée sur l'ensemble des 4 lots bactériens est de 4,50 mg/l et son écart-type est 0,21 mg/l, d'où un coefficient de variation de 4,7 % qui caractérise la répétabilité du test.

- Toxicité du sulfate de cuivre

La toxicité de $CuSO_4$ a été étudiée après 30 min. de contact toxique-bactéries à la température de 15°C. Un exemple de droite dose-effet est donné dans la figure 15.

Six lots bactériens ont été utilisés pour tester la répétabilité, et 3 essais au moins ont été conduits avec chaque réactif biologique.
Les résultats sont regroupés dans le tableau 11.

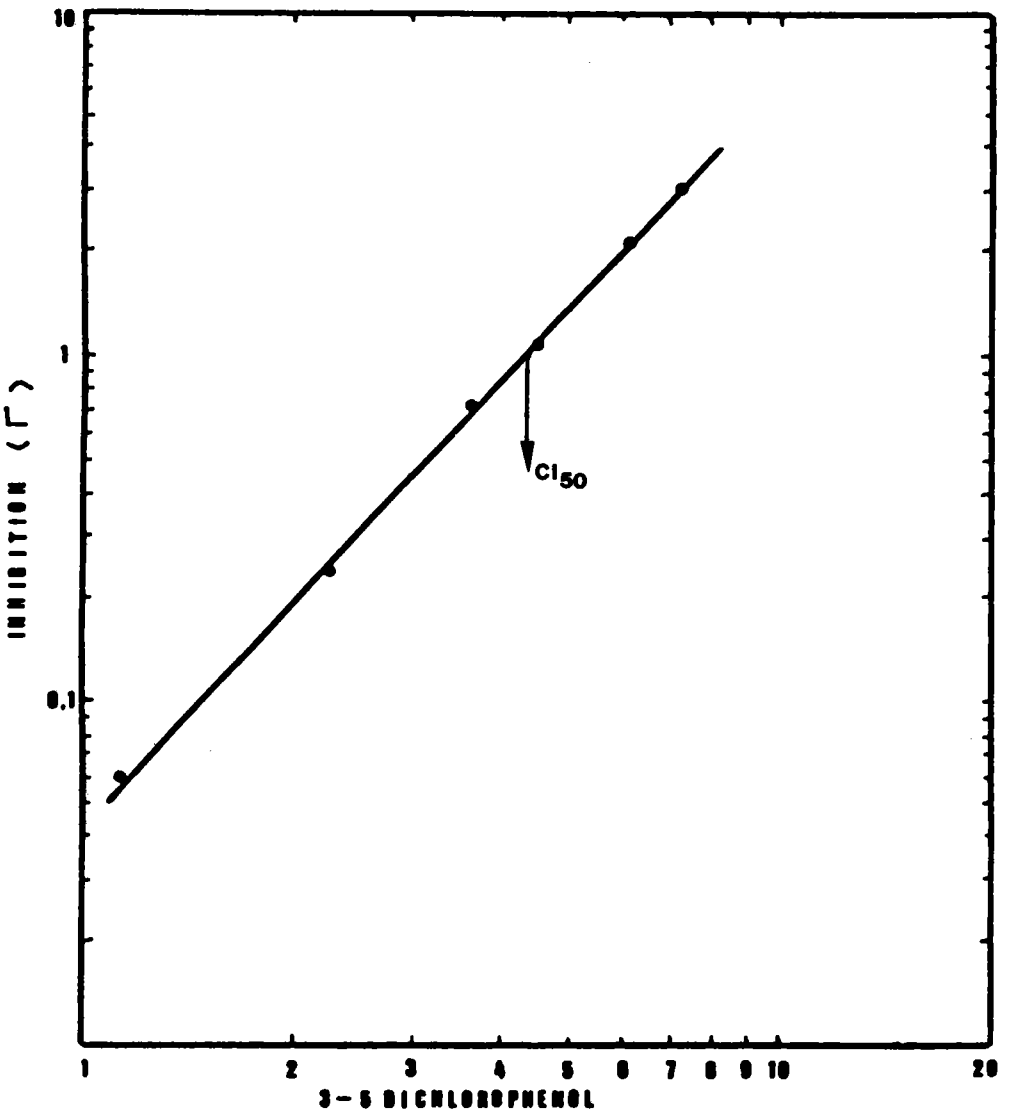


Figure 14 : Exemple de relation dose-effet du 3-5 dichlorophénol sur la bioluminescence bactérienne permettant la détermination de la CI_{50}.

Tableau 10 : CI_{50} (en mg/l) du 3-5 dichlorophénol évaluée avec le test Microtox (t = 5 min., θ = 15°C).

Lot bactérien	Nombre d'essais	CI_{50}-moyenne ± écart-type (mg/l)	Coefficient de variation (%)	*Intervalle de confiance de la CI_{50}-(mg/l)
A	4	4,28 ± 0,15	3,5	4,28 ± 0,48
B	4	4,66 ± 0,24	5,1	4,66 ± 0,76
C	4	4,70 ± 0,02	0,4	4,70 ± 0,06
D	3	4,36 ± 0,43	9,9	4,36 + 1,85

* Intervalle de confiance où l'on a 95 % de chance de trouver la CI_{50} du 3-5 dichlorophénol pour un lot bactérien donné (m ±tSx).

CI_{50}-moyenne = 4,50 ± 0,21 mg/l et CV = 4,7 %

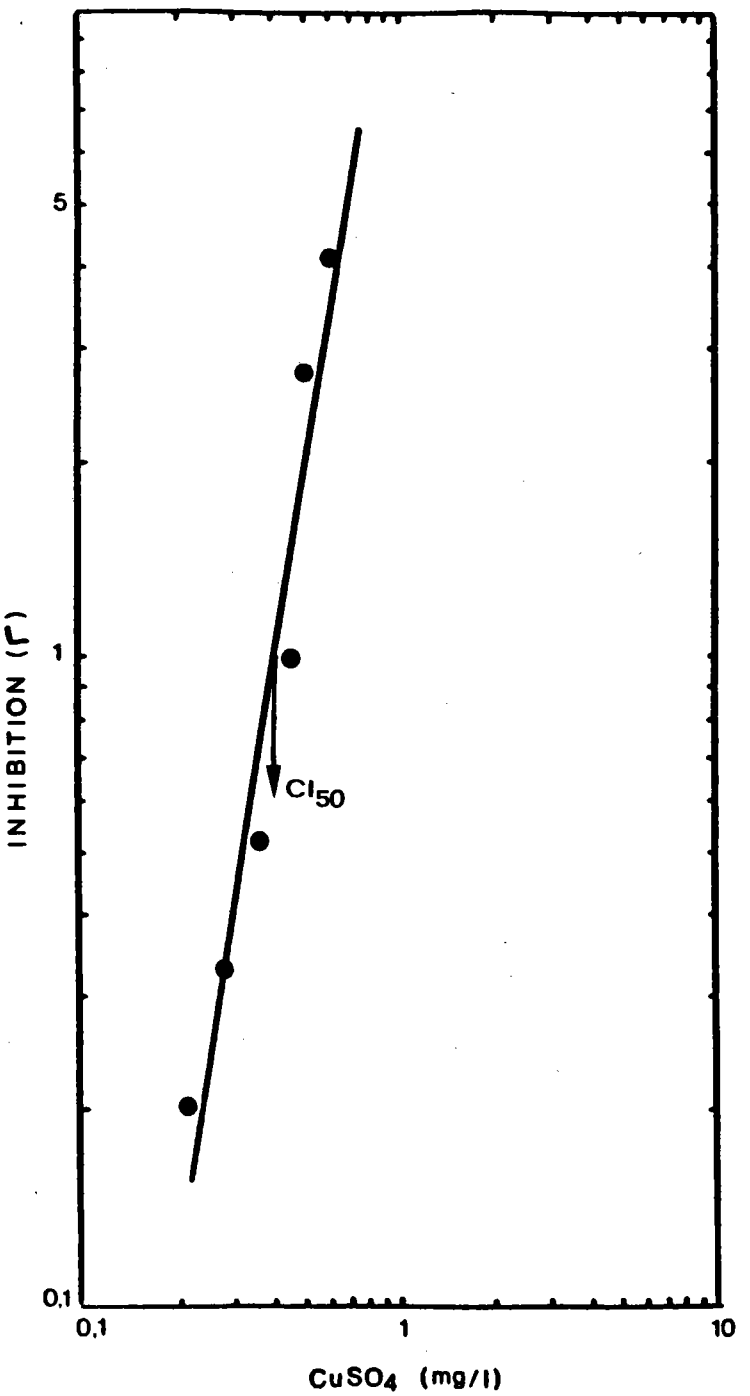


Figure 15 : Exemple de relation dose-effet de $CuSO_4$ sur la bioluminescence bactérienne permettant la détermination de la CI_{50}.

Tableau 11 : CI_{50} (en mg/l) de $CuSO_4$ évaluée avec le test Microtox (t = 30 min. et θ = 15°C).

Lot bactérien	Nombre d'essais	CI_{50}-moyenne ± écart-type (mg/l)	Coefficient de variation (%)	*Intervalle de confiance de la CI_{50}-(mg/l)
A	3	0,47 ± 0,01	2,1	0,47 ± 0,06
B	3	0,26 ± 0,02	7,7	0,26 ± 0,09
C	3	0,31 ± 0,01	3,2	0,31 ± 0,06
D	3	0,38 ± 0,03	7,9	0,38 ± 0,15
E	3	0,23 ± 0,02	8,7	0,23 ± 0,09
F	4	0,25 ± 0,02	8,0	0,25 ± 0,07

* Intervalle de confiance où l'on a 95 % de chance de trouver la CI_{50} de $CuSO_4$ pour un lot bactérien donné (m ± t Sx).

CI_{50}-moyenne $CuSO_4$ = 0,32 ± 0,09 mg/l, CV = 28 %

CI_{50}-moyenne Cu^{++} = 0,13 ± 0,04 mg/l

Avec un même réactif biologique, les coefficients de variation sont compris entre 2 % et 9 %.

La CI_{50}-moyenne de $CuSO_4$ calculée sur 6 lots bactériens est égale à 0,32 mg/l et son écart-type est 0,09 mg/l (soit CI_{50}-Cu^{++} = 0,13 $\pm$ 0,04 mg/l). La répétabilité du test est donc caractérisée par un coefficient de variation égal à 28 %.

4.2.4. Evaluation de la CI_{50} de quelques substances chimiques

9 substances chimiques choisies parmi les polluants les plus courants des milieux aquatiques ont été testées au moyen du bioessai Microtox, en plus de $CuSO_4$ et du 3-5 dichlorophénol étudiés précédemment.

Parmi les toxiques minéraux, nous avons évalué la toxicité du cadmium, du zinc et du chrome.

Les toxiques organiques testés appartiennent au groupe :

- des hydrocarbures aromatiques, le benzène,
- des hydrocarbures halogénés, le dibromo 1-2 éthane,
- des amines, la diéthylamine,
- des détergents, l'acide dodécylbenzène sulfonique,
- des pesticides, dont un herbicide de la famille des triazines, l'atrazine, et un insecticide organophosphoré, le malathion.

Le tableau 12 présente les résultats du test Microtox exprimés par la CI_{50} en mg/l des toxiques minéraux et organiques.
La durée des tests est de 30 min. pour les substances minérales, de 15 min. pour le détergent et de 5 min. pour les autres substances organiques. La température est maintenue de façon constante à 15°C.

Tableau 12 : CI_{50} (en mg/l) de quelques substances chimiques évaluées au moyen du test Microtox.

Substances testées	CI_{50}-Microtox (mg/l)	Seuil de toxicité CI_{10} ou CI_{20} (mg/l)
Cu^{++}	0,13 ± 0,04	CI_{10} = 0,06
Cd^{++}	2,7	CI_{10} = 0,1
Zn^{++}	0,8	CI_{20} = 0,2
Cr^{6+}	13	CI_{20} = 3,4
3-5 dichlorophénol	4,5 ± 0,21	CI_{10} = 1,5
Benzène	84	-
Dibromo 1-2 éthane	735	CI_{20} = 308
Diéthylamine	23,4	CI_{10} = 15,2
Acide dodécylbenzène sulfonique	29,2	CI_{20} = 12,7
Atrazine	> 86	-
Malathion	84	-

Photobacterium phosphoreum est sensible aux substances minérales, en particulier au cuivre, au zinc dont les CI_{50} sont inférieures à 1 mg/l.
La classification des substances minérales par ordre de toxicité décroissante est la suivante : cuivre, zinc, cadmium et chrome.

Par contre, les substances organiques ne sont que faiblement toxiques sur Photobacterium phosphoreum, excepté le 3-5 dichlorophénol dont la CI_{50} est égale à 4,5 mg/l, et dans une moindre mesure le détergent et la diéthylamine caractérisés par des CI_{50} voisines de 30 mg/l.

Dans le tableau 12, sont également reportées les CI_{10} ou CI_{20} qui permettent d'apprécier les seuils de toxicité des substances testées et d'évaluer l'intensité des relations dose-effet. A ce sujet, nous signalons que la diéthylamine induit une relation dose-effet à forte pente, ce qui traduit une amplification rapide des effets toxiques sur la bioluminescence en fonction des concentrations croissantes appliquées.

5 - ETUDE EXPERIMENTALE DU TEST "INHIBITION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE DE BOUES ACTIVEES"

Dans ce chapitre consacré à l'étude expérimentale du test "Inhibition de la consommation d'oxygène des boues activées", nous détaillerons, selon le schéma de présentation suivi au chapitre précédent, la méthodologie du test, puis les résultats de nos travaux concernant, la répétabilité étudiée sur le 3-5 dichlorophénol et $CuSO_4$, et la sensibilité évaluée lors du screening de 11 substances chimiques.
De plus, une attention particulière est apportée à l'influence du substrat sur la spéciation des toxiques, et quelques milieux de remplacement sont testés.

5.1. MATERIEL ET METHODES

5.1.1. Présentation du test

Le test "inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées" a été réalisé suivant la norme ISO 8192.

Deux méthodologies sont proposées dans cette norme, selon que l'on recherche la toxicité des substances chimiques sur les eaux de surface (partie A), ou sur les installations de traitement biologique des eaux résiduaires (partie B).

Nous nous sommes intéressés uniquement à la partie A, notre optique étant de comparer des tests de toxicité bactériens applicables à l'évaluation de pollutions vis à vis des milieux aquatiques.

5.1.2. Réactif biologique

Le réactif biologique est habituellement constitué de boues activées prélevées dans un bassin d'aération d'une usine de traitement des eaux recevant préférentiellement des eaux domestiques.

Afin de limiter la variabilité du matériel biologique, nous avons mis en place un pilote utilisé dans les études de biodégradabilité (projet norme AFNOR T 73 265), et les boues ont été prélevées sur cette installation.

- Dispositif

Le pilote est représenté dans la figure 16 :

- le récipent de stockage A contient l'effluent synthétique dont la composition est détaillée dans le tableau 13. Cet effluent constitue le substrat des bactéries et alimente le bac d'aération.

- la pompe péristatique est réglée au débit de 1 l/h.

- le bac d'aération C est muni d'un verre fritté qui assure par bullage un mélange intime, ainsi qu'une teneur en oxygène supérieure à 2 mg/l.

- la pompe à air comprimé E provoque en permanence le recyclage des boues.

- le décanteur D permet l'élimination des eaux traitées qui sont récupérées dans le récipient collecteur F.

- Fonctionnement

Le pilote est placé dans une salle thermostatée ($t = 22 \pm 2°C$).

le dispositif est réglé de sorte que le volume du bac d'aération soit de 3 l. Le débit de 1 l/h assure donc un temps de rétention théorique dans le bac de 3 heures.

L'ensemencement primaire a été réalisé avec 100 ml de boues prélevées dans le bassin d'aération de la station d'épuration d'eaux résiduaires urbaines de Morigny (Essonne), et les bactéries sont alimentées par l'effluent synthétique qui est préparé journellement.

Une période de 3 semaines est nécessaire au développement et à la stabilisation des boues activées. 400 ml sont ensuite prélevés chaque jour dans le bac d'aération afin d'éliminer les boues en excés et de maintenir une charge massique de 0,21 g de DBO_5/g de MVS théoriques/j (Mesures réalisées par le Service Etudes et Recherches, Technologies Eaux, IRCHA-Evry).

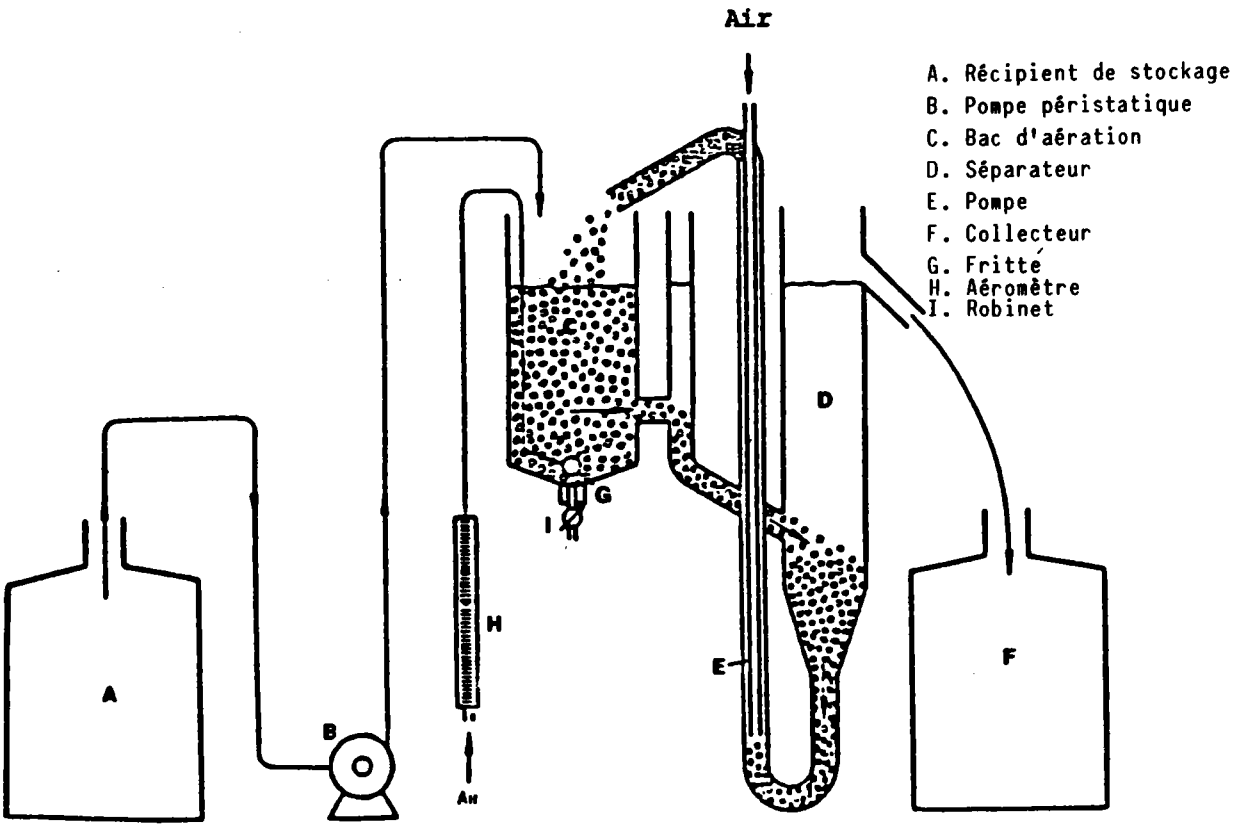


Figure 16 : Pilote de boues activées (dans DEGREMONT, 1978).

Tableau 13 : Composition chimique de l'effluent synthétique.

Substances chimiques (références)	Concentrations (mg/l)
Peptone (053.15531, Biolyon)	160
Extrait de viande (351.14507, Biolyon)	110
Urée (28 877 23, Prolabo)	30
Monohydrogénophosphate de Potassium : $K_2 H PO_4$ (5100, Merck)	28
Chlorure de sodium : NaCl (27 810 364, Prolabo)	7
Chlorure de calcium dihydrate : $CaCl_2, 2 H_2O$ (22 317 297, Prolabo)	4
Chlorure de magnésium heptahydrate : $MgSO_4, 7 H_2O$ (25 165 23, Prolabo)	2

La stabilité du pilote est contrôlée par la mesure des MES. Et les boues activées sont régulièrement observées au microscope. A titre illustratif, quelques photos de boues activées prélevées sur pilote sont présentées (photos n° 1 à 9).

5.1.3. Réactifs chimiques

- Solution isotonique

Elle est utilisée pour laver et diluer les boues activées :

- NaCl 5 g
- $MgSO_4$, 7 H_2O 0,12 g
- q.s.p. 1000 ml eau distillée.

- Milieu synthétique

Il constitue le substrat des bactéries au cours de l'essai de toxicité.

Sa composition chimique est proportionnellement identique à celle de l'effluent synthétique, mais il présente une concentration 100 fois plus élevée (Tableau 14). Avant utilisation, ce milieu est vigoureusement agité, et le pH est ajusté à 7,5 $\pm$ 0,5.

Il est précisé dans la norme que le milieu synthétique peut être gardé jusqu'à une semaine à une température comprise entre 0 et 4°C, et il peut également être stérilisé. Il nous paraît plus prudent d'effectuer la stérilisation, car ce milieu est très riche et les contaminants s'y développent facilement et rapidement.

Nous avons donc filtré l'urée sur membrane 0,45 µm, et les autres constituants ont été autoclavés à 120°C pendant 30 minutes.

- Autres milieux

Des milieux nutritifs de remplacement ont été testés (Tableau 14) ; ils se caractérisent par la présence de glucose seul à différentes concentrations (milieu N° 1), ou de glucose accompagné de sels minéraux (milieux N° 2 et N° 3), et enfin de glucose préparé dans le milieu minéral de l'essai de biodégradabilité STURM (AFNOR T 90 306).

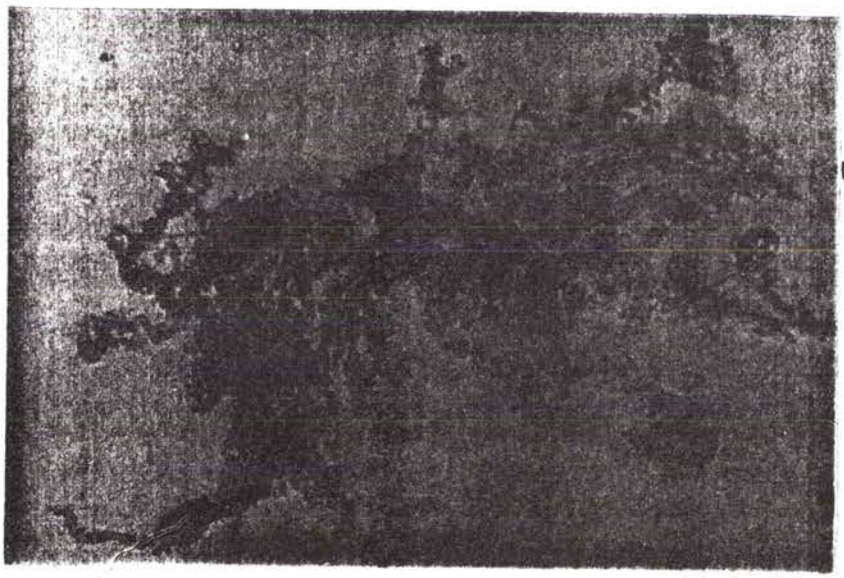


PHOTO N.1 : BOUES ACTIVEES EN FLOCS AU CONTOUR BIEN NET. INDICE D'UNE APTITUDE CORRECTE A LA DECANTATION.

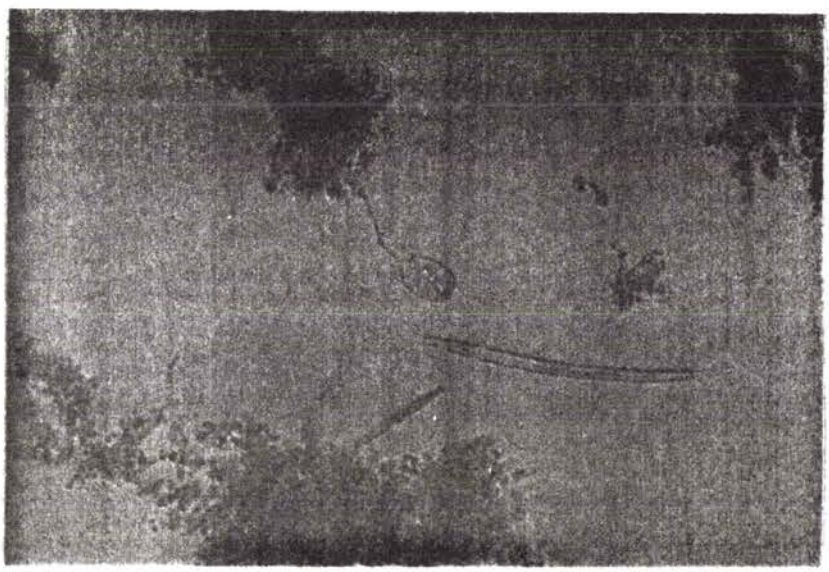


PHOTO N.2 : BACTERIES ET ELEMENTS FAUNISTIQUES DES BOUES ACTIVEES, PROTOZOAIRES FIXES ET ORGANISMES DETRITIVORES (NEMATODES).

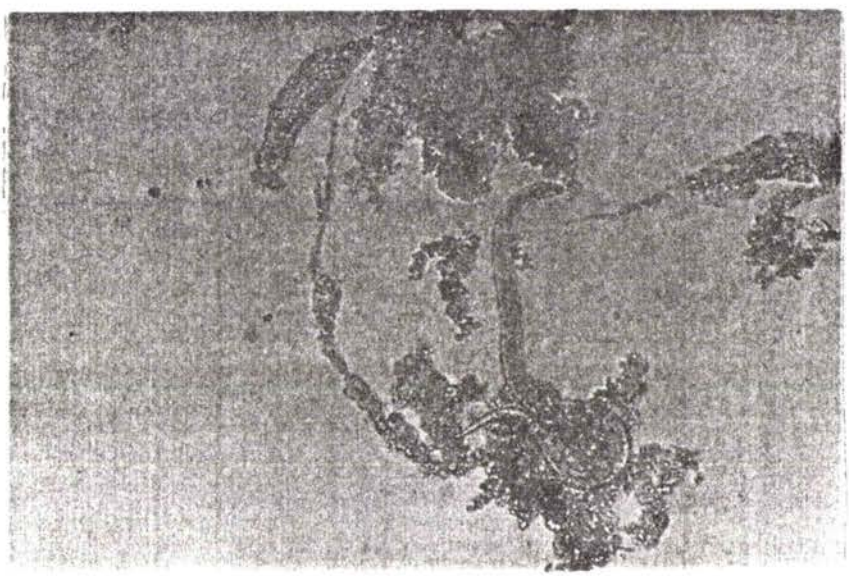


PHOTO N.3 : BACTERIES ET METAZOAIRES DES BOUES ACTIVEES, NEMATODES ET ROTIFERES.

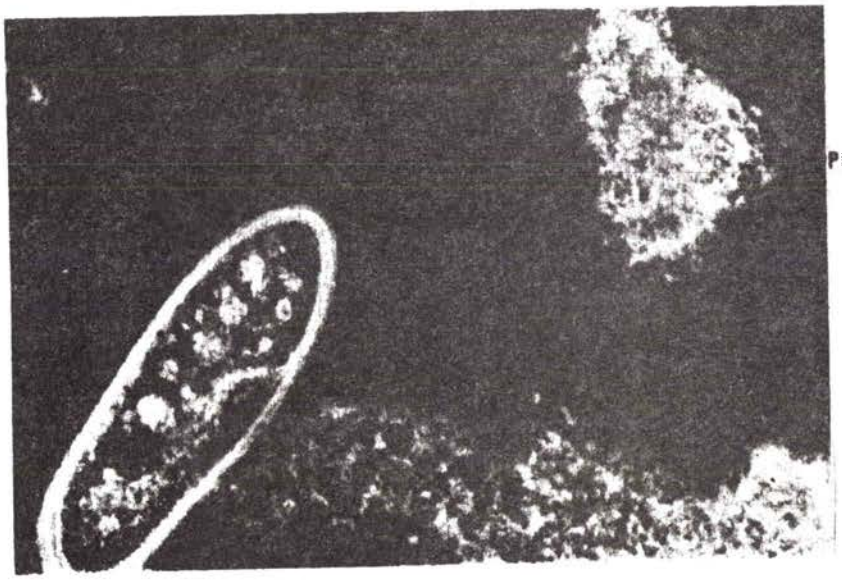


PHOTO N.4 : PROTOZOAIRE CILIE HOLOTRICHE (GENRE PARAMECIUM), OCCUPANT L'ESPACE INTERFLOC, ET PREDATEUR DES BACTERIES LIBRES. CE CILIE EST TRES AVIDE D OXYGENE.

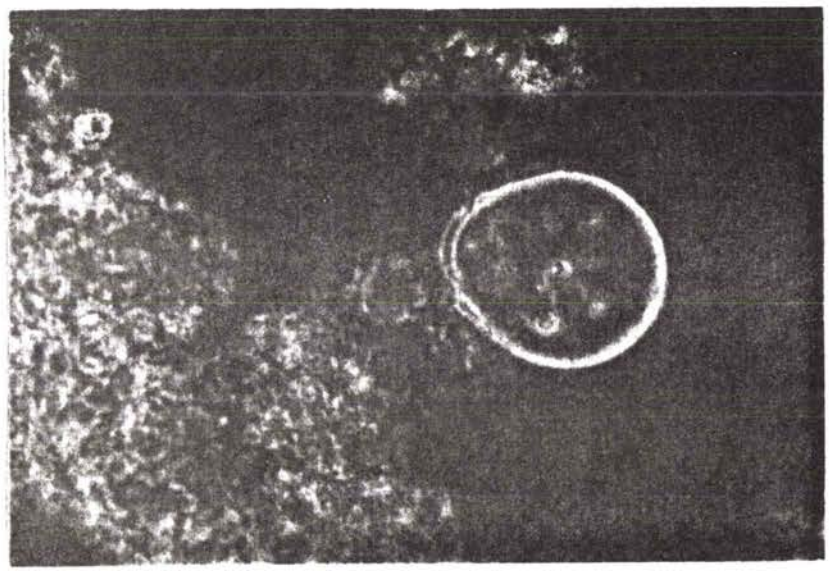


PHOTO N.5 : PROTOZOAIRE CILIE PERITRICHE, GENRE VORTICELLE, FIXE DANS LE FLOC ET SE NOURRISSANT DE BACTERIES LIBRES.

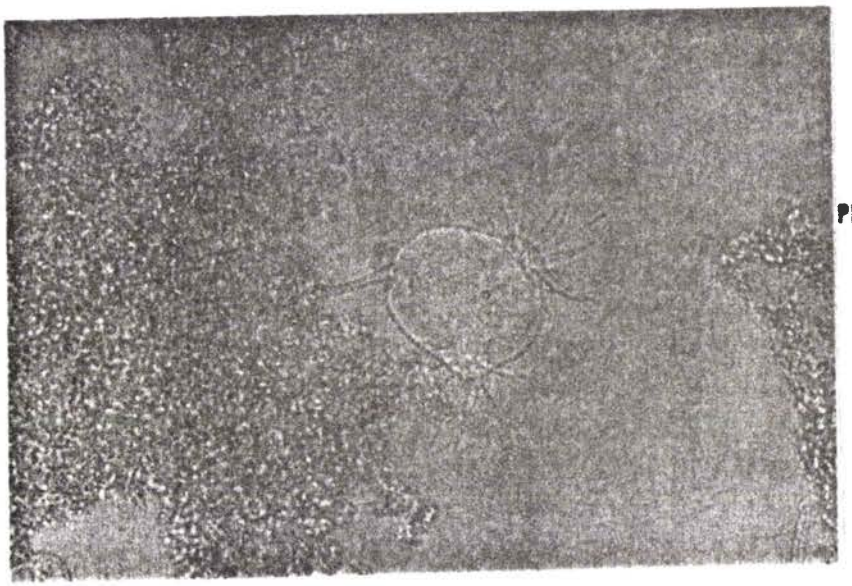


PHOTO N.6 : PROTOZOAIRE CILIE PERITRICHE, SOUS - CLASSE SUCTORIA, INDICATEUR DE LA STABILISATION DES BOUES.

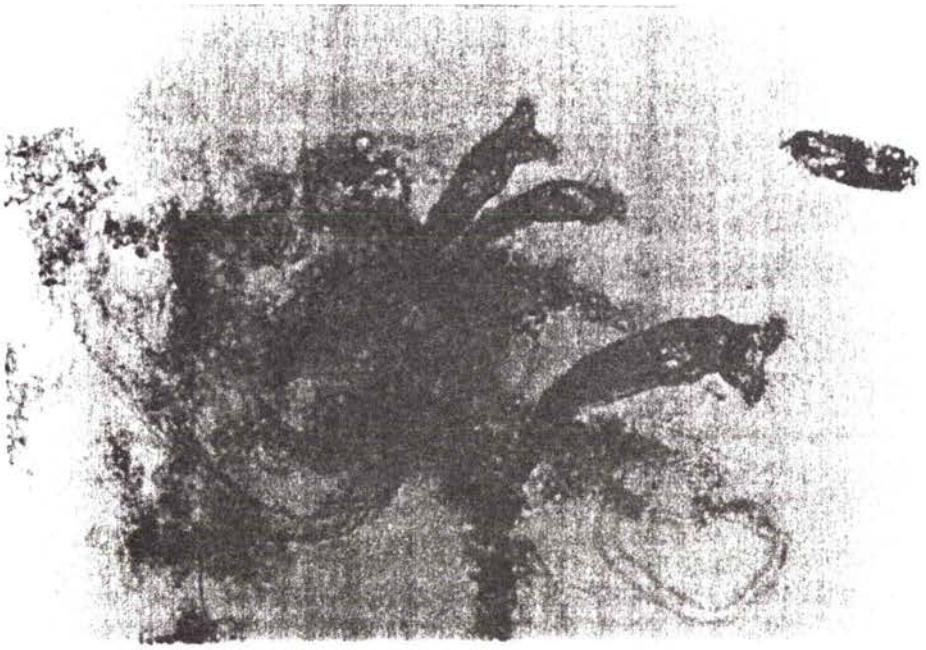


PHOTO N.7

ROTIFERES DU GENRE DIGINONTA ; CES METAZOAIRES SONT CARACTERISTIQUES D'UNE BOUE A FAIBLE CHARGE ET D'ÂGE ELEVEE.

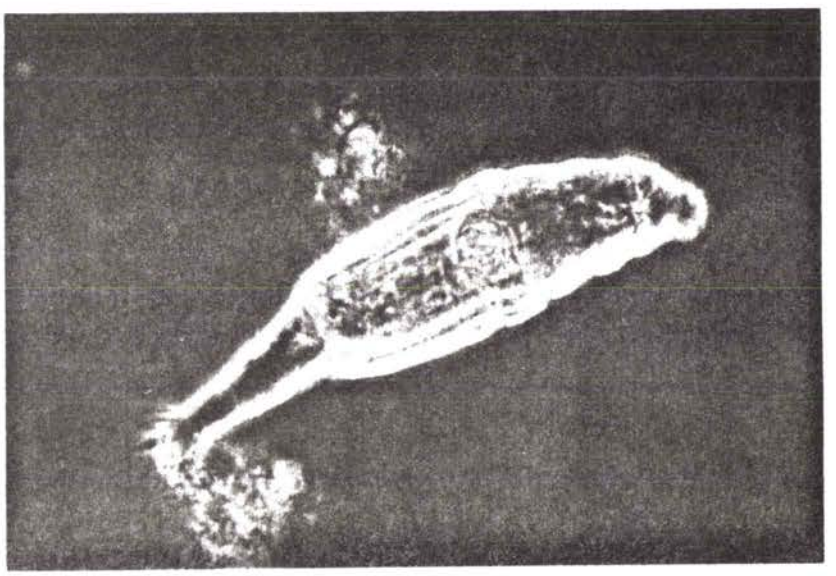


PHOTO N.8 : ROTIFERES DU GENRE ADINETA.

PHOTO N.9

NEMATODES, VERS LISSES DE 100 A 1000 µm, PRESENTS DANS LES BASSINS A MOYENNE ET FAIBLE CHARGE. ILS SONT DETRITIVORES OU PREDATEURS DE PROTOAIRES.

Tableau 14 : Composition chimique du milieu synthétique et des milieux de remplacement utilisés dans le test Consommation d'oxygène des boues activées.

Substances	Milieu synthétique (g/l)	Autres milieux (g/l)			
		N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
Peptone	16	-	-	-	-
Extrait de viande	11	-	-	-	-
Urée	3	-	-	-	-
$K_2H\ PO_4$	2,8	-	-	2,8	-
NaCl	0,7	-	0,7	0,7	-
$CaCl_2\ 2H_2O$	0,4	-	0,4	0,4	-
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,2	-	0,2	0,2	-
Glucose	-	1-10-50-100	100	100	50-100-200
Milieu Afnor T90 312	-	-	-	-	+

- Substances testées

Les substances testées sont présentées au chapitre 4.1.1. Pour les pesticides, un tiers-solvant est utilisé ; l'atrazine est directement solubilisée dans du DMSO et la solution mère de malathion est préparée dans du DMSO 2 %. Aucun effet inhibiteur du tiers-solvant sur la consommation d'oxygène n'a été observé dans nos essais témoins.

5.1.4. Matériel

Le matériel nécessaire à la réalisation du test est le suivant :

- un oxymètre digital CG 867, Beckman.

- des flacons munis de bouchons rôdés taillés en biseau qui permettent après remplissage complet d'éliminer toute bulle d'air. Avec ce type de flacons il est nécessaire d'utiliser, par concentration en toxique, autant de flacons qu'il est prévu de mesures d'oxygène.
  Nous avons aussi testé un des systèmes préconisés par la norme, l'erlenmeyer avec un bouchon en caoutchouc traversé par un tube de verre dans lequel devaient s'échapper les bulles d'air. Mais ce système s'est avéré inefficace.
  Par la suite, nous nous sommes équipés de flacons avec entonnoirs et bouchons rôdés spécialement adaptées aux mesures répétées d'oxygène (Figure 17).

- 3 billes de verre de 1,5 cm de diamètre par fiole.

- un agitateur rotatif qui provoque le mouvement des billes à l'intérieur des fioles assurant ainsi l'homogénisation du milieu réactionnel.

- des filtres à air et des flacons laveurs.

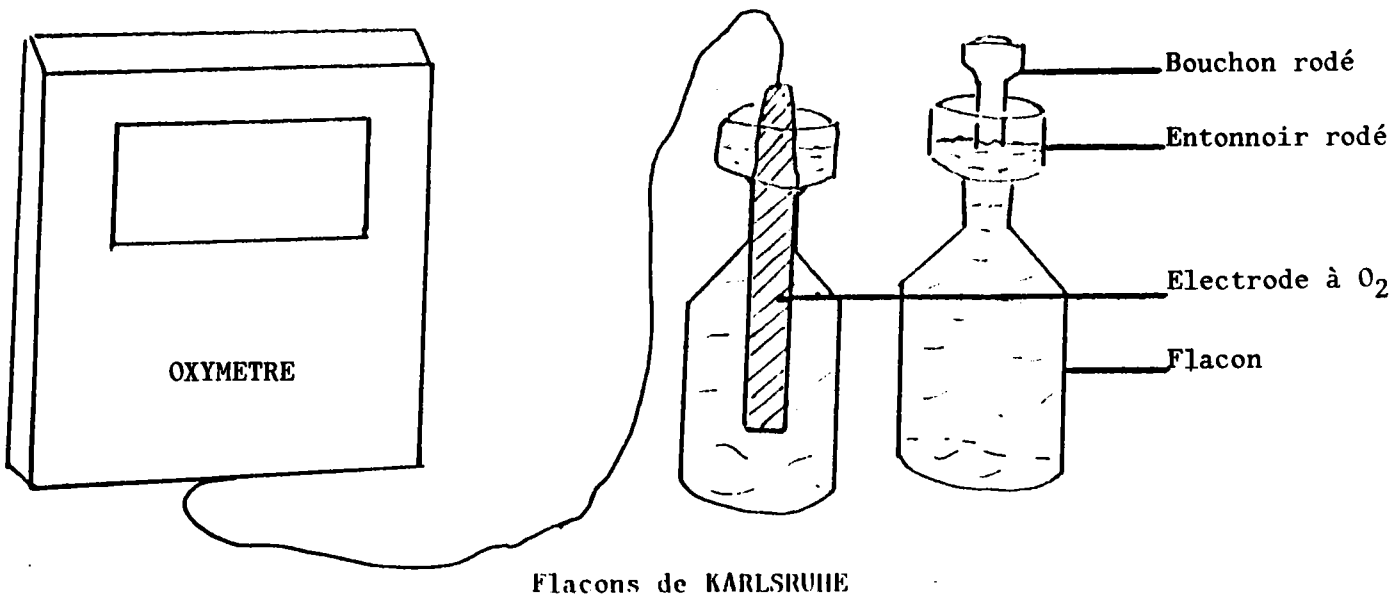


Figure 17 ; Verrerie nécessaire au test Consommation d'oxygène de boues activées.

5.1.5. Protocole expérimental

- Mode opératoire

Le mode opératoire, schématisé dans la figure 18, comporte les étapes suivantes :

- Préparation de la suspension de boues activées

400 ml de boues activées sont prélevées dans le bac d'aération du pilote et centrifugés à 3500 tr/min. pendant 30 minutes. Sur le culot ainsi obtenu, d'une part 3 prélèvements sont effectués afin d'établir un rapport poids frais/poids sec, et d'autre part une suspension mère de boues activées équivalente à environ 1,5 g/l en matière sèche est réalisée par addition de la solution isotonique. Du fait des 24 heures nécessaires à l'obtention du poids sec, la concentration réelle de la suspension de boues activées n'est connue qu'a posteriori.
La suspension de boues activées est utilisée le jour même de sa préparation ou le lendemain.

La norme ISO conseille d'utiliser une suspension mère de boues d'environ 3 g/l en MES, ce qui correspond à 100 mg/l dans le milieu réactionnel. Cependant, avec de telles concentrations en bactéries dans nos essais, la consommation d'oxygène est trop rapide et l'on ne peut réaliser les mesures sur 3 heures.
Nous avons donc utilisé une suspension mère de boues d'environ 1,5 g/l en MES, soit environ 50 mg/l dans le milieu réactionnel, qui nous a permis de respecter le délai du test.

- La phase d'aération

Après avoir été filtré puis humidifié par passage dans des flacons laveurs, l'air est envoyé dans les solutions suivantes :

* la suspension de boues activées à 1,5 g/l en MES

* le milieu synthétique

* l'eau distillée de dilution pour la préparation des milieux réactionnels, contenue dans des erlenmeyers de 1 litre.

- Préparation de la solution de boues activées.

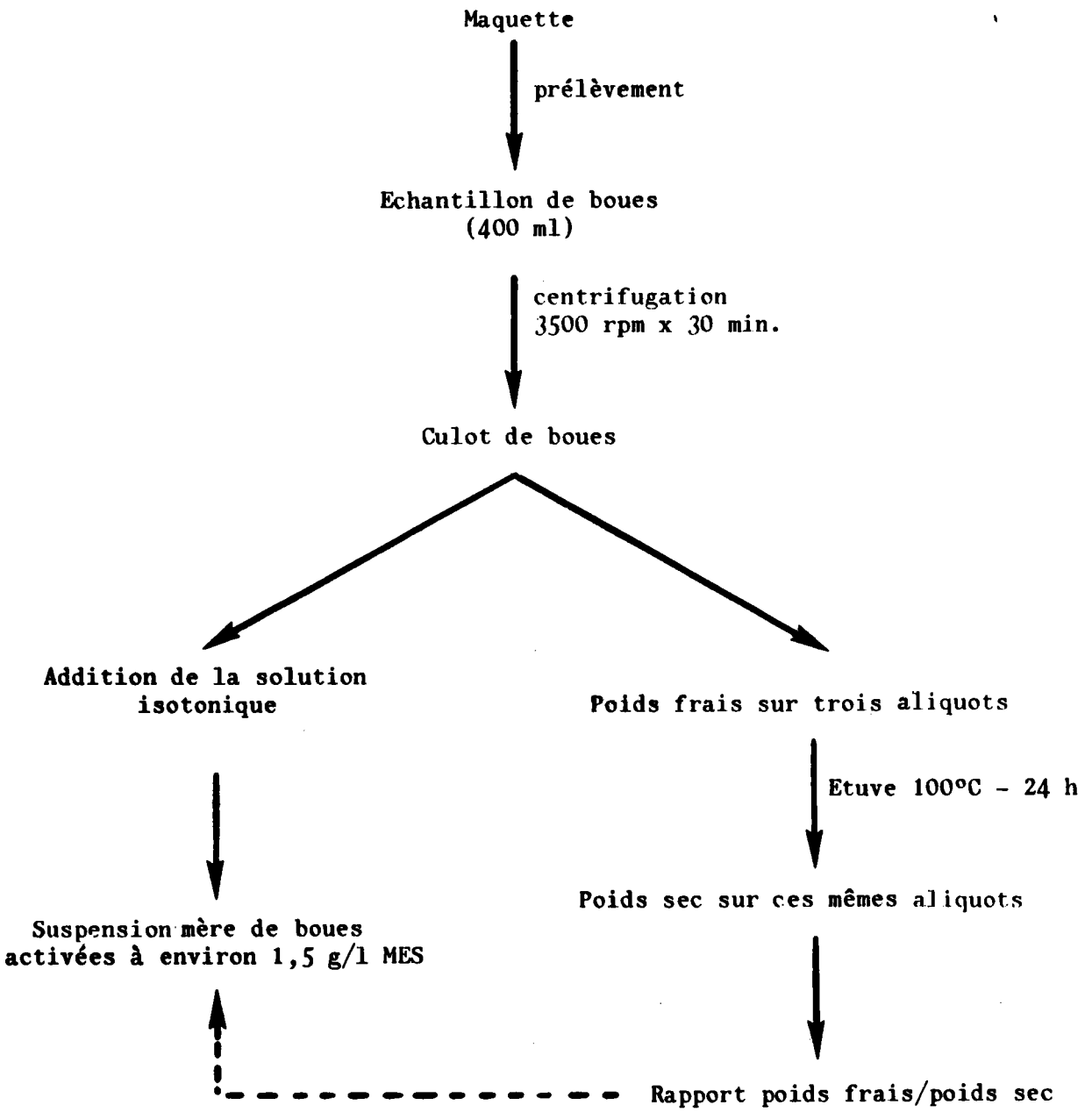
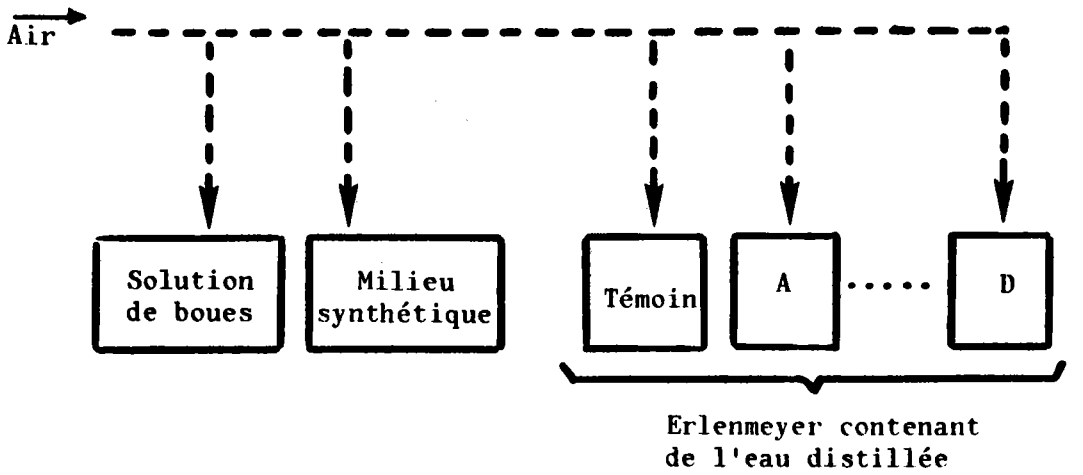


Figure 18 : Résumé des différentes étapes du mode opératoire.

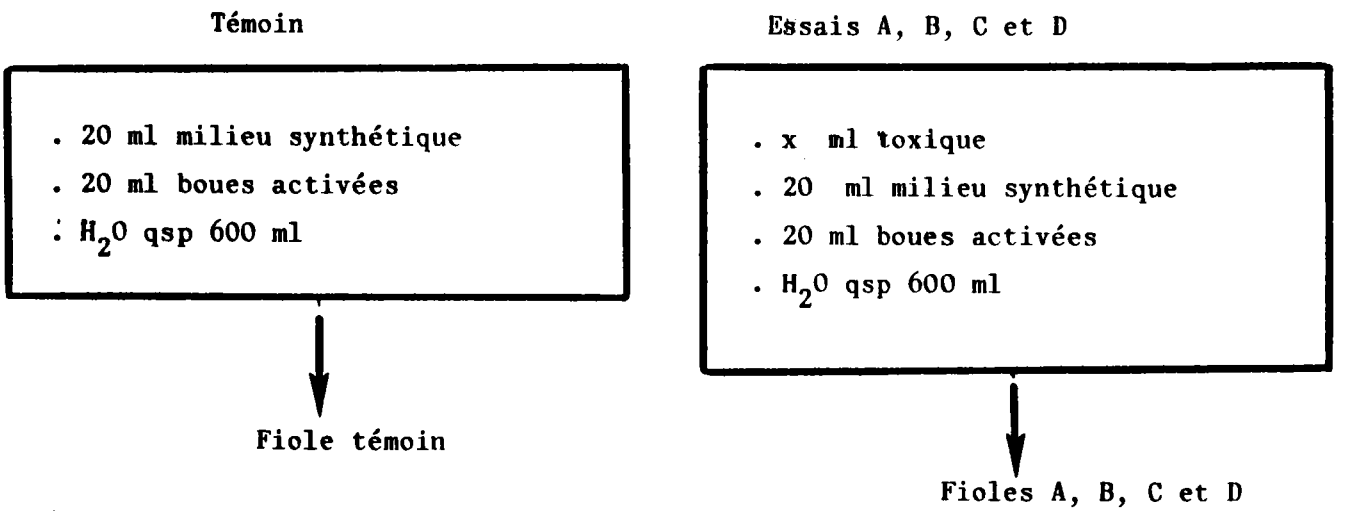
- Phase d'aération

$t° = 20°C \pm 2$

Barbottage durant 30 min.



- Réalisation du milieu réactionnel



- Incubation et mesure d'oxygène dissous

Toutes les 30 min., mesure de la teneur en oxygène dissous dans la fiole témoin et dans les fioles A, B, C et D.

Figure 18 (suite)

Remarque : Dans le cas où la suspension de boues activées n'est pas utilisée le jour même, elle est maintenue sous aération. La norme ISO préconise, si le délai d'attente est supérieur à 24 heures, d'alimenter journellement les boues activées. Mais nos essais préliminaires ont montré une meilleure répétabilité lorsque les boues sont maintenues sans apport nutritif durant 48 heures.

- Réalisation du milieu réactionnel

Dans chaque erlenmeyer, témoin, A, B, C et D, le milieu réactionnel est réalisé par l'addition du toxique (sauf pour le témoin), du milieu synthétique et des boues activées selon le protocole décrit dans la figure 18.

Après agitation manuelle, le contenu de chaque erlenmeyer est réparti dans les fioles de mesure munies d'entonnoir, qui sont ensuite bouchées en évitant toute présence de bulles d'air.

Les fioles sont ensuite placées sur l'agitateur réglé à une vitesse de 100 rpm. Le début de l'agitation correspond au temps To.

- Mesure de la teneur en oxygène dissous

Toutes les 30 min. environ on mesure la teneur en oxygène dissous dans la fiole témoin et dans les fioles contenant le toxique, en ayant soin de suivre l'ordre croissant des concentrations testées. De plus, entre chaque mesure, l'électrode est rinçée avec de l'eau distillée.

5 mesures d'oxygène par fiole sont réalisées en 3 heures. La durée d'une mesure est de 1,30 min., et elle s'effectue sous agitation.

- Test préliminaire

Le test préliminaire est réalisé avec au moins 3 concentrations de la substance à tester, le témoin, et un contrôle physico-chimique sans bactéries avec la plus forte concentration en toxique.
Ce contrôle permet de mettre en évidence une variation de la concentration en oxygène due uniquement à des phénomènes physico-chimiques.

- Test définitif

Le test définitif est réalisé à l'aide d'au moins 4 concentrations en toxique et du témoin. Si une variation d'oxygène a été observée dans le contrôle physico-chimique lors du test préliminaire, des témoins physico-chimiques doivent être effectués pour chaque concentration en toxique.

5.1.6. Expression des résultats

- Consommation d'oxygène

Les concentrations en oxygène dissous mesurées durant 3 heures nous permettent d'apprécier les cinétiques de diminution de l'oxygène dans les milieux testés, exprimées par la consommation d'oxygène en mg O_2 par g de MES et par heure (mg O_2/g MES/h).

- Calcul de la CI_{50}

Le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration en toxique est calculé selon la formule :

$$I\ \% = \frac{C\ \text{témoin} - (C\ \text{essai} - C\ \text{pc})}{C\ \text{témoin}} \times 100$$

C témoin = consommation d'oxygène par g de MES et par h. chez le témoin.
C essai = consommation d'oxygène par g de MES et par h. pour les essais contenant différentes concentrations en toxique.
C pc = consommation d'oxygène par h. chez le témoin physico-chimique.

La courbe "pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en toxique" nous permet de déterminer la CI_{50}, concentration qui inhibe 50 % de la consommation d'oxygène.

Remarque : Les droites ont été obtenues par calcul de régression linéaire, et les CI_{50} ont été calculées à partir de l'équation des droites.

5.1.7. Dosage potentiomètrique du cuivre libre dans le milieu réactionnel

- Réactifs chimiques

Une solution de $NaNO_3$, 5M (27955295, Prolabo) est utilisée pour maintenir une force ionique stable lors des mesures avec l'électrode à cuivre.

La courbe étalon est établie à partir de 2 solutions mères de cuivre respectivement à 0,6 et à 6 g/l.

- Matériel

Le matériel nécessaire à cette étude est le suivant :

- une électrode à cuivre ORION, modèle 9429,
- une électrode de référence simple jonction ORION 90 01,
- un pH-mètre millivoltmètre TACUSSEL, type ISIS 20 000,
- un agitateur magnétique.

- Mode opératoire

La gamme étalon a été établie pour des quantités de cuivre libre, Cu^{++}, comprises entre 6 et 1000 µg contenues dans 50 ml d'eau désionisée, additionnée d'1 ml de $NaNO_3$, 5M.

Les mesures sont ensuite conduites avec l'électrode à cuivre dans 50 ml des milieux étudiés contenant 40 mg/l de $CuSO_4$ (soit 796 µg/l de Cu^{++} théorique), auxquels on ajoute également 1 ml de $NaNO_3$, 5M.
Les valeurs lues reportées sur la gamme étalon nous fournissent les quantités réelles de cuivre libre présent dans les milieux étudiés.

Ces opérations sont effectuées dans une pièce thermostatée à 20 $\pm$ 2°C et les mesures à l'électrode se font sous agitation modérée.

5.2. RESULTATS

5.2.1. Influence du milieu synthétique sur la concentration en cuivre libre

Les mesures de consommation d'oxygène des boues activées sont réalisées en présence d'un substrat, constitué par le milieu synthétique, et nous avons voulu évaluer l'influence que pouvait avoir ce milieu sur la spéciation des toxiques, en prenant comme exemple le cas du cuivre.

Avec une électrode spécifique, la concentration en cuivre libre, Cu^{++} dans le milieu d'essai a été mesurée, après addition de 40 mg/l de $CuSO_4$.

Le milieu d'essai a été réalisé selon le protocole décrit au chapitre 5.1.5., mais la solution isotonique a été ajoutée sans les boues activées, notre objectif étant d'évaluer l'importance des phénomènes de complexation liés essentiellement au substrat.

Le pouvoir complexant de la fraction organique, de la fraction minérale, ainsi que de chaque substance constituant le milieu synthétique, a également été quantifié en respectant les concentrations énoncées dans la norme ISO.

Le pH de chacun des milieux et de la gamme étalon a été ajusté à la valeur de pH mesurée dans le milieu réactionnel complet.

Le tableau 15 regroupe les résultats exprimés en % de cuivre libre par rapport à la quantité théorique additionnée. La gamme étalon est en annexe 2, figure 4.

Ces résultats démontrent l'ampleur des phénomènes de complexation. En effet, dans le milieu réactionnel tel qu'il est utilisé lors du test consommation d'oxygène (hormis le réactif biologique), le cuivre libre ne représente plus que 0,25 % du cuivre additionné.

La fraction organique avec seulement 0,4 % de Cu^{++} est fortement impliquée dans les phénomènes de complexation, et ce sont surtout la peptone et l'extrait de viande qui se lient au cuivre.

L'urée a été testée après autoclavage ou filtration car dans la norme ISO l'urée est autoclavée, alors que nous avons préféré la filtration. Il est intéressant de noter que l'urée filtrée diminue moins fortement la proportion de Cu^{++} que l'urée autoclavée.

La fraction minérale avec 11,1 % de cuivre libre intervient également dans les phénomènes de complexation, et K_2HPO_4 est la substance responsable.

Par contre, $CaCl_2$, NaCl et $MgSO_4$ ne diminuent que faiblement les concentrations en cuivre libre.

Dans l'eau désionisée, on ne retrouve que 90,5 % de cuivre libre. Ce résultat peut être expliqué par des phénomènes de précipitation liés au pH. Compte tenu de la difficulté à ajuster le pH dans l'eau désionnisée, la mesure a été effectuée à pH 6,9 alors que pour les autres milieux, le pH est compris entre 6,1 et 6,21.

Signalons enfin que le glucose à la concentration de 2 g/l ne complexe que faiblement le cuivre (93,4 % de Cu^{++}).

Tableau 15 : Mesure du cuivre libre dans divers milieux réactionnels.

Milieu testé	pH	Pourcentage de cuivre libre*
Eau désionisée	6,94	90,5
Substrat total	6,19	0,25
Fraction organique	6,14	0,4
Peptone	6,21	0,6
Extrait de viande	6,10	1,7
Urée filtrée	6,14	84,3
Urée autoclavée	6,19	64,9
Fraction minérale	6,17	11,1
$K_2H\ PO_4$	6,18	10,1
$CaCl_2$, $2\ H_2O$	6,15	82,9
NaCl	6,17	88,4
$MgSO_4$, $7\ H_2O$	6,18	87,7

* Pourcentage de cuivre libre = Cu^{++} mesuré/Cu^{++} théorique x 100

5.2.2. Consommation d'oxygène de boues activées en présence d'autres milieux

La mise en évidence des phénomènes de complexation du cuivre par le milieu synthétique nous a conduit à envisager des milieux de substitution pour le test inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées.

Le tableau 16 regroupe les quelques essais que nous avons réalisés avec le glucose, seul ou en présence d'éléments minéraux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité respiratoire mesurée avec le milieu synthétique.

Tableau 16 : Activité respiratoire des boues activées avec différents milieux.

Glucose* (g/l)	Activité respiratoire (%)			
	Milieu N° 1**	Milieu N° 2**	Milieu N° 3**	Milieu N° 4**
0,03	28	-	-	-
0,33	28	-	-	-
1,67	14	-	-	38
3,33	21	33	66	37
6,67	-	-	-	37

* Concentration finale en glucose dans le milieu réactionnel

** Pour la composition précise des milieux 1, 2, 3 et 4, cf. tableau 14

Les milieux de substitution testés n'assurent pas une consommation d'oxygène suffisante des boues activées qui permettent la réalisation des tests d'inhibition. Seul le milieu N° 3 montre une activité relativement importante, mais il contient K_2HPO_4 dont nous avons vu précédemment le pouvoir complexant, ce qui exclut son utilisation comme milieu de remplacement du milieu synthétique.

Faute d'une activité respiratoire suffisante avec les milieux de remplacement testés, l'étude de la répétabilité et de la sensibilité du test Consommation d'oxygène des boues activées sera donc conduite en présence du milieu synthétique selon le protocole décrit au chapitre 5.1.5.

B.U. METZ

5.2.3. Consommation d'oxygène chez les témoins

Préalablement à toute étude de toxicité, la variabilité de l'activité respiratoire de témoins préparés à partir d'un même échantillon de boues activées a été recherchée. Le taux de consommation spécifique d'oxygène calculé sur 5 essais est de 40,2 $\pm$ 1,5 mg O_2/g de MES/h, d'où un coefficient de variation de 3,7 %. La variabilité entre témoins pour un même échantillon de boues activées est donc faible.

Par contre, l'activité respiratoire spécifique moyenne, calculée sur l'ensemble des témoins des tests de toxicité conduits avec des échantillons de boues activées différents (n = 26), est égale à 53,4 $\pm$ 25,1 mg O_2/g de MES/h, ce qui nous donne un coefficient de variation très élevé de 47 %.

Cette activité respiratoire spécifique moyenne explique le choix d'une concentration en MES de 50 mg/l dans le milieu d'essai (soit environ 1,5 g/l dans la suspension mère de boues activées) pour que soit assurée une consommation optimale d'oxygène durant 3 heures.

5.2.4. Etude de la répétabilité

- Toxicité du 3-5 dichlorophénol

Un exemple est donné dans la figure 19 des mesures d'oxygène dissous dans l'essai témoin et les essais avec toxique.

La CI_{50} est ensuite calculée à partir de la droite dose-effet représentée dans la figure 20.

Les résultats obtenus lors de l'étude de la répétabilité au travers de l'évaluation de la toxicité du 3-5 dichlorophénol figurent dans le tableau 17.

Les coefficients de variation résultant d'essais avec un même échantillon de boues activées sont compris entre 4 et 15 %.

La CI_{50} calculée sur 8 essais avec des échantillons de boues activées différents est égale à 10,05 $\pm$ 1,47 mg/l.
La répétabilité du test est donc caractérisée par un coefficient de variation de 14,6 %.

Ce tableau met également en évidence l'absence de corrélation entre les taux spécifiques de consommation d'oxygène chez les témoins, et les valeurs des CI_{50} correspondantes obtenues avec le 3-5 dichlorophénol.

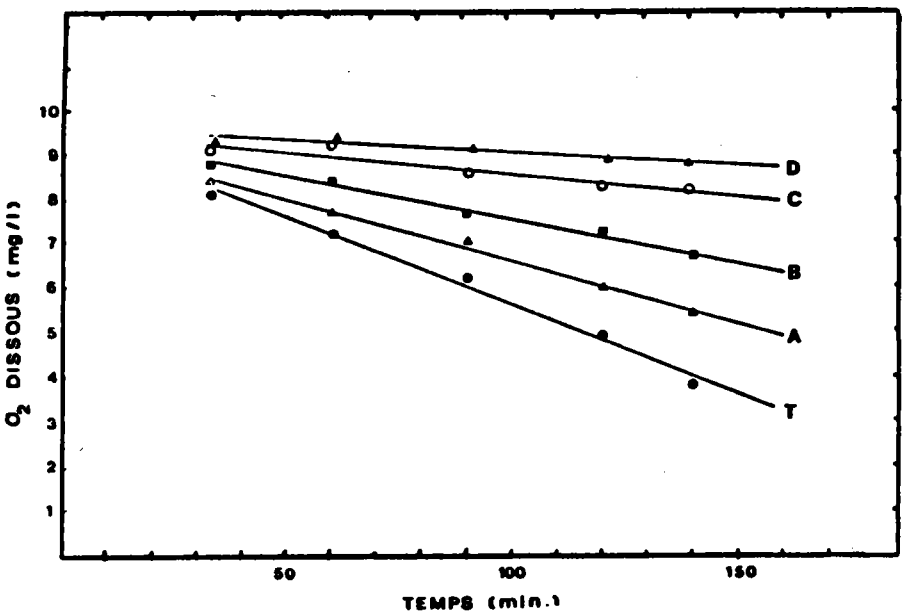


Figure 19 : Consommation d'oxygène des boues activées dans l'essai témoin (●), et les essais A, B, C et D contenant respectivement ▲ 5 mg/l, ■ 10 mg/l, o 15 mg/l et ▲ 20 mg/l de 3-5 dichlorophénol.

Activité témoin = 64,8 mg O_2/h/g de M.S. (matière sèche)
Activité essai A = 45,8 mg O_2/h/g de M.S.
Activité essai B = 32,2 mg O_2/h/g de M.S.
Activité essai C = 16,4 mg O_2/h/g de M.S.
Activité essai D = 9,2 mg O_2/h/g de M.S.

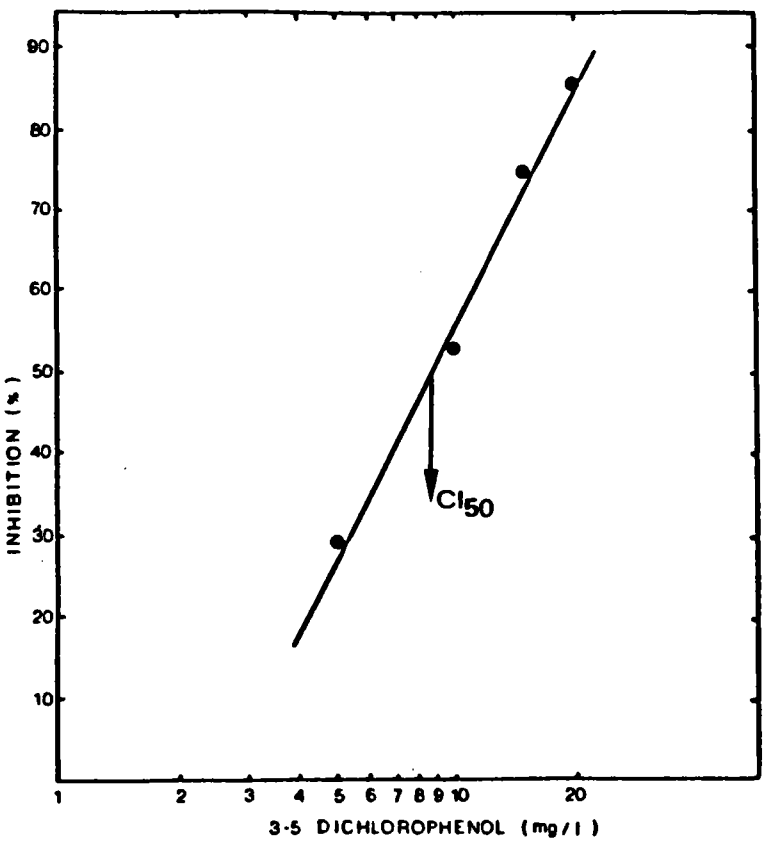


Figure 20 : Exemple de relation dose-effet du 3-5 dichlorophénol sur la consommation d'oxygène de boues activées permettant la détermination de la CI_{50}.

Tableau 17 : CI_{50} (mg/l) du 3-5 dichlorophénol évaluée au moyen du test Consommation d'oxygène des boues activées.

Consommation spécifique d'oxygène chez les témoins (mg O_2/g de MES/h)	Nombre d'essais	CI_{50}-moyenne ± écart-type (mg/l)	Coefficient de variation (%)	*Intervalle de confiance de la CI_{50} (mg/l)
57,2	3	9,05 ± 0,89	9,9	9,05 ± 3,84
74,6	3	10,80 ± 0,44	4,1	10,80 ± 1,91
84,8	3	10,19 ± 1,55	15,2	10,19 ± 6,67
115,3	2	7,42	-	-
99	2	11,94	-	-
46,3	2	9,77	-	-
83,3	1	9,49	-	-
44,4	1	11,70	-	-

CI_{50}-moyenne = 10,05 ± 1,47 mg/l

* Intervalle où l'on a 95 % de chances de trouver la CI_{50} du 3-5 dichlorophénol pour un échantillon donné de boues activées (m ± t Sx)

- Toxicité du sulfate de cuivre

Les courbes représentatives des relations "O_2/f(temps)" et "Inhibition en fonction du logarithme de la concentration en toxique" sont données dans les figures 21 et 22.

Les résultats des tests sur le sulfate de cuivre sont résumés dans le tableau 18.

Tableau 18 : CI_{50} (mg/l) de $CuSO_4$ évaluée au moyen du test Consommation d'oxygène des boues activées.

Consommation spécifique d'oxygène chez les témoins (mg O_2/g de MES/h)	Nombre d'essais	CI_{50}-moyenne ± écart-type (mg/l)	Coefficient de variation (%)	*Intervalle de confiance de la CI_{50} (mg/l)
96,7	3	21,51 ± 1,61	7,5	21,51 ± 6,93
63,7	3	21,75 ± 1,95	9	21,75 ± 8,39
59,4	1	20,90	-	-
59,7	1	23,34	-	-
40,6	1	31,19	-	-

CI_{50}-moyenne = 23,74 ± 4,26 mg/l

* Intervalle de confiance où l'on a 95 % de chances de trouver la CI_{50} de $CuSO_4$ pour un échantillon donné de boues activées (m ± t Sx)

Pour les essais menés avec un même réactif biologique, les coefficients de variation restent inférieurs à 9 %.

La moyenne des CI_{50} obtenues avec différents échantillons de boues activées est égale à 23,74 ± 4,26 mg/l en $CuSO_4$, soit 9,45 ± 1,70 mg/l en Cu^{++}, ce qui nous donne une variabilité de 18 % pour l'étude de la répétabilité.

Signalons également l'absence de corrélation entre l'activité respiratoire spécifique des témoins et les résultats des tests de toxicité avec $CuSO_4$ exprimés par les CI_{50}.

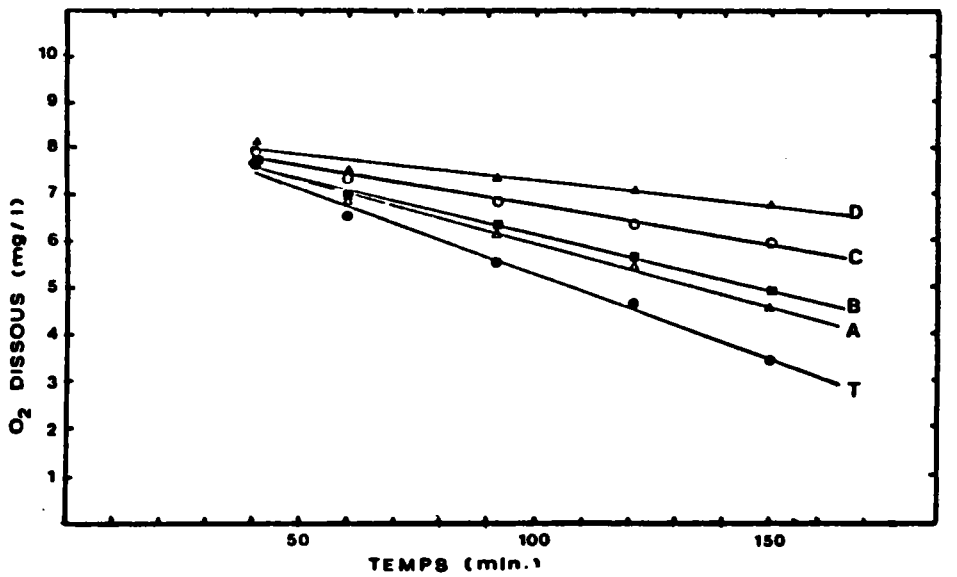


Figure 21 : Consommation d'oxygène des boues activées dans l'essai (●), et les essais A, B, C et D contenant respectivement △ 10 mg/l, ■ 15 mg/l, ○ 25 mg/l et ▲ 40 mg/l en $CuSO_4$.

Activité témoin = 59,7 mg O_2/h/g de M.S. (matière sèche)
Activité essai A = 45,2 mg O_2/h/g de M.S.
Activité essai B = 39,9 mg O_2/h/g de M.S.
Activité essai C = 28,8 mg O_2/h/g de M.S.
Activité essai D = 18,8 mg O_2/h/g de M.S.

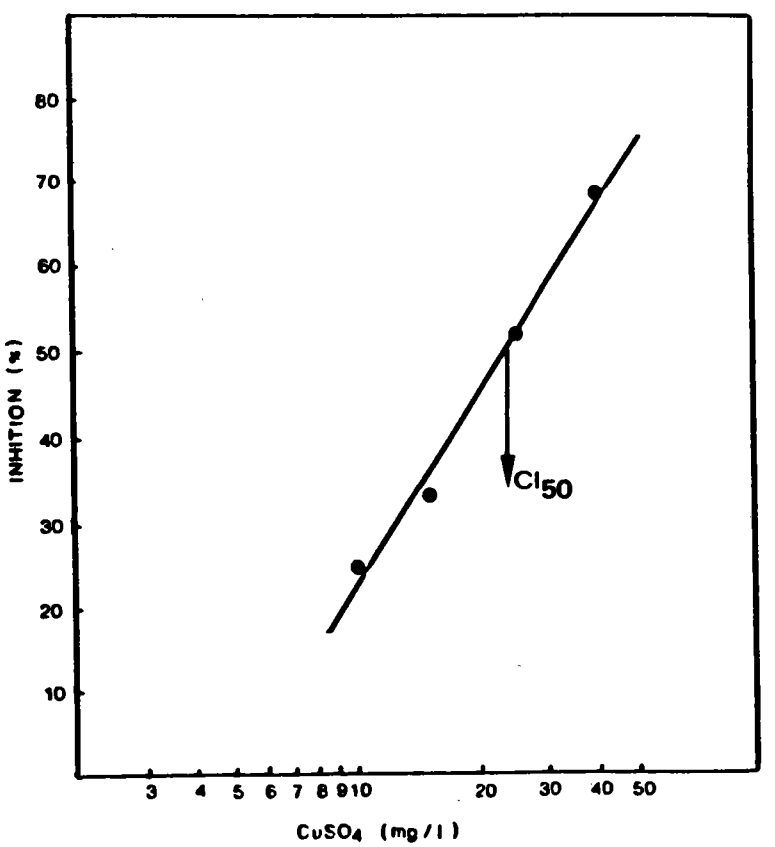


Figure 22 : Exemple de relation dose-effet de $CuSO_4$ sur la consommation d'oxygène de boues activées permettant la détermination de la CI_{50}.

5.2.5. Evaluation de la CI_{50} de quelques substances chimiques

Afin d'évaluer la sensibilité du test "Inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées", 11 substances chimiques minérales et organiques ont été soumises à ce bioessai, et le tableau 19 regroupe les CI_{50} exprimées en mg/l.

Tableau 19 : CI_{50} (en mg/l) de quelques substances chimiques évaluée au moyen du test Consommation d'oxygène de boues activées.

Substances testées	CI_{50} -Consommation d'oxygène (mg/l)	Seuils de toxicité (mg/l)
Cu^{++}	9,45 ± 1,70	CI_{10} = 2,5
Cd^{++}	3,8	CI_{20} = 0,8
Zn^{++}	4,8	CI_{10} = 1,1
Cr^{6+}	10,1	CI_{20} = 1,8
3-5 dichlorophénol	10,05 ± 1,47	CI_{10} = 3,7
Benzène	730,9	CI_{20} = 267
Dibromo 1-2 éthane	842,6	CI_{20} = 115
Diéthylamine	165,8	CI_{10} = 85
Acide dodécylbenzène sulfonique	73,1	CI_{10} = 13,2
Atrazine	NT*	-
Malathion	NT*	-

CI_{50} - $CuSO_4$ = 23,7 ± 4,3 mg/l

* NT = Non Toxique à 100 mg/l

Les résultats obtenus révèlent la faible sensibilité de ce bioessai bactérien aux toxiques testés ; en effet, sur 11 substances chimiques, 5 substances seulement montrent des CI_{50} inférieures ou égales à 10 mg/l.

Tous les toxiques minéraux testés induisent un effet inhibiteur sur la consommation d'oxygène des boues activées, avec par ordre décroissant de toxicité le cadmium, le zinc, le cuivre et le chrome. Et les CI_{50} pour ces substances se situent entre 4 et 10 mg/l.

Par contre le test consommation d'oxygène apparaît peu sensible à l'action des substances organiques, puisque seul le 3-5 dichlorophénol montre une CI_{50} proche de 10 mg/l.
Avec les pesticides, aucun effet inhibiteur n'a été observé aux concentrations maximales testées, soit 100 mg/l.
Quant aux autres substances organiques, acide dodécylbenzène sulfonique, diéthylamine, benzène et dibromo 1-2 éthane, les CI_{50} ont bien été déterminées mais pour des doses très fortes.

Enfin, nous signalons que comme dans le test Microtox, la diéthylamine montre une action toxique sur la consommation d'oxygène qui s'amplifie très rapidement en fonction des concentrations, ce dont témoigne la forte pente de la relation dose-effet.

6 - ETUDE EXPERIMENTALE DU TEST "INHIBITION DE LA MINERALISATION DU GLUCOSE CHEZ ESCHERICHIA COLI"

Avec le test "Inhibition de la minéralisation du glucose U-^{14}C chez Escherichia coli" la méthodologie proposée est la résultante de travaux présentés dans la partie "Résultats":

- La concentration en bactéries et la durée d'incubation assurant une mesure correcte de la minéralisation du glucose ont été recherchées.
- L'influence sur les résultats des tests du délai d'utilisation et du mode de préparation du réactif bactérien a été contrôlée.
- Enfin, un bilan a permis de déterminer la proportion du glucose respectivement assimilé et minéralisé durant l'essai.

Faisant suite à ces travaux d'optimisation de l'essai, la répétabilité et la sensibilité du test ont également été étudiées.

6.1. MATERIEL ET METHODES

6.1.1. Réactifs

- Milieu de culture et solutions chimiques

Escherichia coli (ATCC 11303) est cultivée sur Plate Count Agar, PCA (0479011, OSI).

Les solutions suivantes sont nécessaires à la réalisation du test :

- sérum physiologique stérile, 7 g/l NaCl,
- glucose uniformément marqué au carbone 14 (U-^{14}C) d'activité totale 100 µCi (CB1 D-Glucose, CEA). Cette solution mère est diluée dans 50 ml d'eau distillée stérile qui sont répartis dans des tubes en plastique bouchés, de contenance 2 ml, avant congélation,
- phényl-2-éthylamine (7342, Merck),
- acide sulfurique, H_2SO_4 5N (9912, Merck),
- liquide scintillant Redisolve (TM HP/B, Beckman).

- Substances testées

Les toxiques testés sont présentés au chapitre 4.1.1.
Les solutions mères de pesticides, atrazine et malathion, ont été préparées directement dans du DMSO, et nos essais ont montré que le tiers-solvant n'a pas d'effet inhibiteur aux concentrations testées.

6.1.2. Matériel

La réaction de consommation de glucose s'effectue dans des erlenmeyers à large col de 50 ml, munis d'un puits central dans lequel est placé une petite cupule contenant la phényléthylamine capteur de CO_2 (Figure 23).

Ces erlenmeyers sont fermés hermétiquement par des bouchons en caoutchouc (4010100, Leune) surmontés de parafilm. A travers le bouchon est insérée une aiguille à ponction lombaire (622.1.1/2, Polylabo Paul Block) surmontée d'une seringue de 1 ml (01228, Polylabo Paul Block).

Un agitateur permettant une mouvement latéral assure l'homogénisation du milieu lors de la consommation du glucose, et une fixation efficace du CO_2.
La réaction a lieu dans une pièce thermostatée à 20 $\pm$ 2°C.
La radioactivité est mesurée sur un compteur à scintillation Intertechnique SL 4000 relié à une imprimante.

6.1.3. Protocole expérimental

- Préparation du réactif biologique

Escherichia coli cultivé sur milieu PCA à 37°C pendant 24 heures, est repiquée successivement 3 fois. Les bactéries sont ensuite prélevées par raclage et mises en suspension dans le sérum physiologique stérile de façon à atteindre environ 50 10^5 bactéries par ml.

Cette concentration est obtenue à partir d'une courbe étalon "$DO_{620\,nm}$ en fonction du nombre de bactéries cultivables sur milieu PCA" préalablement établie (Annexe 3, figure 5). Lors de chaque expérience, la concentration en bactéries est cependant mesurée avec plus de précision par une numération en inclusion.

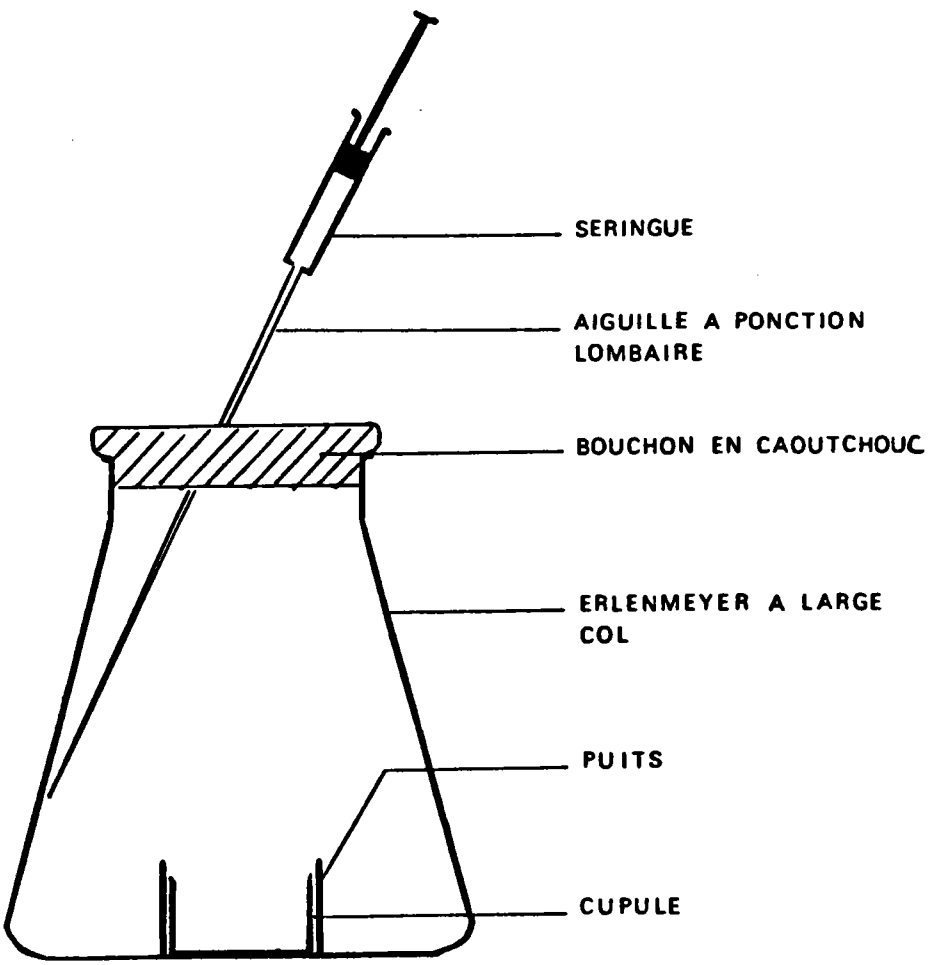


Figure 23 : Matériel utilisé dans le test "Inhibition de la minéralisation du glucose chez Escherichia coli".

La suspension bactérienne est ensuite placée sous agitation durant 1 h avant la réalisation des essais, afin d'assurer une bonne homogénisation du réactif bactérien.

Les différentes étapes de la préparation du réactif biologique sont résumées dans la figure 24 ci-dessous.

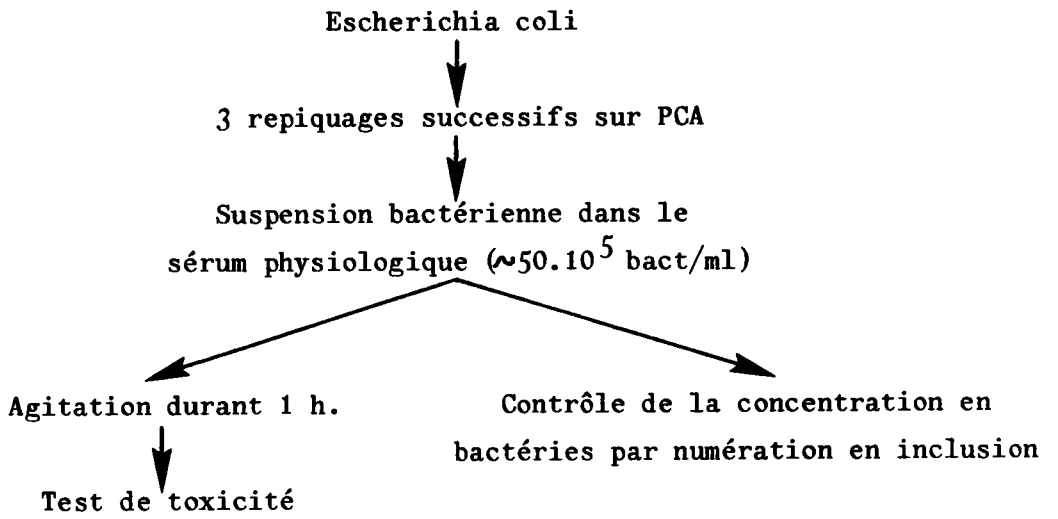


Figure 24 : Préparation du réactif biologique pour le test "Minéralisation du glucose chez Escherichia coli".

Remarque : Quelques essais ont été réalisés avec Escherichia coli préalablement cultivé en milieu liquide (Annexe 4). Et les résultats de toxicité obtenus pour le 3-5 dichlorophénol sont du même ordre de grandeur lorsque les bactéries sont préalablement cultivées sur gélose ou en milieu liquide.

- Réalisation du test

La vitesse initiale de minéralisation du glucose U-^{14}C est obtenue à partir des cinétiques du $^{14}CO_2$ libéré durant 12 min.

Chaque cinétique pour le témoin et les différentes concentrations en toxique, est réalisée avec 6 erlenmeyers contenant le milieu réactionnel, un erlenmeyer par temps d'incubation (0 - 4 - 6 - 8 - 10 et 12 min.).

Les contraintes expérimentales ne permettent pas d'effectuer l'ensemble des cinétiques conjointement. Nous avons donc mené simultanément une cinétique témoin et une cinétique avec une concentration donnée en toxique, soit 12 erlenmeyers, et nous avons répété cette opération pour chaque concentration en toxique testée.

Dans un premier temps, nous avons distribué 5 ml de la suspension bactérienne dans l'ensemble des erlenmeyers.
Puis, au niveau de chaque erlenmeyer des cinétiques témoin et toxique menées conjointement, sont additionnés successivement :

- 200 µl de phényléthylamine dans la cupule centrale,

- 500 µl de H_2SO_4 pour les temps 0,

- x µl de la substance à tester, ou x µl d'eau distillée stérile pour le témoin, suivi d'une rapide agitation manuelle,

- 100 µl de glucose U-^{14}C (15 s. après le toxique), ce qui correspond à une concentration finale de 24 µg/l.

L'erlenmeyer est ensuite rapidement fermé avec le bouchon en caoutchouc percé d'une aiguille, sur laquelle on fixe une seringue contenant 500 µl de H_2SO_4, 5N.
Puis l'erlenmeyer est placé sur un agitateur réglé à 100 rpm.

Le début de la réaction correspond à l'addition du glucose.
La minéralisation du glucose est stoppée aux temps désirés (4, 6, 8, 10 ou 12 min.) par injection dans le milieu réactionnel des 500 µl de H_2SO_4 au moyen de la seringue. L'acide permet également au CO_2 dissous dans le milieu de passer à l'état gazeux.

L'erlenmeyer est laissé sous agitation pendant au moins 4 heures, afin d'assurer une fixation complète du CO_2 par la phényléthylamine.

La cupule contenant la phényléthylamine est ensuite récupérée et placée dans un flacon à scintillation avec 15 ml de liquide scintillant.

Après une période de stabilisation d'une heure à l'obscurité, les échantillons sont comptés successivement 3 fois durant 4 minutes. La méthode des rapports des canaux est utilisée pour la conversion des cpm (coups par minute) en dpm (désintégrations par minute).

La figure 25 résume les différentes étapes du protocole expérimental.

Remarque : Pour les substances de faible toxicité ou peu solubles, le protocole peut être modifié afin de permettre un apport en toxique plus important ; à 1 ml de réactif bactérien contenant 25 10^6 bact./ml sont additionnés 4 ml de la substance à tester, puis 100 µl de la solution de glucose U-^{14}C.

6.1.4. Expression des résultats

- Mesure du CO_2 libéré

La radioactivité mesurée au temps 0 pour la cinétique témoin et pour chaque cinétique en présence de toxique, est retranchée aux valeurs obtenues pour les différents temps de mesure. Cette radioactivité correspond au mouvement propre de l'appareil et éventuellement à une libération chimique de CO_2.

La radioactivité ainsi obtenue après 4, 6, 8, 10 ou 12 min. de contact substrat-bactéries pour le témoin et pour chaque concentration en toxique nous permet de tracer la droite "$^{14}CO_2$ libéré (dpm) en fonction du temps (min.)". On détermine ainsi à partir des pentes des droites, le taux de $^{14}CO_2$ émis par minute.

- Calcul de la CI_{50}

Le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration en toxique est calculé par rapport à son propre témoin selon la formule :

$$I\ \% = \frac{R\ \text{témoin} - R\ \text{toxique}}{R\ \text{témoin}} \times 100$$

R témoin = taux de $^{14}CO_2$ libéré (dpm/min.) pour le témoin
R toxique = taux de $^{14}CO_2$ libéré (dpm/min.) pour chaque concentration en toxique.

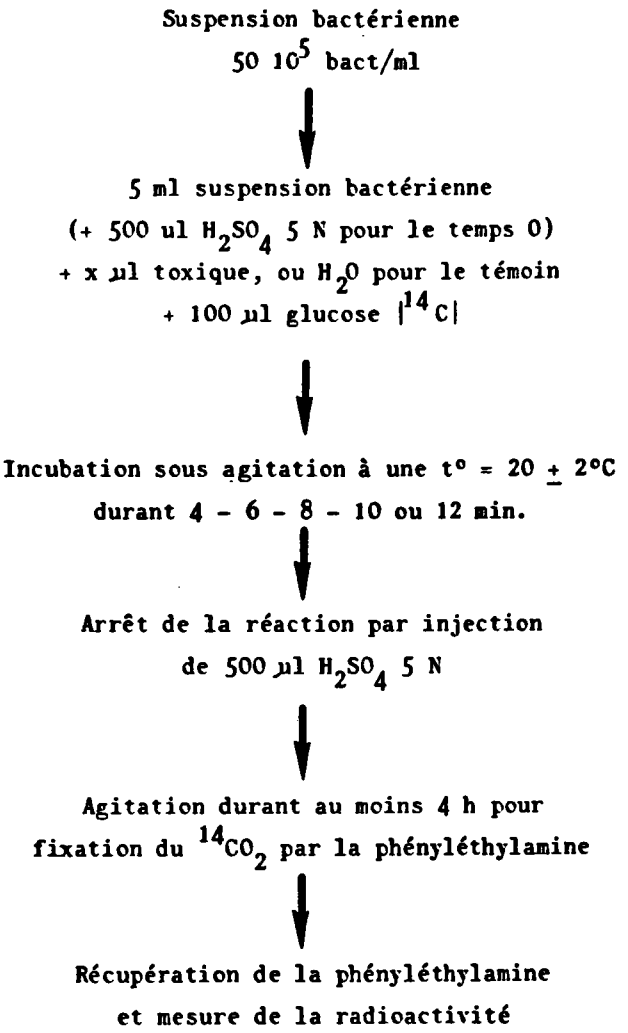


Figure 25 : Protocole expérimental du test "Minéralisation du glucose chez Escherichia coli".

La courbe "pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme de la concentration en toxique" nous permet de déterminer la concentration qui inhibe 50 % de la minéralisation du glucose, la CI_{50}.

Remarque : Les droites ont été obtenues par calcul de régression linéaire, et les CI_{50} ont été calculées à partir de l'équation des droites.

6.2. RESULTATS

6.2.1. Influence de la concentration en bactéries sur la minéralisation du glucose

Dans le but de développer un test de toxicité rapide, une cinétique sur une dizaine de minutes a été choisie, et nous avons étudié l'influence de la concentration en bactéries sur la minéralisation du glucose apporté à la concentration de 24 ug/l.

Deux concentrations en bactéries ont été testées, 50 10^5 et 10^8 bact./ml. La figure 26 montre que pour 50 10^5 bact./ml, la cinétique de libération du CO_2 sur 14 minutes peut être linéarisée. Par contre, pour une concentration supérieure en bactéries (Figure 27), le substrat devient limitant après environ 6 min., et le taux de minéralisation diminue.

La concentration de 50 10^5 bact./ml a donc été sélectionnée, d'autant qu'elle nous rapproche des concentrations en bactéries des eaux de rivière.

Lorsque les mesures de $^{14}CO_2$ libéré par 50 10^5 bact./min. sont poursuivies sur une période de 2 heures (Figure 28), la linéarité de la cinétique est observée jusqu'à environ 25 minutes.
Dans notre test, la cinétique de minéralisation du glucose étant réalisée sur 12 minutes, nous avons donc une marge de sécurité suffisante qui nous assure que le substrat ne sera pas limitant.

6.2.2. Mise en évidence d'un facteur "temps" sur le taux de minéralisation du glucose

Toutes les cinétiques ne pouvant être réalisées simultanément, les bactéries vont rester en attente durant des temps variables avant d'être soumises à la réaction de minéralisation du glucose. Et nous avons étudié l'influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur le taux de CO_2 libéré en l'absence de toxique.

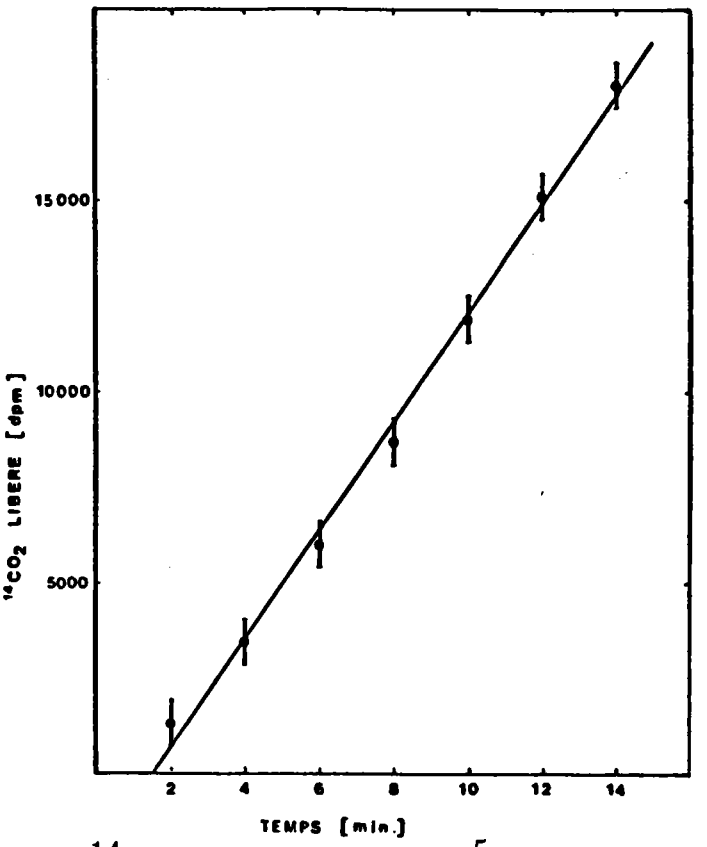


Figure 26 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par 56,5 10^5 bact/ml.
Chaque point représente la moyenne de 2 essais (n = 2) et l'intervalle de confiance à 5 % est calculé à partir de la variance moyenne "S" selon la formule : $m \pm t \frac{S}{\sqrt{n}}$ avec $t_{0,05}$ = (n-1) x k
= (2-1) x 7 = 7 ddl

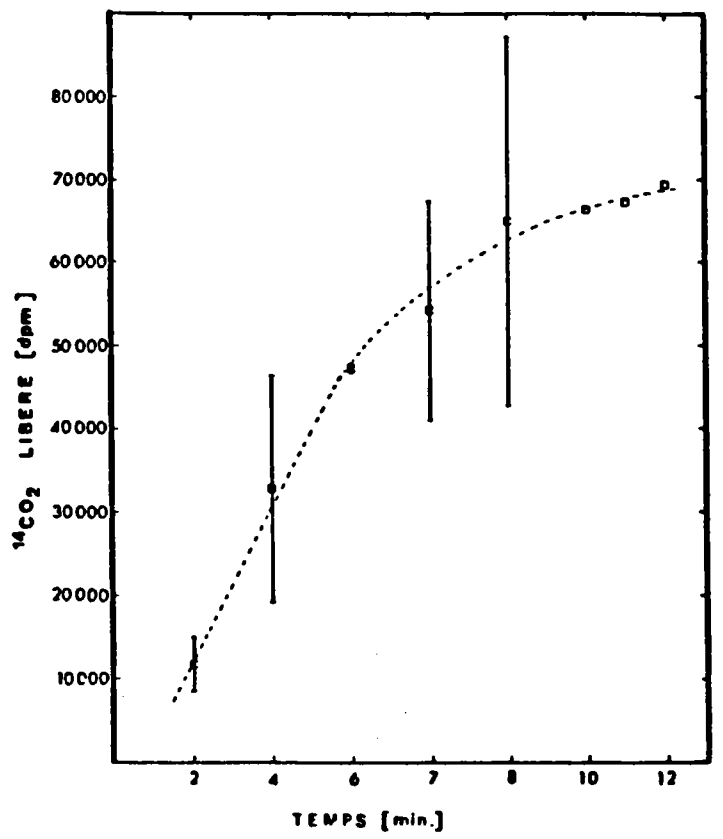


Figure 27 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par 9,7 10^7 bact/ml.
Lorsque 2 essais ont été réalisés pour un même temps de réaction, l'intervalle de confiance à 5 % de la moyenne est calculé selon la

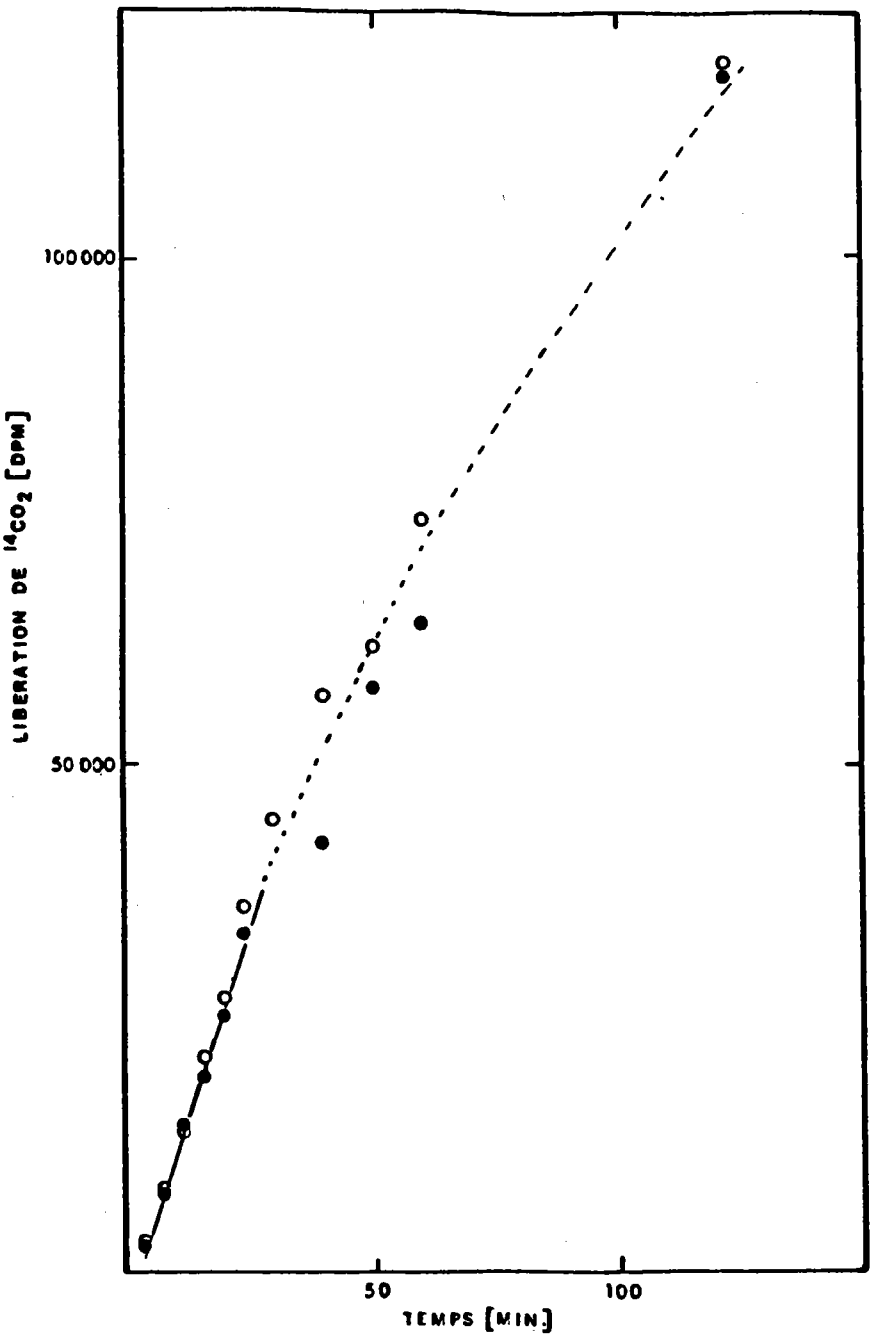


Figure 28 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré sur une période de 2 h par 44,5 10^5 bact/ml.
2 essais ont été réalisés.

La figure 29 montre une forte augmentation de l'activité durant les premières heures d'attente avec une tendance à la stabilisation à partir de 4 heures. L'augmentation d'activité durant les premières heures d'attente est sans doute imputable à une diminution des ressources énergétiques des bactéries en suspension dans le sérum physiologique, et l'apport de glucose s'accompagne d'une rapide minéralisation afin de reconstituer les stocks d'énergie.

Dans une expérience ultérieure, nous avons observé qu'après 7 heures de délai d'attente, l'activité mesurée est inférieure à l'activité initiale. Et cette diminution d'activité s'accompagne d'une baisse du nombre de germes viables (Tableau 20).

Tableau 20 : Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur le taux de minéralisation du glucose et sur le nombre de germes viables.

Délai d'utilisation (h.)	Taux de CO_2 libéré m ± Sx (2 répétitions) (dpm/min.)	Nombre de bactéries viables (bact./ml)
0	1570,55 ± 17,30	46 10^5
7	1275,21 ± 94,80	ND*
22,5	569,14 ± 22,03	14 10^5

* ND = Non déterminé

Du fait de la variabilité du taux de minéralisation du substrat en fonction du délai d'utilisation du réactif bactérien, nous avons pour chaque concentration en toxique, réalisé simultanément un témoin. Nous avons aussi veillé à ce que le test soit terminé dans les 5 heures après préparation du réactif biologique.

6.2.3. Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur les résultats de toxicité

Suite à la mise en évidence d'un facteur "temps" sur l'activité des bactéries, nous avons vérifié que la méthodologie suivie lors des essais de toxicité assurait des résultats fiables.

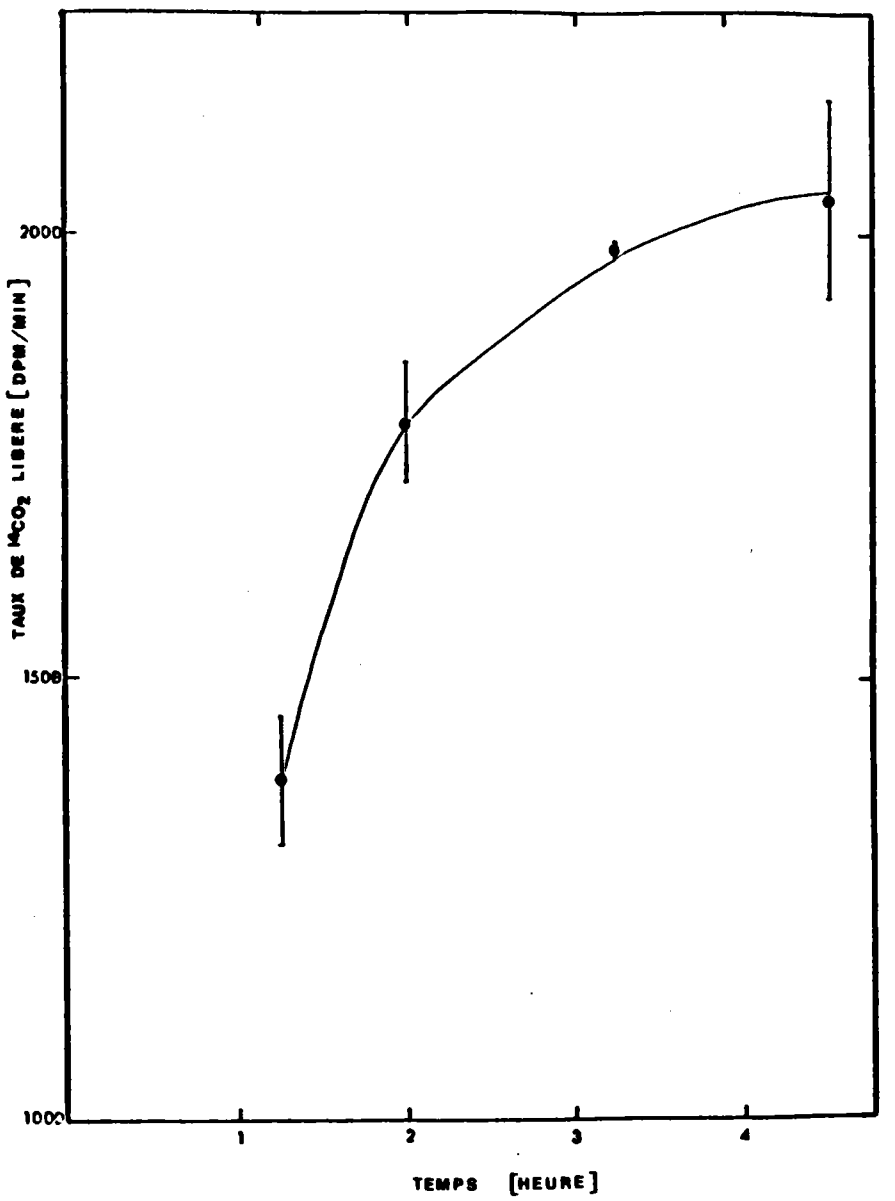


Figure 29 : Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur le taux de minéralisation du glucose par 35 10^5 bact./ml. Chaque point représente la moyenne de 2 taux estimés à partir des cinétiques, et les intervalles de confiance à 5 % de la moyenne sont calculés selon la formule : $m \pm t \frac{Sx}{\sqrt{n}}$ avec n = 2 et t à 1 ddl.

Le 3-5 dichlorophénol à 118 mg/l a été testé sur le réactif bactérien utilisé après différents temps d'attente, selon le protocole essai témoin/essai toxique simultané, décrit au chapitre 6.1.3. Le tableau 21 ci-dessous rend compte des résultats.

Tableau 21 : Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur l'inhibition par le 3-5 dichlorophénol du taux de glucose minéralisé.

Délai d'utilisation (min.)	Inhibition du taux de glucose minéralisé (%)
105	53,4
130	57,6
165	59,1
190	55,8
215	57,4

Le pourcentage d'inhibition induit par le 3-5 dichlorophénol fluctue de 53 à 59 % et ne semble pas corrélé à la durée de la période d'attente du réactif bactérien.

La méthodologie basée sur la réalisation en parallèle d'une série témoin et d'une série avec toxique permet donc de minimiser l'effet du facteur "temps" sur les résultats enregistrés.

6.2.4. Devenir du glucose et bilan carboné

Un bilan a été réalisé après 13 min. de réaction. La radioactivité est mesurée au niveau du $^{14}CO_2$ fixé par la phényléthylamine, au niveau des bactéries que l'on récupère par filtration sur membrane millipore 0,22 µm, ainsi qu'au niveau du filtrat.

Trois répétitions sont effectuées, et pour chaque répétition 2 erlenmeyers sont menés conjointement ; 1 erlenmeyer permet la filtration du milieu réactionnel et conduit à la récupération des bactéries et du filtrat, tandis que l'autre erlenmeyer est utilisé pour doser le CO_2 radioactif.

Les mesures de radioactivité réalisées sur les différents compartiments (CO_2, bactéries et filtrats) respectivement lors des essais 1, 2 et 3 sont répertoriées dans le tableau 22.

Tableau 22 : Répartition de la radioactivité au niveau des différents compartiments (CO_2, bactéries et filtrats).

Fraction	Essai 1 (dpm)	Essai 2 (dpm)	Essai 3 (dpm)	Moyenne ± écart-type (dpm)	Coefficient de variation (%)
CO_2	12889	11664	12017	12190 ± 630	5,2
Bactéries	16668	18193	16668	17176 ± 880	5,1
Filtrat	570617	533085	599876	567859 ± 33480	5,9
Total	600174	562944	628562	597227 ± 32908	5,5

Les mesures au sein de chaque fraction (CO_2, bactéries et filtrat) fluctuent autour de 6 %.

Le pourcentage de radioactivité assimilé par les bactéries en 13 min. représente 4,9 % de la radioactivité totale, dont 2 % est émis sous forme de CO_2 et 2,9 % reste fixé par les bactéries.

Le pourcentage de radioactivité résultant de la minéralisation du glucose ($^{14}CO_2$) par rapport à la radioactivité assimilée par les bactéries ($^{14}CO_2$ + bactéries) est donc de 41,5 %.

La radioactivité totale qui résulte de la somme des radioactivités mesurées dans les différents compartiments pour chaque répétition, nous donne une moyenne égale à 597227 ± 32908 dpm.

La radioactivité mesurée directement sur 3 aliquots de la solution de glucose U -^{14}C est de 579596 dpm pour les 100 µl additionnés dans le milieu réactionnel. Si l'on considère cette moyenne comme une moyenne théorique, le test de t qui permet de comparer une moyenne observée à une moyenne théorique ne met pas en évidence, avec un risque α égal à 5 %, de différence significative entre la radioactivité calculée lors du bilan, et la radioactivité additionnée dans le milieu réactionnel. Le bilan est donc considéré comme satisfaisant.

6.2.5. Etude de la répétabilité

- Toxicité du 3-5 dichlorophénol

Un exemple est donné dans la figure 30, des droites obtenues pour les témoins et les concentrations croissantes en 3-5 dichlorophénol, lorsque l'on porte sur un graphe, les mesures de radioactivité résultant du $^{14}CO_2$ libéré par les bactéries, en fonction du temps d'incubation.
La CI_{50} est ensuite calculée à partir des droites dose-effet (Figure 31).

Les résultats obtenus pour l'étude de la répétabilité au travers de l'évaluation de la toxicité du 3-5 dichlorophénol sont répertoriés dans le tableau 23.

Tableau 23 : CI_{50} (mg/l) du 3-5 dichlorophénol évaluée au moyen du test minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Réactif bactérien (bact./ml)	CI_{50}-minéralisation du glucose (mg/l)	CI_{50}-moyenne ± écart-type (mg/l)	Coefficient de variation (%)	*Intervalle de de confiance de la CI_{50} (mg/l)
$54,5\ 10^5$	123,7			
$78,5\ 10^5$	123,2	120,2 ± 5,7	4,7	120,2 ± 24,5
$46,5\ 10^5$	113,6			

* Intervalle de confiance : m ± t Sx

La moyenne des CI_{50} calculée sur 3 essais est égale à 120,2 ± 5,7 mg/l, ce qui nous donne un coefficient de variation relativement faible de 4,7 % pour la répétabilité du test.

- Toxicité du sulfate de cuivre

Les droites représentatives des cinétiques de libération du $^{14}CO_2$ et des relations dose-effet pour $CuSO_4$ sont données respectivement dans les figures 32 et 33.

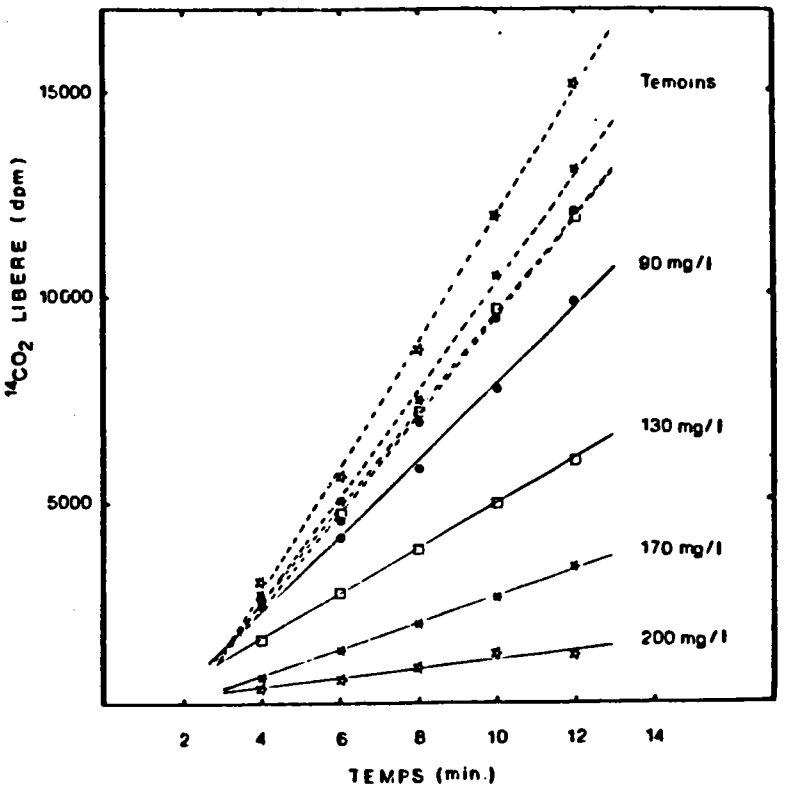


Figure 30 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par 46 10^5 bact/ml pour les essais témoins et les essais avec des concentrations croissantes en 3-5 dichlorophénol.

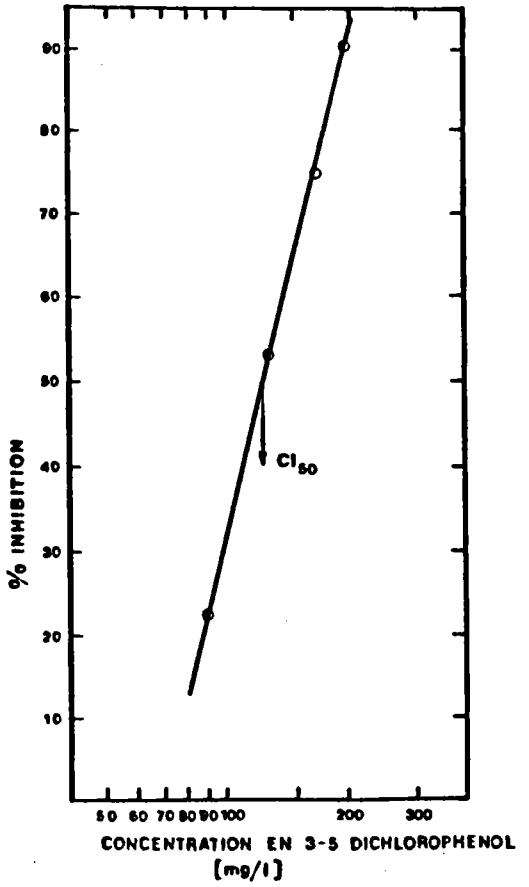


Figure 31 : Exemple de relation dose-effet du 3-5 dichlorophénol sur la minéralisation du glucose chez Escherichia coli permettant

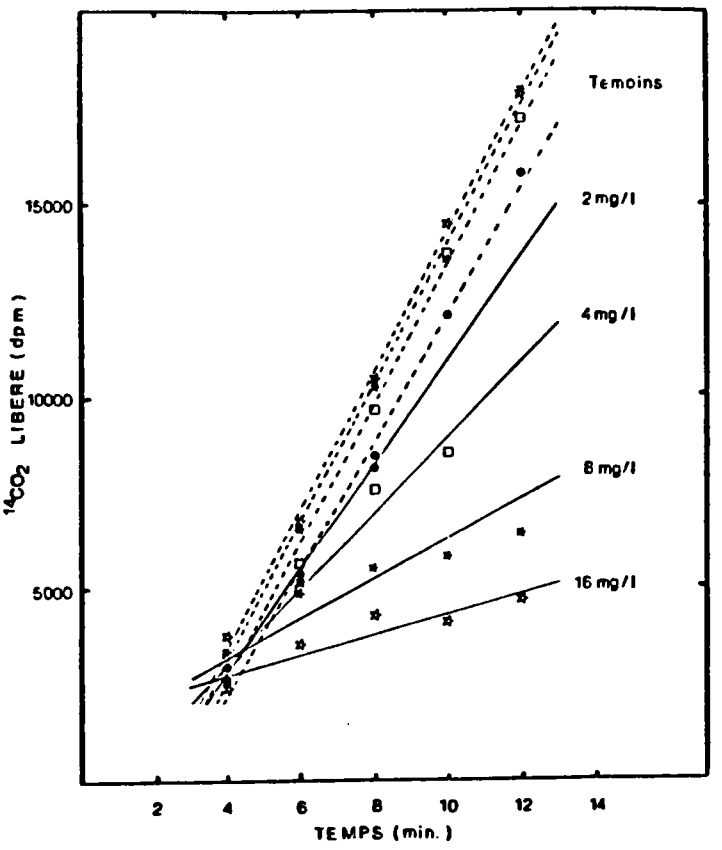


Figure 32 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par 57,5 10^5 bact/ml pour les essais témoins et les essais avec des concentrations croissantes en $CuSO_4$.

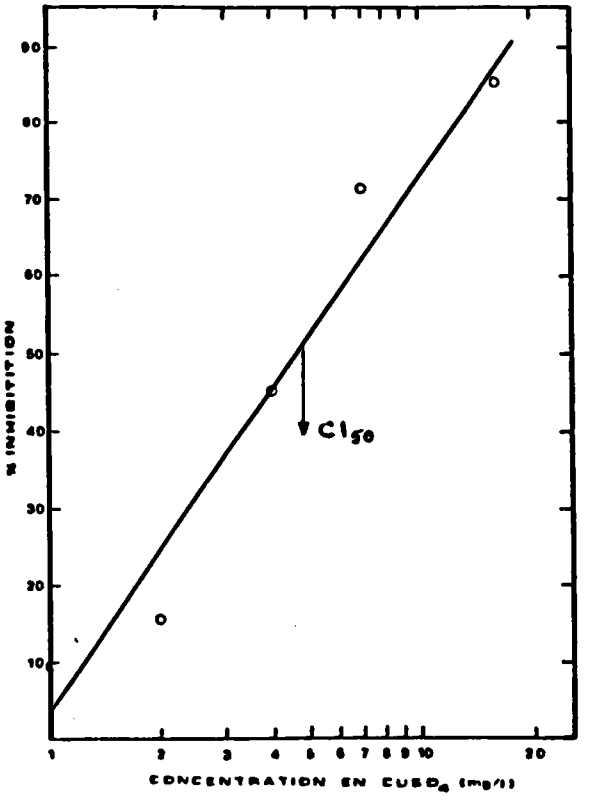


Figure 33 : Exemple de relation dose-effet de $CuSO_4$ sur la minéralisation du glucose chez Escherichia coli permettant la détermination de la CI

Les résultats obtenus avec $CuSO_4$ pour l'étude de la répétabilité du test sont résumés dans le tableau 24.

Tableau 24 : CI_{50} (mg/l) de $CuSO_4$ évaluée au moyen du test minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Réactif bactérien (bact./ml)	CI_{50}-minéralisation du glucose (mg/l)	CI_{50}-moyenne ± écart-type (mg/l)	Coefficient de variation (%)	*Intervalle de de confiance de la CI_{50} (mg/l)
** ND	3,5			
28 10^5	2,8			
26 10^5	5,9	4,25 ± 1,38	32,5	4,25 ± 4,4
57,5 10^5	4,8			

* Intervalle de confiance m ± t Sx

** ND = Non déterminé

La moyenne des CI_{50} de $CuSO_4$ calculée sur 4 essais est 4,25 ± 1,38 mg/l (soit CI_{50} - Cu^{++} = 1,69 ± 0,55 mg/l), d'où un coefficient de variation relativement élevé de 32,5 % pour l'étude de la répétabilité.

6.2.6. Evaluation de la CI_{50} de quelques substances chimiques

Onze substances chimiques organiques et minérales ont été testées au moyen du bioessai "Inhibition de la minéralisation du glucose U-^{14}C chez Escherichia coli" afin d'évaluer la sensibilité de ce test à l'égard de différents toxiques. Les valeurs de CI_{50} sont présentées dans le tableau 25.

Tableau 25 : CI_{50} (mg/l) de quelques substances chimiques évaluée au moyen du test minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Substance testée	CI_{50}-minéralisation du glucose (mg/l)	Seuil de toxicité CI_{10} ou CI_{20}(mg/l)
Cu^{++}	*1,69 ± 0,55	CI_{10} = 0,5
Cd^{++}	524,1	CI_{10} = 138
Zn^{++}	1,0	CI_{20} = 0,12
Cr^{6+}	332,1	CI_{10} = 213
3-5 dichlorophénol	120,2 ± 5,7	CI_{10} = 74
Benzène	**NT	-
Dibromo 1-2 éthane	**NT	-
Diéthylamine	61,5	CI_{20} = 20
Acide dodécylbenzène sulfonique	56,2	CI_{10} = 46
Atrazine	***NT	-
Malathion	***NT	-

* CI_{50} - $CuSO_4$ = 4,25 ± 1,38 mg/l

** NT = Non toxique à 1 g/l

*** NT = Non toxique à 100 mg/l

Les CI_{50} regroupées dans le tableau 25 révèlent la très faible sensibilité de ce bioessai.

Les substances organiques testées n'ont pas d'effet inhibiteur sur la minéralisation du glucose, si ce n'est dans le cas du 3-5 dichlorophénol, de la diéthylamine et de l'acide dodécylbenzène sulfonique à des concenrations élevées.

Quant aux substances minérales, les résultats sont très différents selon les toxiques ; le test est relativement sensible au cuivre et au zinc, mais par contre le cadmium et le chrome ne sont nocifs vis à vis d'Escherichia coli que pour des concentrations supérieures à 100 mg/l.

7 - DISCUSSION

7.1. PERFORMANCES DES TESTS MICROTOX, CONSOMMATION D'OXYGENE DES BOUES ACTIVEES ET MINERALISATION DU GLUCOSE U-^{14}C PAR *ESCHERICHIA COLI*

7.1.1. Sensibilité

- Sensibilité des bactéries aux substances testées

Le tableau 26 regroupant les CI_{50} de différentes substances chimiques pures déterminées au moyen des tests Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose par Escherichia coli illustre la réponse des bactéries aux polluants de l'environnement ; parmi les polluants minéraux, nous avons recherché la toxicité du cuivre, zinc, cadmium et chrome. Et les substances organiques testées ont été choisies parmi les hydrocarbures aromatiques (3-5 dichlorophénol, benzène), les hydrocarbures halogénés (dibromo 1-2 éthane), les amines (diéthylamine), les détergents (acide dodécylbenzène sulfonique) et les pesticides (atrazine, malathion).

En ce qui concerne les substances minérales (cuivre, cadmium, zinc, chrome), elles se caractérisent par une forte affinité pour les groupements thiols, et sont donc susceptibles de perturber le métabolisme des acides aminés soufrés et d'inhiber l'activité de nombreuses enzymes.

Les bactéries se sont montrées sensibles au cuivre et au zinc (CI_{50} < 10 mg/l), mais par contre le chrome et dans une moindre mesure le cadmium sont peu toxiques, en particulier vis à vis d'Escherichia coli.

Le cuivre est utilisé en agriculture comme anticryptogamique, algicide et antibactérien, et le zinc présente de nombreux usages vétérinaires comme antiseptique ; il est donc logique d'observer pour ces 2 éléments une forte toxicité à l'égard des bactéries (HAGUENOER et FURON, 1981).
LEVESQUE précise que le cuivre est plus toxique que le chrome hexavalent vis à vis des microorganismes, et des concentrations comprises entre 0,01 et 5 mg/l réduisent les processus d'auto-épuration des cours d'eau.
Quant au zinc, une concentration de 0,05 mg/l inhibe l'activité hétérotrophe de la microflore de rivière (ALBRIGHT et WILSON, 1974).

Bien que très toxiques à l'égard des microorganismes, cuivre et zinc sont des oligo-éléments essentiels à la vie cellulaire ; ils entrent dans la composition de certains enzymes, comme la cytochrome oxydase pour le cuivre, et l'alcool déshydrogénase, la carboxypeptidase ou l'anhydrase carbonique pour le zinc (HAGUENOER et FURON, 1981).

Tableau 26 : Toxicité de quelques substances chimiques évaluée au moyen des tests Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Substances testées	CI_{50}-Microtox (mg/l)	CI_{50}-Consommation d'oxygène (mg/l)	CI_{50}-Minéralisation du glucose (mg/l)
Cu^{++}	0,13	9,45	1,69
Cd^{++}	2,7	3,8	> 100
Zn^{++}	0,8	4,8	1
Cr^{6+}	13	10,1	> 100
3-5 dichlorophénol	4,5	10,05	> 100
Benzène	84	> 100	NT*
Dibromo 1-2 éthane	> 100	> 100	NT*
Diéthylamine	23,4	> 100	61,5
Acide dodécylbenzène sulfonique	29,2	73,1	56,2
Atrazine	> 86	NT**	NT**
Malathion	84	NT**	NT**

* NT = Non Toxique à 1 g/l

** NT = Non Toxique à 100 mg/l

N.B. : Le tableau de résultats avec les CI_{50} exprimées en moles/l est en Annexe 5.

Parmi les polluants organiques testés, les pesticides, atrazine et malathion, n'ont pas ou peu d'effet nocifs sur les microorganismes. Ce résultat n'a rien de surprenant dans la mesure où l'atrazine, herbicide du groupe des triazines agit spécifiquement sur la photosynthèse, et le malathion, insecticide organophosphoré, est un inhibiteur des cholinestérases, enzymes essentiels à l'activité des centres nerveux des vertébrés et invertébrés. La specificité d'action des pesticides à l'égard d'organismes cibles explique leur absence de toxicité vis à vis des bactéries.

Pour les autres substances organiques testées, nous constatons une réponse variable des 3 bioessais au 3-5 dichlorophénol, à la diéthylamine et à l'acide dodécylbenzène sulfonique, et une absence de toxicité de l'alcane halogéné, le dibromo 1-2 éthane, et du benzène vis à vis des bactéries.

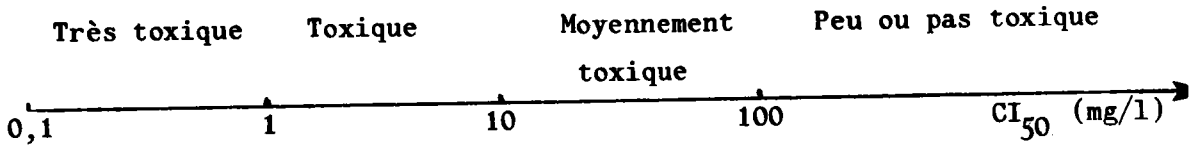
Le 3-5 dichlorophénol et l'acide dodécylbenzène sulfonique grâce à leurs groupements hydrosolubles et liposolubles sont capables d'altérer les structures membranaires.

Le 3-5 dichlorophénol intervient aussi de façon plus spécifique, comme découplant de la phosphorylation oxydative ; les chlorophénols agissent comme transporteurs de protons à travers la membrane, et ils suppriment le gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP et aux nombreux transports actifs (DETOC, 1988).

Quant au dibromo 1-2 éthane et au benzène, ils seraient tous deux susceptibles de modifier également la perméabilité membranaire par un effet solvant.

- Sensibilité comparée des 3 tests bactériens

Si l'on classe les différentes substances testées en fonction de leurs valeurs de CI_{50} selon une échelle de toxicité établie arbitrairement comme suit :



Il apparaît alors clairement, d'après la figure 34, que le test Microtox est l'essai le plus sensible, suivi du test Consommation d'oxygène des boues activées, puis du test Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

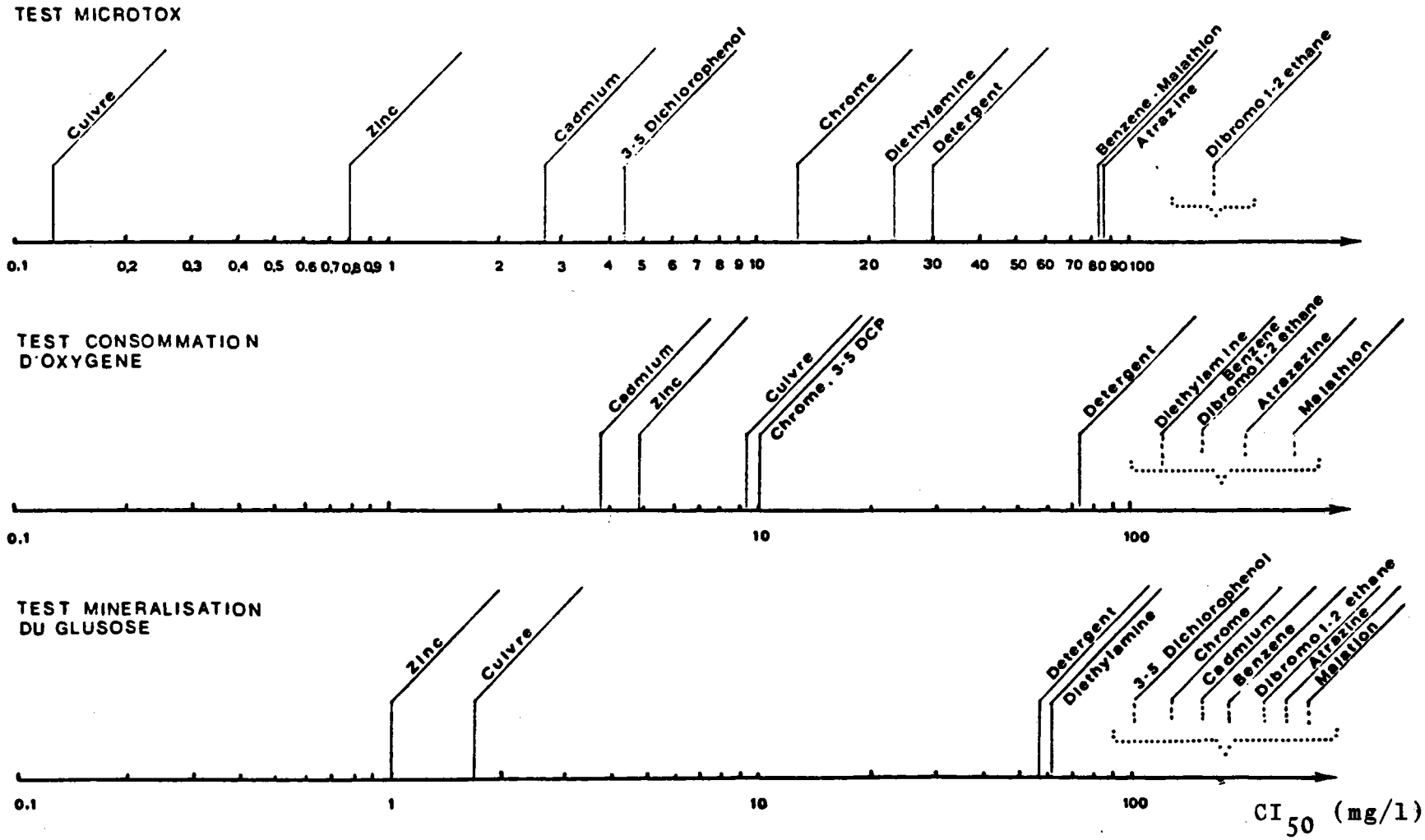


Figure 34 : Comparaison de la sensibilité à quelques substances chimiques des tests Microtox, Consommation d'oxygène et Minéralisation du glucose.

Si l'on considère le groupe des substances classées "très toxiques" et "toxiques", la concordance est élevée entre les résultats des test Microtox et Consommation d'oxygène. Cependant, avec le test Consommation d'oxygène, la position des substances sur l'échelle de toxicité est décalée vers des valeurs plus élevées des CI_{50} ce qui traduit la plus faible sensibilité de ce test.

En ce qui concerne le test Minéralisation du glucose, le classement des substances sur l'échelle de toxicité est différent de celui des deux bioessais précédents. En effet, excepté le cuivre et le zinc, toutes les autres substances testées ne sont que "moyennement toxiques" ou le plus souvent "peu ou pas toxiques". La sensibilité de ce test est donc très sélective.

- Sensibilité et spécificité des 3 tests bactériens

L'explication des sensibilités différentielles des 3 tests bactériens aux 11 substances chimiques testées doit être recherchée dans ce qui fait la spécificité de chaque bioessai, à savoir :

- le réactif biologique, et notamment la nature de la souche, la préparation du réactif bactérien et la concentration en microorganismes dans le milieu d'essai,

- le milieu réactionnel qui interagit d'une part sur l'état physiologique des bactéries et d'autre part sur la spéciation des toxiques,

- et le critère choisi pour évaluer les effets toxiques des substances testées, qui est plus ou moins représentatif de "l'état de santé" des microorganismes.

. Réactif biologique

Les 3 tests de toxicité que nous avons étudiés, Microtox, Minéralisation du glucose et Consommation d'oxygène utilisent respectivement 2 souches pures, Photobacterium phosphoreum et Escherichia coli, à inoculum faible, et une population de microorganismes avec les boues activées, à forte concentration en biomasse.

Il est évident que la sensibilité des tests sera en partie conditionnée par la sensibilité intrinsèque des espèces bactériennes constituant les réactifs biologiques.

Les résultats obtenus avec le test Microtox montrent que Photobacterium phosphoreum est sensible aux micropolluants testés.

Le test Consommation d'oxygène, avec l'utilisation d'une population de microorganismes, présente l'intérêt d'intégrer la réponse de plusieurs espèces bactériennes, tout en gommant la spécificité des souches peu représentées au sein des boues activées.

Dans le test Minéralisation du glucose, le choix d'Escherichia coli est arbitraire car il s'agissait dans un premier temps de mettre au point la méthodologie de l'essai ; cette bactérie présente l'avantage d'appartenir aux bactéries grams négatives, qui sont les plus nombreuses dans l'environnement, et de se multiplier rapidement. De plus, elle a fait l'objet de nombreux travaux et elle est très employée en laboratoire.
Cependant, la faible sensibilité constatée lors du screening des substances chimiques, en particulier pour le cadmium et le chrome, remet en cause l'utilisation de ce procaryote dans les essais de toxicité.

La faible sensibilité d'Escherichia coli au cadmium semble être confirmée par les travaux de JAKUBCZAK et al. (1981) qui ont obtenu des concentrations minimales bactéricides $>$ 36 mg/l.
D'après CENCI et al. (1985, cité par BAUDA, 1986) l'activité déshydrogénasique d'Escherichia coli est inhibée par 10 mg/l de cadmium.

Pour le chrome, HUY TUE et al. (1971) mentionnent des concentrations bactéricides très élevées de 530 mg/l en Cr^{6+}, alors que pour JAKUBCZAK et al. (1981), 5 mg/l en Cr^{6+} sont bactéricides sur 2 souches différentes d'Escherichia coli.

Ces données bibliographiques sur la sensibilité d'Escherichia coli étant quelque peu hétérogènes, il conviendrait de réaliser quelques essais en respectant le protocole du test minéralisation du glucose, mais en utilisant une autre bactérie, Photobacterium phosphoreum par exemple, afin de vérifier si les mauvaises performances de ce bioessai sont imputables au réactif biologique.

La préparation du réactif biologique, et en particulier la préculture des bactéries, peut également interférer sur la sensibilité des tests de toxicité. Dans le test Minéralisation du glucose, Escherichia coli a été cultivé sur milieu gélosé, et nous nous sommes demandés si ce mode de préculture influait sur la sensibilité de l'essai.

Il est établi que les cultures sur milieu solide provoquent le développement à la surface des bactéries d'exopolysaccharides qui interviennent dans les processus d'agrégation des cellules entre elles et le support.

Ces molécules favorisent les phénomènes d'adsorption des métaux sur les bactéries (BAUDA et BLOCK, 1985 ; BROWN et LESTER, 1982), et elles auraient un rôle protecteur en piégeant ainsi les toxiques (BITTON et FREIHOFER, 1978).

Lors de nos travaux préliminaires sur le test Minéralisation du glucose, nous avons vérifié que le mode de préculture d'Escherichia coli, respectivement sur gélose, ou en milieu liquide les bactéries étant prélevées en phase exponentielle et stationnaire, ne modifiait pas le niveau de toxicité du 3-5 dichlorophénol. Il aurait été intéressant de réaliser également cette expérience avec l'un des toxiques minéraux testés, car les métaux sont censés s'adsorber plus fortement sur les exopolysaccharides.

Néanmoins, le mode de préculture du réactif bactérien ne peut expliquer le manque de sensibilité spécifique au cadmium et au chrome du test Minéralisation du glucose, le cuivre et le zinc restant très toxiques.

Enfin, le rapport biomasse/toxique intervient sur les résultats des tests, et ce rapport est d'autant plus favorable à l'expression d'un effet inhibiteur qu'il est peu élevé, ce qui se traduit par une faible concentration en bactéries proportionnellement à une concentration donnée en toxique. Une biomasse importante est en effet capable de biosorber les toxiques et de diminuer leur concentration dans le milieu d'essai.

Ainsi, dans les tests Microtox et Minéralisation du glucose, l'inoculum est faible de l'ordre de 10^6 bactéries/ml, alors que dans le test Consommation d'oxygène, la concentration en microorganismes est élevée, environ 50 mg/l en MES (soit au moins 10^8 bact./ml), avec pour conséquence un rapport biomasse/toxique peu favorable à l'expression d'un effet inhibiteur.

. Milieu réactionnel

Dans les bioessais Microtox et Minéralisation du glucose, les milieux réactionnels sont extrêmement simples, et constitués pour le premier uniquement de NaCl, et pour le deuxième de sérum physiologique additionné de glucose. Les phénomènes de complexation des substances toxiques par les éléments du milieu réactionnel sont donc peu probables. Mais ces milieux présentent le désavantage d'être peu tamponnés, et selon la nature des substances testées, des modifications de pH peuvent se produire. Le pH sera donc un facteur à contrôler lors de travaux sur des échantillons complexes de composition inconnue.

A l'inverse, le test Consommation d'oxygène présente un milieu d'essai bien tamponné contenant le substrat des bactéries.
Ce substrat peut interférer sur la spéciation des toxiques avec pour conséquence une modification de leur biodisponibilité et donc leur toxicité.

Nous avons voulu illustrer l'importance de ces phénomènes en prenant l'exemple du cuivre.
Le cuivre peut exister sous différentes formes chimiques :

- le cuivre libre (Cu^{++}),
- le cuivre complexé par des ligants inorganiques (carbonates, chlorures, phosphates...),
- le cuivre complexé par des ligants organiques (acides aminés, polypeptides, acides humiques...),
- le cuivre sous forme d'hydroxydes $Cu(OH)_2$ qui peuvent précipiter ou s'adsorber sur des particules en suspension.

Les bactéries ne présentent pas la même sensibilité aux différentes formes chimiques des toxiques. Ainsi, GILLEPSIE et VACCARO (1978) ont montré que le cuivre libre avait un effet inhibiteur plus important sur l'assimilation du glucose par les microorganismes que le cuivre complexé par des ligants organiques. Ce dernier serait vraisemblablement moins disponible à cause de la taille plus élevée du complexe organométallique.

Les mesures de cuivre libre réalisées dans le milieu réactionnel du test Consommation d'oxygène démontrent que le cuivre est presque totalement complexé par le substrat. Les substances qui fixent le cuivre sont par ordre d'importance la peptone, l'extrait de viande et l'hydrogénophosphate de potassium.
La peptone contient de nombreux acides aminés et oligopeptides qui ont une forte affinité pour le cuivre. Dans l'extrait de viande, les polypeptides pourraient être responsables de la disparition du cuivre libre.
Quant à K_2HPO_4, il agit par l'intermédiaire des phosphates qui complexent fortement le métal ($CuHPO_4$) et ($CuH_2PO_4^+$). Les chlorures (NaCl, $CaCl_2$) peuvent également se lier au cuivre, mais leur concentration dans le substrat est sans doute trop faible pour qu'ils puissent diminuer de façon notable la teneur en cuivre libre du milieu.

Le cuivre libre semble être la forme la plus toxique vis à vis des microorganismes, et le fort pouvoir complexant du substrat pourrait partiellement expliquer la plus faible toxicité du cuivre sur les boues activées.

La sensibilité de ce test serait vraisemblablement améliorée par l'emploi de substances non complexantes, comme le glucose, en tant que substrat des bactéries. Mais le glucose seul n'assure pas une activité respiratoire suffisante des microorganismes, qui permette des mesures d'oxygène avec électrode durant 3 heures.

La recherche d'un milieu moins complexant vis à vis des toxiques et qui assurerait une consommation active d'oxygène par les bactéries est donc à envisager dans une optique d'optimisation du test Consommation d'oxygène des boues activées.

Hormis l'influence du milieu sur la spéciation des toxiques, ce dernier pourrait également modifier la réponse de l'organisme intoxiqué, par des mécanismes mettant en jeu des phénomènes de compétition : compétition entre les substances constituant le substrat des bactéries et les toxiques testés.
Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que ce phénomène de compétition intervient dans la faible sensibilité du test Consommation d'oxygène aux substances organiques ; la diéthylamine par exemple, pourrait être concurrencée par les composés aminés du substrat plus facilement accessibles tels que l'urée.

Enfin, le milieu réactionnel a une influence directe sur l'état physiologique des microorganismes. Ainsi, dans le test Minéralisation du glucose, les bactéries sont placées dans un milieu minéral (NaCl) avec pour seule source de carbone le glucose. Et elles vont utiliser le glucose pour leur métabolisme de survie. Il est possible que cette activité minimum de maintenance ne corresponde pas à la phase de sensibilité optimum des bactéries aux toxiques.
Afin de vérifier cette hypothèse, il conviendrait de placer les bactéries dans des conditions plus favorables d'utilisation du glucose, et de mesurer l'action inhibitrice des toxiques.

. Critères d'évaluation de la toxicité

L'évaluation de la toxicité des substances chimiques dans les tests Microtox, Consommation d'oxygène et Minéralisation du glucose U-^{14}C s'effectue respectivement au moyen des mesures de bioluminescence, d'oxygène dissous et de CO_2 libéré.

L'idée d'utiliser la bioluminescence comme critère d'évaluation de la toxicité est originale, et ce type de mesure est très intéressant puisque le fonctionnement de la voie de production de la lumière, et celui de la chaîne respiratoire, mécanisme essentiel du métabolisme cellulaire, sont tous deux dépendants des coenzymes réduits $NADH_2$.

Le critère consommation d'oxygène du test sur boues activées est sans conteste représentatif de l'état physiologique des microorganismes.

Quant au test Minéralisation du glucose par Escherichia coli, la mesure du CO_2 libéré par les processus de respiration cellulaire paraissait être à priori un critère équivalent au précédent. Il s'agissait d'étudier les effets des substances chimiques sur le fonctionnement des voies de dégradation du glucose qui interviennent dans la production de CO_2.
De plus, les travaux de différents auteurs (HOBBIE et CRAWFORD, 1969 ; GRIFFITHS et al., 1974 ; JONAS et al., 1984) ont montré que la minéralisation est proportionnelle à la quantité de glucose assimilé par les bactéries, et les effets inhibiteurs des toxiques sur ces 2 phénomènes sont voisins. Les mesures de CO_2 marqué permettent également d'éviter les imprécisions du dosage de la radioactivité dans les bactéries, liées aux problèmes de filtration ou de relargage de matériel radioactif.

Cependant, compte tenu de la faible sensibilité de ce test, on peut se demander si la mesure du glucose minéralisé constitue un bon critère d'évaluation de la toxicité.

Le taux de CO_2 émis dépend de la quantité de carbone organique assimilé par les bactéries, mais aussi de son utilisation au sein de la cellule ; les voies de la glycolyse et du cycle de Krebs, ainsi que le cycle des pentoses-phosphates vont entrainer la libération de CO_2 parallèlement à la production d'énergie et de pouvoir réducteur. Mais ces voies cataboliques conduisent également à la formation de métabolites intermédiaires qui peuvent être utilisés lors des biosynthèses des macromolécules (acides nucléiques et protéines), avec pour conséquence une fixation du carbone marqué par les bactéries.
Le CO_2 dosé résulte donc de l'orientation du glucose vers les différentes voies biochimiques possibles, sur lesquelles vont éventuellement intervenir les substances testées. Le problème est donc complexe, et les mesures du CO_2 libéré restent difficiles à interpréter.

Afin de déterminer l'importance respective des voies de dégradation du glucose et les modifications en présence de toxiques, il conviendrait d'incuber les bactéries avec du glucose uniquement marqué en C1, et du glucose marqué en C1 et C6, sachant que la glycolyse et le cycle de Krebs transforment C1 et C6 en CO_2, alors que le cycle des pentoses-phosphates ne libère par décarboxylation que C1 sous forme de CO_2 (KRUH, 1979).

On peut encore postuler que la durée de l'essai est insuffisante pour mesurer un effet toxique sur le CO_2 libéré. Mais cette explication nous semble peu probable, dans la mesure où 12 minutes représentent un laps de temps non négligeable dans la vie d'une bactérie.

- Comparaison avec les autres bioessais bactériens

La comparaison, en terme de sensibilité, des résultats obtenus au moyen des tests Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli, avec ceux donnés par d'autres bioessais bactériens n'est pas aisée, car si de tels essais ont bien été étudiés par différents auteurs, les travaux portent rarement sur les mêmes toxiques.

Dans le tableau 27, nous avons rapporté les CI_{50} du cuivre, zinc, cadmium et 3-5 dichlorophénol déterminées à l'aide de différents tests bactériens par divers auteurs.

Le test d'inhibition de luminescence de Photobacterium phosphoreum présente la plus grande sensibilité ; il est suivi des tests Consommation d'oxygène et Spirillum volutans. Par contre, les tests Minéralisation du glucose par Escherichia coli, Croissance de Pseudomonas fluorescens et Aeromonas hydrophila, et Activité déshydrogénasique des boues activées sont beaucoup moins intéressants car leur sensibilité aux toxiques testés est très sélective, avec dans certains cas une absence d'effets inhibiteurs.

Il est bien évident que cette classification n'est valable que dans le cadre des conditions expérimentales suivies par les différents auteurs, et ne s'applique qu'aux substances testées, ce qui interdit toute extrapolation à l'ensemble des micropolluants de l'environnement.

Néanmoins, si l'on se réfère aux études comparatives menées par divers auteurs sur d'autres substances chimiques (DUTKA et KWAN, 1981, 1982, 1984 ; GREENE et al., 1985 ; MILLER et al., 1985), on constate que le test Microtox est également reconnu comme le bioessai bactérien le plus sensible et le moins sélectif, suivi des tests Spirillum volutans et Consommation d'oxygène des boues activées.

- Comparaison avec les bioessais de référence

L'examen du tableau 28 regroupant les CI_{50} et les CL_{50} obtenues avec les tests de référence, daphnies, poissons et algues, et nos résultats avec le bioessai Microtox, révèle que le principal grief porté à l'encontre des tests sur microorganismes, à savoir le manque de sensibilité, est sans fondement tout au moins en ce qui concerne le test Microtox.

Tableau 27 : Toxicité du cuivre, zinc, cadmium et 3-5 dichlorophénol évaluée au moyen de différents tests bactériens.

Auteurs	Tests bactériens	CI_{50} (mg/l) de quelques substances chimiques			
		Cuivre	Zinc	Cadmium	3-5 DCP
RETEUNA	Microtox	0,13	0,8	2,7	4,5
	Consommation O_2	9,45	4,8	3,8	10,05
	Minéralisation glucose	1,69	1	100	100
DUTKA et KWAN, 1981, 1982, 1984	Spirillum volutans	10	12	-	5
	Croissance P. fluorescens	16,8	367	-	3,2
	Croissance Aeromonas hydrophila	21	500	-	-
	Activité déshydrogénasique (boues activées)	2,1	24	-	80
	Consommation O_2 (boues synthétiques)	29	1,2	-	30,2
GREENE et al., 1985	Activité déshydrogénase (boues activées)	1,67	265	2400	-
	Consommation O_2 (Escherichia coli)	6,63	0,22	-	-
KING, 1984	Nitrification (boues activées)	13,2	-	-	1,3
	Croissance (eau d'égoût)	12	-	-	2
QURESHI et al., 1982	Spirillum volutans	1,9	1,6	-	-

Tableau 28 : Toxicité de quelques substances chimiques évaluée avec les tests Daphnies, Poissons et Algues (Références IRCHA) et comparaison avec les résultats du test Microtox.

Substances testées	Test Daphnies CI_{50}-24 h (mg/l)	Test Poissons CL_{50}- 24 h (mg/l)		Test Algues CI_{50}-5 jours (mg/l)	Test Microtox CI_{50}-5 min. ou 30 min. (mg/l)
		Brachydanio rerio	Salmo gairdneri		
Cu^{++}	0,11	0,74	-	3,6	0,13
Cd^{++}	0,4	10,7	-	0,02	2,7
Zn^{++}	14,4	25,2	-	23	0,8
Cr^{6+}	0,35	99	163	0,74	13
3-5 dichlorophénol	3,05	-	-	-	4,5
Benzène	84	66	-	NT*	84
Dibromo 1-2 éthane	-	56	-	NT*	100
Diéthylamine	41	50	-	14	23,4
Acide dodécyl-benzène sulfonique	15	9	-	56	29,2
Atrazine	NT*	76	-	-	86
Malathion	0,003	-	0,17	-	84

*NT = Non toxique

Chaque organisme présente une sensibilité spécifique aux toxiques. Ainsi le test Microtox détectera facilement une pollution par le zinc, mais il sera peu sensible au cadmium et au chrome comme d'ailleurs le test poisson. Cadmium et chrome sont par contre très toxiques vis à vis des daphnies et des algues.

Il n'existe évidemment pas de test idéal qui réponde à toutes les sions des nombreuses substances chimiques déversées dans l'environnement. · de ce constat, il convient donc de connaître les limites de chaque et en fonction des objectifs et en tenant compte des contraintes ies, de choisir le test le mieux adapté aux circonstances. Et les toxicité sur bactéries ont certainement un rôle à jouer dans tion des risques chimiques vis à vis des milieux aquatiques.

7.1.2. Répétabilité

La répétabilité des tests Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose par Escherichia coli a été étudiée à partir des essais sur le 3-5 dichlorophénol et le sulfate de cuivre, tableau 29.

Tableau 29 : Etude comparative de la répétabilité des bioessais Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Bioessai	Nombre d'essais	Coefficient de variation avec le 3-5 DCP (%)	Nombre d'essais	Coefficient de variation avec $CuSO_4$ (%)
Microtox	4	4,7	6	28,1
Consommation O_2	8	14,6	5	17,9
Minéralisation du glucose	3	4,7	4	32,5

La répétabilité étudiée avec le 3-5 dichlorophénol donne de meilleurs résultats qu'avec $CuSO_4$, et ce phénomène est particulièrement évident pour les bioessais Microtox et Minéralisation du glucose. Ces 2 tests ont en commun un milieu réactionnel simplifié peu tamponné. Ce milieu est vraisemblablement sujet à de petites variations de pH, qui interfèrant sur la biodisponibilité du cuivre, expliqueraient la plus grande dispersion des résultats. Le cuivre est en effet beaucoup moins stable que le 3-5 dichlorophénol qui est quelques fois choisi comme substance de référence dans les tests de toxicité.

Dans le cas du test Microtox, les coefficients de variation 4,7 et 28 %, se situent dans la fourchette des valeurs de 1 à 37 % mentionnées lors de l'analyse bibliographique (cf. Analyse bibliographique, tableau 2).

Le tableau 30 qui regroupe les CI_{50} obtenues par différents auteurs avec les substances que nous avons testées montre également des résultats peu dispersés ; excepté le benzène dont la volatilité peut être évoquée dans l'hétérogénéité des résultats, les autres substances présentent des CI_{50} voisines qui traduisent la bonne répétabilité du test Microtox. Signalons que nos résultats sont légèrement inférieurs aux moyennes des CI_{50}, en particulier pour le cadmium.

Tableau 30 : Toxicité de quelques substances chimiques (CI_{50} en mg/l) déterminée au moyen du test Microtox (Données bibliographiques).

Auteurs / Substances	GREENE et al., 1985	MILLER et al., 1985	GRANGE et PECHEUX, 1984	QURESHI et al., 1984	FERARD et al., 1983	DUTKA et KWAN, 1982	CHANG et al., 1981	Notes MICROTOX, 1981	BULICH et GREENE, 1978	CI_{50} -moy. ± Sx	Nos travaux
Cu^{++}	0,23	0,24		0,13				0,4		0,25 ± 0,11	0,13
Cd^{++}	13,8	14	8,6	14,9				8		11,9 ± 3,3	2,7
Zn^{++}	0,9	0,7	1,4	1,44				2		1,3 ± 0,5	0,8
Cr^{6+}				16,8				15		15,9 ± 1,3	13
3-5 DCP					4,5	3,2				3,8 ± 0,9	4,5
Benzène					73		200		2	91,7 ± 100	84

Tableau 31 : Toxicité de quelques substances chimiques (CI_{50} en mg/l) déterminée au moyen du test Consommation d'oxygène de boues activées (Données bibliographiques).

Auteurs / Substances	KING et PAINTER, 1986	YOSHIOKA et al., 1986	MILLER et al., 1985	DUTKA et KWAN, 1984	DUTKA et KWAN, 1982	BAUER et al., 1981	BROWN et al., 1981	CI_{50}-moyenne ± Sx	Nos travaux
Cu^{++}	31		3,5	29	17	4		16,9 ± 13,1	9,45
Zn^{++}			1,5	1,2	5,2			2,6 ± 2,2	4,8
Cr^{6+}	13,4							13,4	10,15
3-5 DCP	8,7	20		30,2	22		13,7	18,9 ± 8,2	10,05

La répétabilité du test Consommation d'oxygène de boues activées, avec des coefficients de variation de 15 et 18 %, respectivement pour le 3-5 dichlorophénol et $CuSO_4$, se révèle être nettement meilleure que celle généralement observée dans la bibliographie.

KING et PAINTER (1986) ont obtenu des coefficients de variation de 38 % avec le 3-5 dichlorophénol et 58 % avec $CuSO_4$, les essais étant menés avec des boues activées de diverses stations.

BROWN et al. (1981) en lavant les boues et en les alimentant durant 24 heures améliorent la répétabilité du test et obtiennent avec le 3-5 dichlorophénol un coefficient de variation de 28 %.

Le tableau 31 qui regroupe les CI_{50} relevées dans la bibliographie pour les substances que nous avons étudiées, montre des résultats très dispersés qui confirment la faible répétabilité du test. Nous constatons également que les CI_{50} obtenues au cours de nos travaux se situent dans la gamme des différentes valeurs trouvées par les auteurs.

Habituellement, les populations de microorganismes sont directement prélevées dans le milieu naturel. Mais dans le cadre du test Consommation d'oxygène, nous avons mis en place un pilote qui nous a permis de disposer de boues activées de laboratoire. Ce pilote alimenté par un effluent synthétique de composition constante, et soumis à des conditions de fonctionnement standardisées, a sans doute assuré une relative stabilité des boues activées avec pour conséquence une répétabilité correcte du test.

Il en résulte que nos résultats sur la répétabilité de ce bioessai sont probablement optimistes par rapport à ceux qui seraient obtenus avec des boues prélevées en station d'épuration.

La répétabilité du test Minéralisation du glucose par Escherichia coli, comparée à celle de bioessais voisins mettant en jeu l'assimilation de substrat radioactif par des populations microbiennes de l'environnement, révèle les meilleures performances du test sur souche pure, caractérisé par des coefficients de variation, avec le 3-5 dichlorophénol de 4,7 % et avec $CuSO_4$ de 32,5 %.

HUET et al. (1981) en utilisant la microfaune de différentes rivières a obtenu un coefficient de variation de 42 % dans le cas du cuivre.

L'utilisation d'une souche pure, en l'occurrence Escherichia coli dans le test Minéralisation du glucose intervient probablement dans la bonne répétabilité observée.

7.1.3. Faisabilité et rapidité

Les tests Microtox et Consommation d'oxygène ne présentent aucune difficulté du point de vue de leur réalisation.

Le test Minéralisation du glucose est un peu plus délicat dans la mesure où l'on utilise une molécule marquée ce qui nécessite que des précautions soient prises lors des manipulations (protection des surfaces de travail, port des gants, décontamination du matériel...).

Quant au temps nécessaire à la réalisation des 3 bioessais bactériens, le tableau 32 en donne une évaluation détaillée.

Tableau 32 : Estimation de la durée des essais Microtox, Consommation d'oxygène de boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Bioessais	Préparation (min.)	Test (min.)	Lecture et calculs (min.)	Temps cumulé (heure)
Microtox	30	30	10	1
Consommation d'oxygène	60	180	10	4
Minéralisation du glucose	120	120	120	6

Le test Microtox est le plus rapide car la durée de l'essai est au maximum de 30 min. et tous les réactifs sont fournis.

Le test Consommation d'oxygène est beaucoup plus long en partie à cause de la période d'incubation qui est de 3 heures.

Quant au test Minéralisation du glucose, il nécessite environ 6 heures : 2 heures pour la préparation de la suspension bactérienne, du matériel et des réactifs, 2 heures pour la réalisation du test proprement dit, 2 heures pour la stabilisation et la lecture des échantillons.

Dans le cadre général des tests de toxicité aiguë, l'emploi de souches pures améliore la faisabilité des essais et diminue la durée des expériences grâce à un matériel biologique disponible dans le laboratoire. On peut également envisager la préparation de réactif lyophilisé, ce qui garantit une standardisation à plus grande échelle avec la commercialisation du réactif.

7.1.4. Prix de revient

Le tableau 33 présente une estimation du prix de revient des 3 bioessais bactériens que nous avons étudiés.

Tableau 33 : Estimation du prix de revient des essais Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Bioessais	Investissement matériel	Investissement produits
Microtox	150 000 F	50 F/test
Consommation d'oxygène	30 000 F	-
Minéralisation du glucose	300 000 F	200 F/test

Le test Consommation d'oxygène est le moins coûteux aussi bien pour l'investissement en matériel qu'en réactifs chimiques.

Une fois amorti l'achat du photomètre dont le prix reste élevé, le test Microtox est très intéressant financièrement, car du fait de sa rapidité, le coût des heures de travail de technicien est limité.

Le test Minéralisation du glucose entraîne les plus fortes dépenses aussi bien en matériel, qu'en réactifs et en personnel.

7.1.5. En résumé

L'analyse comparée, des caractéristiques et des performances des tests Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose par Escherichia coli résumées dans le tableau 34, nous conduit à faire certains commentaires.

Le test Microtox dans ses débuts a fait l'objet de vives critiques concernant sa représentativité, car l'emploi d'une bactérie marine, Photobacterium phosphoreum, dans un bioessai appliqué aux eaux douces paraissait à priori plutôt aberrant. Mais ce test s'est finalement imposé grâce à ses excellentes performances (sensibilité, répétabilité, rapidité).

Pour le bioessai Consommation d'oxygène, nous avons démontré que la répétabilité pouvait être satisfaisante à condition d'utiliser des boues activées provenant d'un pilote. La sensibilité du test pourrait vraisemblablement, également être améliorée par l'emploi d'un substrat moins complexant et par un rapport biomasse/toxique plus favorable. Néanmoins, la marge de manoeuvre permettant d'améliorer la sensiblité de ce bioessai est limitée par l'enregistrement même du signal au moyen d'une électrode, qui est inféodé à une diminution notable de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel.

Dans le test Minéralisation du glucose, les mesures en scintillation liquide présentent l'avantage d'être suffisamment sensibles pour que soient utilisées de faibles concentrations en microorganismes et en substrat sur une courte période d'incubation (12 min.). Mais des travaux supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer si la faible sensibilité de ce bioessai, constatée lors du screening des substances chimiques, est imputable à la nature ou à l'état physiologique du réactif biologique, ou au critère d'évaluation de la toxicité.

Tableau 34 : Caractéristiques et performances des bioessais Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Caractéristiques et performances	Test Microtox	Test Consommation d'oxygène	Test Minéralisation du glucose
Réactif biologique	Photobacterium phosphoreum (faible inoculum)	Boues activées (forte biomasse)	Escherichia coli (faible inoculum)
Milieu d'essai	Minéral	Substrat minéral et organique	Minéral + glucose
Critère d'évaluation de la toxicité	Luminescence	Consommation d'oxygène	Libération de CO_2
Durée de la mesure	5 à 30 min.	3 heures	12 min.
Sensibilité	+ + +	+ +	+
Répétabilité	+ + +	+ + +	+ + +
Faisabilité et rapidité	+ + +	+ +	+
Prix de revient	+ +	+ + +	+

+ + + : très performant
+ + : moyennement performant
+ : peu performant

7.2. LES DOMAINES D'APPLICATION DES TESTS MICROTOX, CONSOMMATION D'OXYGENE DES BOUES ACTIVEES ET MINERALISATION DU GLUCOSE CHEZ *ESCHERICHIA COLI*

Les domaines d'application que nous pouvons envisager pour ces trois bioessais compte tenu de leur spécificité et de leurs performances concernent :

- l'évaluation de la toxicité aiguë des substances chimiques,
- la détection des pollutions dans les milieux naturels,
- le contrôle de la toxicité aiguë dans les essais de biodégradabilité.

7.2.1. Evaluation de la toxicité des substances chimiques

Dans le cadre de l'évaluation de la toxicité des substances chimiques, un bioessai bactérien pourrait être proposé en complément des tests de toxicité habituellement employés. Le test Microtox serait le plus intéressant du fait de sa sensibilité aux différents toxiques et de sa bonne répétabilité.

Mais pour les substances qui présentent des propriétés physico-chimiques particulières, telles que les substances volatiles, comme par exemple le benzène, le test Consommation d'oxygène semble mieux adapté, car les essais sont réalisés en système clos, si l'on excepte les courtes périodes de mesure de l'oxygène dissous.
Le test Minéralisation du glucose paraît également plus intéressant pour ces substances que le test Microtox. Il présente bien une interface eau-air, mais le volume d'air est restreint ce qui limite tout de même l'évaporation.

Quant aux tests les plus aptes à l'évaluation de la toxicité des substances insolubles, parmi les trois méthodes étudiées, nous retiendrons les tests Consommation d'oxygène et Minéralisation du glucose qui, grâce à une agitation continue, assurent certainement un contact plus étroit entre le toxique et les bactéries.

Avec les insolubles, nous avons opté pour l'utilisation d'un tiers-solvant, le DMSO. Mais cela pose cependant certains problèmes.
Les tiers-solvants les plus employés dans les tests de toxicité sont : le DMSO, le DMF, l'éthanol, le méthanol, l'acétone. Mais le tiers-solvant le plus approprié pour solubiliser la substance à tester, ne sera pas forcément sans effet sur les bactéries. De plus, même si le tiers-solvant est utilisé à des concentrations pour lesquelles aucune action toxique n'apparaît, un effet antagoniste ou synergique entre solvant et toxique est toujours possible.

C'est pourquoi dans l'absolu, le meilleur moyen pour tester les substances insolubles serait de réaliser des solutions saturées, puis de déterminer la concentration par dosage. Cette méthodologie nécessite cependant de puissants moyens d'analyses, et elle est laborieuse dans le cadre d'essais en séries, et irréaliste pour des échantillons de composition inconnue.

Pour conclure sur les insolubles, nous soulignerons que plusieurs directions de travail ont été proposées (tiers-solvants, émulsions, utilisation d'adsorbants). Mais devant l'insuffisance des données expérimentales disponibles, il n'est pas possible, pour l'instant, de définir quel est le protocole le plus cohérent. Et notre expérience dans ce domaine est trop limitée pour en tirer des conclusions définitives.

7.2.2. Détection dans les milieux naturels

Les tests de toxicité bactériens sont particulièrement bien adaptés au contrôle dans les milieux naturels car leur délai de réponse à une agression chimique est très rapide (de quelques minutes à quelques heures).

Ainsi, le test Microtox est certainement un outil intéressant dans la détection de pollutions dans les eaux de surface, les eaux souterraines et l'eau de mer. Et du fait de sa simplicité, on peut envisager l'automatisation des mesures.

Il peut également être utilisé pour l'évaluation de la toxicité des rejets urbains ou industriels et des lixiviats, avec peut-être quelques restrictions pour certains rejets industriels auxquels Photobacterium phosphoreum serait peu sensible (cas des organochlorés et de certains insecticides organophosphorés).

Le test Consommation d'oxygène est le plus approprié au contrôle des effluents en entrée de station d'épuration effectué pour prévenir tout choc toxique sur les procédés d'épuration biologique. En effet, le réactif de ce bioessai est constitué de boues activées et dans le cadre de cette application, les boues activées seraient évidemment prélevées dans la station à contrôler.

7.2.3. Contrôle de toxicité dans les essais de biodégradabilité

Parmi les nombreux tests de toxicité existants, les tests bactériens sont les plus représentatifs des conditions de réalisation des études de biodégradabilité par la nature même du réactif biologique. Et leurs performances (rapidité, faible coût) permettent d'envisager leur utilisation en amont des essais de biodégrabilité, afin de prévoir la toxicité éventuelle des substances.

Les contraintes analytiques, lors des essais de biodégradabilité, obligent à employer les substances étudiées à des concentrations relativement importantes, par rapport aux conditions de l'environnement. Et bien que l'absence de toxicité soit une condition indispensable à la validation de l'essai, seuls quelques tests de biodégradabilité proposent un témoin inhibition. Mais ces témoins inhibition, menés conjointement à l'essai, permettent seulement de constater les effets toxiques en cours d'étude, et non de les prévoir. Ainsi, si l'on démontre l'existence de corrélations entre les effets toxiques des substances sur les microorganismes lors des essais de biodégradabilité, et les résultats des tests de toxicité bactériens, ces derniers pourront être utilisés afin de définir les concentrations maximales auxquelles la biodégradabilité des produits doit être étudiée.

Dans le cadre de cette application, on peut envisager que les tests de toxicité soient conduits avec les microorganismes spécifiques des essais de biodégradabilité. Les principaux essais de biodégradabilité proposés par l'OCDE et résumés en annexe 6, tableau 2, sont réalisés avec des populations bactériennes naturelles provenant d'eaux de surface, d'effluents secondaires, d'extraits aqueux de sols, ou de mélanges des précédents, ou encore de boues activées.
Le test de toxicité Consommation d'oxygène de boues activées pourrait être utilisé en amont des essais de biodégradabilité qui utilisent également des boues activées comme réactif biologique. Et le test Minéralisation du glucose pourrait être conduit avec les populations microbiennes spécifiques des autres essais de biodégradabilité.

L'utilisation des tests de toxicité bactériens en amont des essais de biodégradabilité, afin d'évaluer la toxicité des substances, et d'éviter les effets inhibiteurs sur les microorganismes responsables de la biodégradation, n'est cependant à ce jour, qu'une proposition d'étude, qui devra faire l'objet de travaux expérimentaux pour que l'on puisse juger de son intérêt.

8 - CONCLUSION

Trois tests de toxicité bactériens qui diffèrent par leur méthodologie ont été étudiés lors d'un screening de 11 substances chimiques, afin de mieux évaluer leurs performances.

Ce travail concerne le test Microtox dont le principe consiste à mesurer la bioluminescence d'une bactérie marine, le test Consommation d'oxygène de boues activées qui a fait l'objet d'une normalisation à l'ISO, et le test Minéralisation du glucose U- C chez Escherichia coli dans lequel le taux de ^{14}CO libéré est dosé.

Dans le test Microtox, les mesures de bioluminescence sont conduites sur souche pure, Photobacterium phosphoreum, en milieu salé et avec un faible inoculum ; elles permettent de répondre rapidement (5 à 30 min.) à une agression chimique.

Les mesures d'oxygène dissous réalisées au moyen d'une électrode comme dans le test Consommation d'oxygène de boues activées, nécessitent par contre une population dense de microorganismes, un substrat abondant et 3 heures d'incubation.

Quant au test Minéralisation du glucose, les mesures en scintillation liquide autorisent l'utilisation de faibles concentrations en microorganismes et en substrat (glucose U- C) sur une courte période d'incubation (12 min.).

La répétabilité des 3 tests bactériens, étudiée sur le 3-5 dichlorophénol et le sulfate de cuivre, est satisfaisante, et se caractérise par des coefficients de variation compris entre 5 et 33 %.

Si la préparation d'un réactif biologique bien standardisé à partir de souches pures dans les tests Microtox et Minéralisation du glucose, garantit généralement une répétabilité correcte, par contre les essais conduits sur des populations de microorganismes prélevés dans les milieux naturels, comme dans le test Consommation d'oxygène, montrent le plus souvent une certaine variabilité des résultats. Et la bonne répétabilité observée pour ce bioessai est probablement liée à la relative stabilité des boues activées, qui ont été prélevées sur un pilote alimenté par un effluent synthétique et soumis à des conditions de fonctionnement standardisées.

Le screening de toxicité de 11 substances chimiques a permis d'appréhender la réponse des bactéries à quelques polluants de l'environnement.

Les bactéries se sont montrées particulièrement sensibles au cuivre et au zinc.
Par contre, les pesticides, atrazine et malathion, ainsi que les solvants comme le dibromo 1-2 éthane et le benzène ne sont pas ou peu nocifs vis à vis des bactéries.
Quant au chrome, cadmium, 3-5 dichlorophénol, diéthylamine et acide dodécylbenzène sulfonique, leur toxicité s'exprime de manière plus ou moins importante selon les essais mis en oeuvre.

Le test Microtox est l'essai le plus sensible aux substances testées, ce qui du reste est confirmé par les travaux de nombreux auteurs.

La sensibilité moindre du test Consommation d'oxygène des boues activées peut être imputable au rapport biomasse/toxique qui est peu favorable, ainsi qu'à la forte concentration en substrat dans le milieu réactionnel qui modifie la biodisponibilité des toxiques ; nous avons ainsi démontré que le cuivre était presque totalement complexé par les substances constituant le milieu synthétique, et en particulier la peptone, l'extrait de viande et les phosphates.

Quant au test Minéralisation du glucose, sa sensibilité est très sélective ; ceci est de nature à mettre en cause le réactif biologiques lui-même, en l'occurence Escherichia coli, la sensibilité spécifique de la souche mais aussi les conditions d'essai qui peuvent jouer sur l'état physiologique des bactéries.

De part sa sensibilité, sa répétabilité et sa rapidité, le test Microtox est parfaitement adapté au contrôle des pollutions en milieu aquatique (eaux de surface, eaux souterraines, milieu marin), et au screening de toxicité des effluents et des lixiviats.

Pour les échantillons volatiles et peu solubles, le test Consommation d'oxygène paraît plus intéressant car le milieu réactionnel est clos et les mesures sont réalisées sous agitation. Ce bioessai, dont le réactif biologique est constitué de boues activées, sera avantageusement utilisé dans la prédiction des effets nocifs éventuels des eaux usées sur le fonctionnement des stations d'épuration.

Bien que les performances du test Minéralisation du glucose soient médiocres, la méthodologie de ce bioessai pourrait être appliquée dans le cadre des tests de toxicité en amont des essais de biodégradabilité ; Escherichia coli serait alors remplacée par la microflore des essais de biodégradabilité.

Jusqu'à présent, le contrôle de l'absence de toxicité des substances dont on étudie la biodégradabilité, n'a fait l'objet que de rares travaux. Mais, compte tenu de la nature même du réactif biologique, il est prévisible que les tests de toxicité bactériens auront un rôle important à jouer dans ce domaine.

9 - BIBLIOGRAPHIE

AFNOR T 73-265, 1982. Agents de surface. Détergents. Agents de surface anioniques. Détermination de la biodégradabilité. 12 p.

AFNOR R 90-306, 1984. Evaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie "ultime" des produits organiques solubles. 9 p.

AFNOR T 95 A - Doc. 35, 1984. Qualité de l'eau. Essai d'Inhibition de la consommation d'oxygène des boues activées, 12 p.

ALBRIGHT L.J. and WILSON E.M., 1974. Sub-lethal effects of several metallic salts organic compounds combinations upon the heterotrophic microflora of a natural water, Water Res, 8, 101-105.

BALAKRISHNAN C.V. and LANGERMAN N., 1977. The isolation of bacterial glycoprotein with luciferase activity. Arch. Biochem. Biophys., 181, 680-682.

BARNHART C.L.H. and WESTAL J.R., 1983. Effects of environmental toxicants on metabolic activity of natural microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., 46 (5), 970-977.

BAUDA P., 1986. Accumulation et toxicité du cadmium chez les bactéries gram négatives : Rôle des enveloppes bactériennes. Thèse de doctorat, Université de Metz, 166 p.

BAUDA P. and BLOCK J.C., 1985. Cadmium biosorption and toxicity to laboratory grown bacteria. Environ. Technol. Lett., 6, 445-454.

BAUER N.J., SEIDLER R.J. and KNITTEL M.D., 1981. A simple, rapid bioassay for detecting effects of pollutants on bacteria. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27, 577-582.

BAZIN C., CHAMBON P., BONNEFILLE M. et LARBAIGT G., sous presse. Comparaison des sensibilités du test Microtox et du test Daphnie pour 14 substances à risque toxique élevé.

BEAUBIEN A., 1982. Etudes microcalorimétriques des phénomènes d'intoxication dans les processus d'épuration biologique. Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke, Canada, 166 p.

BEAUBIEN A., BOUCHARD A. and JOLICOEUR C., 1986. Multispecies toxicity assessment procedure using flow microcalorimetry : a comparison with other toxicity evaluation methods. Toxic. Assess. Int. Q., 1, 187-200.

BEAUBIEN A. and JOLICOEUR C., 1984. The toxicity of various heavy metals, alcohols and surfactants to microorganisms in a biodegradation process : a flow microcalorimetry investigation. 261-281. In Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, D. LIU and B.J. DUTKA (Eds.), Marcel Dekker, New-York.

BEAUBIEN A. and JOLICOEUR C., 1985. Applications of fow microcalorimetry to process control in biological treatment of industrial wastewater. J. Water Pollut. Contr. Fed., 57, 95-100.

BEAUBIEN A., SIMARD M.A., LAVALLEE J.F., DESROSIERS O. and JOLICOEUR C., 1985. A flow microcalorimetry investigation of the toxicity effects induced by aliphatic alcohols in a heterogeneous aerobic culture. Water Res., 1, 1-9.

BITTON G., 1983. Bacterial and biochemical tests for assessing chemical toxicity in the aquatic environment : a review. CRC Crit. Rev. Environ. Control, 13, 51-67.

BITTON G. and FREIHOFER V., 1978. Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward Klebsiella aerogenes. Microbial Ecol., 4, 119-125.

BITTON G., KHAFIF T., CHATAIGNER N., BASTIDE J. and COSTE C.M., 1986. A direct INT-deshydrogenase assay (DIDHA) for assessing chemical toxicity. Toxic. Assess. INT. Q., 1, 1-12.

BLOCK J.C., BAUDA P. and RETEUNA C., 1988. Ecotoxicity testing using aquatic bacteria. In Aquatic toxicology, A. BOUDOU and F. RIBEYRE, (Eds.) CRC Press, Boca Raton.

BOIS F., VAILLANT M. and VASSEUR P., 1986. Multiple regression analysis of toxic interactions : application to the Microtox test and general comments. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36, 707-714.

BROECKER B. and ZAHN R., 1977. The performance of activated sludge plants compared with the results of various bacterial toxicity tests - A study with 3,5 dichlorophenol. Water Res., 11, 165-172.

BROWN D., HITZ H.R. and SCHAFER L., 1981. The assessment of the possible inhibitory effect of dye-stuffs on aerobic waste-water bacteria exprience with a screening test. Chemosphere, 10, 245-261.

BROWN M.J. and LESTER J.N., 1982. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. 1- Effects of metal concentration. Water Res., 16, 1539-1548.

BULICH A.A., 1982. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. Process Biochem., 17, 45-47.

BULICH A.A., 1984. Microtox, a bacterial toxicity test with several environmental applications. 55-64. In Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, D. LIU and B.J. DUTKA (Eds.), Marcel Dekker, New-York.

BULICH A.A. and GREENE M.W., 1978. The use of luminescent bacteria for biological monitoring of water quality. Rapport Beckman Instruments, 98-106.

BULICH A.A., GREENE M.W. and ISENBERG D.L., 1981. Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of toxicity of pure compounds and complex effluents. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, ASTM STP 737, 338-347.

CALLEJA A., BALDASANO J.M. and MULLET A., 1986. Toxicity analysis of leachates from hazardous wastes via Microtox and Daphnia magna. Toxic. Assess. INT. Q., 1, 73-83.

CAMPBELL G.C. and BAKER J.H., 1978. Estimation of bacterial production in fresh waters by the simultaneous measurement of $|^{35}S|$ sulphate and D-$|^{3}H|$ glucose uptake in the dark. Can. J. Microbiol., 24, 939-946.

CAMPBELL G.C. et COUTURE P., 1976. Etude intégrée de la qualité des eaux de bassins versants des rivières Saint-François et Yamaska. Rapport INRS-Eau, Sainte Foy, Québec, Canada.

CENCI G., MOROZZI G. and CALDINI G., 1985. Injury heavy metals in Escherichia coli. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34, 188-195.

CHANG J.C., TAYLOR P.B. and LEACH F.R., 1981. Use of the Microtox assay system for environmental samples. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26, 150-156.

CLINE T.W. and HASTINGS J.W., 1974. Bacterial bioluminescence in vivo : control and synthesis of aldehyde factor in temperature conditionnal luminescence mutants. J. Bacteriol., 118 (3), 1059-1066.

COLEMAN R.N. and QURESHI A.A., 1985. Microtox and Spirillum volutans tests for assessing toxicity of environmental samples. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35, 443-451.

CURTIS C., LIMA A., LOZANO S.J. and VEITH G.D., 1982. Evaluation of a bacterial bioluminescence bioassay as a method for predicting acute toxicity of organic chemicals to fish. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, ASTM STP 766, 170-178.

DANILOV V., BARANOVA N., ISMAILOV A. and EGOROV N., 1982. The effect of camphor on bacterial bioluminescence. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 125-129.

DANOUX L., 1982. Etude de la toxicité de divers effluents et substances chimiques à l'aide du Microtox. Thèse d'exercice, Université de Nancy I, 53 p.

DEGREMONT, 1978. Memento technique de l'eau. Technique et Documentation, Paris, 1200 p.

DE ZWART D., and SLOOF W., 1983. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. Aquat. Toxicol., 4, 129-138.

DELATTRE J.M. et LECLERC H., 1980. Activité bactérienne hétérotrophe de l'eau de mer à Gravelines (Nord) : signification et exemples de perturbations. Journal Français d'Hydrologie, 11/2, 123-132.

DELISTRATY D., 1984. Bioluminescent toxicity assay of synfuel by product waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 32, 613-620.

DETOC S., 1988. Etude des produits de dégradation du pentachlorophénol. Thèse de doctorat, Université de Grenoble, 210 p.

DORWARD E.J. and BARISAS B.G., 1984. Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. Environ. Sci. Technol., 18, 967-972.

DUNSTALL T.G. and SCHWARZ C.J., 1983. Effects of temperature elevation and entrainment on heterotrophic uptake of U- C glutamic acid. Water Res., 17, 1847-1853.

DUTKA B.J. and KWAN K.K., 1981. Comparison of three microbial toxicity screening tests with the Microtox test. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27, 753-757.

DUTKA B.J. and KWAN K.K., 1982. Application of four bacterial screening procedures to assess changes in the toxicity of chemicals in mixtures. Environ. Pollut., Série A, 29, 125-134.

DUTKA B.J. and KWAN K.K., 1984. Studies on a synthetic activated sludge toxicity screening procedure with comparison to three microbial toxicity tests. 125-138. In Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, D. LIU and B.J. DUTKA (Eds.), Marcel Dekker, New-York.

DUTKA B.J., NYHOLM N. and PETERSON J., 1983. Comparison of several microbiological toxicity screening tests. Water Res., 17, 1363-1368.

ENGELBRECHT J., NEALSON K. and SILVERMAN M., 1983. Bacterial bioluminescence : isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri. Cell., 32, 773-781.

FERARD J.F., VASSEUR P., DANOUX L. et LARBAIGT G., 1983. Application d'un test d'inhibition de luminescence bactérienne à l'étude toxicologique d'effluents complexes et de substances chimiques. Revue Française des Sciences de l'Eau, 2, 221-237.

FERRONI G.D. and LEDUC L.G., 1984. The unreliability of the kinetic approach to measuring bacterial mineralization activities at low in situ temperatures in an acid aquatic environment. Water Res., 18, 1185-1188.

FERRONI G.D., LEDUC L.G. and CHOQUET C.G., 1983. Preliminary studies on the use of heterotrophic activity method to evaluate acid - stress effects in aquatic environments. Water Res., 17, 1379-1384.

GILLEPSIE P.A. and VACCARO R.G., 1978. A bacterial bioassay for measuring copper chelation capacity of sea water. Limnol. Oceanogr., 23, 543-548.

GOTTSCHALK G., 1986. Bacterial metabolism. Springer-Verlag, New-York, 359 p.

GRANGE D. et PECHEUX F., 1984. Utilisation de bactéries luminescentes pour évaluer la toxicité d'une eau, test de l'appareil Microtox. Rapport du Laboratoire Régional de l'Ouest Parisien, 36 p.

GREENE J.C., MILLER W.E., DEBACON M.K., LONG M.A. and BARTELS C.L., 1985. A comparison of three microbiol assay procedures for measuring toxicity of chemical residues. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14, 659-667.

GRIFFITHS R.P., HANUS F.J. and MORITA R.Y., 1974. The effects of various water sample treatments on the apparent uptake of glutamic acid by natural marine microbial populations. Can. J. Microbiol., 10, 1261-1266.

HAGUENOER J.M. et FURON D., 1981. Toxicologie et hygiène industrielle - Les dérivés minéraux. 1ère et 2ème partie, Technique et documentation, Paris.

HERBLAND A.M. et BOIS J.F., 1974. Assimilation et minéralisation de la matière organique dissoute dans la mer : méthode par comptage en scintillation liquide. Mar. Biol., 24, 203-212.

HOBBIE J.E. and CRAWFORD C.C., 1969. Respiration corrections for bacterial uptake of dissolved organic compounds in natural waters. Limnol. Oceanogr., 14, 528-532.

HOBBIE J.E., CRAWFORD C.C. and WEBB K.L., 1968. Amino acid flux in an estuary, Science, 159, 1463-1464.

HOLZMAN T.F. and BALDWIN T.O., 1980. The effects of phosphate on the structure and stability of the luciferases from Beneckea harveyi, Photobacterium fischeri and Photobacterium phosphoreum. Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 1199-1206.

HUET M.C., DESCHAMPS F. et CABRIDENC R., 1980. Etude de l'inhibition du potentiel hétérotrophe des populations bactériennes des eaux. Journal Français d'Hydrologie, 11/2, 241-256.

HUY TUE B., CABRIDENC R. et LEPAILLEUR H., 1971. Etude de la toxicité des sels de chrome vis à vis des microorganismes responsables de l'épuration. Terre et Eaux, 1, 13-17.

IRCHA. Les produits chimiques dans l'environnement. Registre des données normalisées, de leurs effets sur l'environnement. Tome 1 et 2.

ISO 8192, 1986. Water quality : test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge. 10 p.

JAKUBCZAK E., DELMAERE C. et LECLERC H., 1981. Sensibilité de bactéries du milieu aquatique à quelques substances toxiques. 93-104. Dans les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique, H. LECLERC et D. DIVE (Eds.), INSERM, Paris.

JOHNSON L.D. and YOUNG J.C., 1983. Inhibition of anaerobic digestion by organic priority pollutants. J. Water Pollut. Contr. Fed., 55, 1441-1449.

JONAS R.B., GILMOUR C.C., STONER D.L., WEIR M.M. and TUTTLE J.H., 1984. Comparison of methods to measure acute metal and organometal toxicity to natural aquatic microbial communities. Appl. Environ. Microbiol., 47, 1005-1011.

KING E.F., 1984. A comparative study of methods for assessing the toxicity to bacteria of single chemicals and mixtures. 175-194. In Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, D. LIU and B.J. DUTKA (Eds.), Marcel Dekker, New-York.

KING E.F. and PAINTER H.A., 1985. The effect of acclimatization on the toxicity of chemicals to activated sludge microorganisms. Environ. Pollut., Série A, 39, 267-280.

KING E.F. and PAINTER H.A., 1986. Inhibition of respiration of activated sludge : variability and reproducibility of results. Toxic. Assess. INT. Q., 1, 27-39.

KRUH J., 1979. Biochimie, Etudes médicales et biologiques, II. métabolisme. Hermann, Paris, 241 p.

LAFONT J. et ROMAND A., 1983. Une méthode bactériologique de détection de micropolluants organiques dans l'eau. Microbiol. Aliment. Nutrit., 1, 83-86.

LAMB J.C., WESTGARTH W.C., ROGERS J.L. and VERNIMMEN A.P., 1964. A technique for evaluating the biological treatability of industrial wastes. J. Water Pollut. Contr. Fed., 36, 1263-1284.

LARSON R.J. and SCHAEFFER S.L., 1982. A rapid method for determining the toxicity of chemicals to activated sludge. Water Res., 16 (5), 675-680.

LEBSACK M.E., ANDERSON A.D., DE GRAEVE G.M. and BERGMAN H.L., 1981. Comparison of bacterial luminescence and fish bioassay results for fossil-fuel process waters and phenolic constituents. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, ASTM STP 737, 348-356.

LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUME J. et WATTRE P., 1977. Microbiologie appliquée. Doin, Paris, 227 p.

LECLERC H., IZARD D., HUSSON M., WATTRE P. et JAKUBCZAK E., 1983. Microbiologie générale. Doin, Paris, 369 p.

LEDUC L.G. and FERRONI G.D., 1984. Glucose mineralization activity and the use of the heterotrophic activity method in an acidified lake. Water Res., 18 609-612.

LEVESQUE L.. Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales. Rapport n° 4 et n° 6 de l'Association Française pour l'Etude des Eaux.

LIU D., 1981. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26, 145-148.

LIU D. and KWANIEWSKA K., 1981. An improved agar plate method for rapid assessment of chemical inhibition to microbial populations. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27, 289-294.

LOY H.W., SCHIAFFINO S.S. and SAVCHUCK W.B., 1961. Determination of arsenic valence by microbiological assay. Anal. Chem., 33, 283-285.

MARCHAL N., BOURDON J.L. et RICHARD D., 1982. Les milieux de culture. Biologie appliquée, A. OBRE et R. BUTTIAUX (Eds.), Doin, Paris, 459 p.

MARTIN G., 1983. L'adenosine triphosphate. Sciences de l'eau, 2, 407-435.

MICROTOX APPLICATION NOTES, M 105, 1982. Toxicity testing of hazardous wastes. Beckman Instruments.

MICROTOX APPLICATION NOTES, M 102, 1981. Advantage of using several test times. Beckman Instruments.

MILLER W.E., PETERSON S.A., GREENE J.C. and CALLAHAN C.A., 1985. Comparative toxicology of laboratory organisms for assessing hazardous waste sites. J. Environ. Qual., 14, 569-574.

MITCHELL P., 1966. Chimiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev., 41, 445-502.

MONTGOMERY H.A.C., 1967. The determination of biochemical oxygen demand by respirometric methods. Water Res., 1, 631-662.

MOWAT A., 1976. Measurement of metal toxicity by biochemical oxygen demand. J. Water Pollut. Contr. Fed., 48, 853-866.

NE'EMAN Z., ULITZUR S., BRANTON D. and HASTINGS J.W., 1977. Membranes polypeptides co-induced with the bacterial bioluminescent system. The J. Biol. Chem., 252, 5150-5154.

NEALSON K.H. and HASTINGS J.W., 1979. Bacterial bioluminescence : its control and ecological significance. Microbiol. Rev., 43, 496-518.

NEUFELD R.D. and HERMANN E.R., 1975. Heavy metal removal by acclimated activated sludge. J. Water Pollut. Contr. Fed., 47, 310-329.

NOUVION N., 1983. Caractérisation de la biomasse fixée sur support granulaire dans un réacteur à flux ascendant. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université de Metz, 40 p.

OCDE 209, 1984. Boues activées, essai d'inhibition de la respiration, 10 p.

PARKER C.E., 1982. Surrogate parameter analysis for organic priority pollutants. J. Water Pollut. Contr. Fed. , 54, 77-86.

PARSONS T.R. and STRICKLAND J.D.H., 1962. On the production of particulate organic carbon by heterotrophic processes in sea water. Deep-sea Res., 8, 211-222.

PATTERSON J.W., BREZONIK P.L. and PUTNAM H.D., 1970. Sludge activity parameters and their application to toxicity measurements in activated sludge. 128-154. In Proc. Purdue Univer. Waste Conf., Purdue University, Lafayette, Indiana.

PEAKE E. and LEAN M.A., 1982. The toxicity of waters produced during in site recovery of oil from the Athabasca oil sands as determined by the Microtox bacterial system. Aquatic Toxicity Workshop, Edmonton, Alberta, 9 p.

PELTIER W. and WEBER C.I., 1980. Comparison of the response of Microtox, fish and invertebrates to effluent toxicity. U.S. E.P.A. Quality Assurance Newletter, 4, 13 p.

PFAENDER F.K. and BARTHOLOMEY G.W., 1982. Measurement of aquatic biodegradation rates by determining heterotrophic uptake of radiolabeled pollutants. Appl. Environ. Microbiol., 44, 159-164.

PLAYNE M.J. and SMITH B.R., 1983. Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria. Biotechnol. Bioeng., 25, 1251-1265.

QURESHI A.A., COLEMAN R.N. and PARAN J.H., 1984. Evaluation and refinement of the Microtox test for use. 1-22. In Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, D. LIU and B.J. DUTKA (Eds.), Marcel Dekker, New-York.

QURESHI A.A., FLOOD K.W., THOMPSON S.R., JANHURST S.M., INNISS W.E. and ROKOSH D.A., 1982. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. In Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, ASTM STP 766, 179-195.

RETEUNA C., VASSEUR P., CABRIDENC R., LEPAILLEUR H. et BRIAND D., 1987. Le test Microtox pour l'évaluation de la toxicité des pesticides. Annales A.N.P.P., 5, 209-220.

RIBO J.M. and KAISER K.L.E., 1983. Effects of selected chemical to photoluminescent bacteria and their correlations with acute and sublethal effects on other organisms. Chemosphere, 12, 1421-1442.

ROBRA K.H., 1979. Determining acute toxic concentrations by means of luminescence measurements with Photobacterium phosphoreum. Cité par Bulich et al., 1981.

RYSSOV-NIELSEN H., 1975. Measurement of the inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of the TTC-deshydrogenase activity. Water Res., 9, 1179-1185.

STANLEY P.M. and STALEY J.T., 1977. Acetate uptake by aquatic bacterial communities measured by autoradiography and filterable radioactivity. Limnol. and Oceanogr., 22, 26-37.

TAM T.Y. and TREVORS J.T., 1981. Toxicity of pentachlorophenol to Azotobacter vinelandii. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27, 230-234.

THERIEN N., LE CALVE P. and JONES P., 1984. A respirometric study of the influence of aliphatic alcohols on activated sludge. Water Res., 18, 905-910.

TREVORS J.T. and BASARABA J., 1980. Toxicity of benzoquinone and hydroquinone in short-term bacterial bioassays. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 25, 672-675.

TREVORS J.T., MAYFIELD C.I. and INNISS W.E., 1981. A rapid toxicity test using Pseudomonas fluorescens. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26, 433-439.

VASSEUR P., BOIS F., FERARD J.F. and RAST C., 1986. Influence of physico-chemical parameters on the Microtox test response. Toxic. Assess. INT. Q., 1, 283-300.

VASSEUR P., DIVE D., SOKAR Z. and BONNEMAIN H., 1988. Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments. Chemosphere, 17, 767-782.

VASSEUR P., FERARD J.F., RAST C. ans LARBAIGT G., 1984 . Luminescent marine bacteria in acute toxicity testing. 381-396. In Ecotoxicological testing for the marine environment, G. PERSOONE, E. JASPERS and C. CLANS (Eds), State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium.

VASSEUR P., FERARD J.F., RAST C. and LARBAIGT G., 1984 . Luminescent marine bacteria in ecotoxicity screening tests of complex effluents. 23-26. In Toxicity Screening Procedures using Bacterial Systems, D. LIU and B.J. DUTKA (Eds), Marcel Dekker, New-York.

VASSEUR P., FERARD J.F., VIAL J. et LARBAIGT G., 1984 . Comparaison des tests Microtox et Daphnie pour l'évaluation de la toxicité aiguë d'effluents industriels. Environ. Pollut., 34, 225-235.

VERVOORT J., O'KANE D.J., CARREIRA L.A. and LEE J., 1983. Identification of a lumazine protein from Photobacterium leiognathi by coherent anti-stokes raman spectroscopy. Photochemistry and Photobiology, 17, 117-119.

WILLIAMS P.J., 1973. The validity of the application of simple kinetic analysis to heterogeneous microbial populations. Limnol. Oceanogr., 18, 159-165.

WILLIAMSON K.J. and NELSON P.O., 1983. Bacterial bioassay for level 1 toxicity assessment. Report US. EPA, 76 p.

WRIGHT R.T. and HOBBIE J.E., 1965. The uptake of organic solutes in lake water. Limnol. Oceanogr., 10, 22-28.

WRIGHT R.T. and HOBBIE J.E., 1966. Use of glucose and acetate by bacteria and algae in aquatic ecosystems. Ecology, 47, 447-464.

YOSHIOKA Y., NAGASE H., OSE Y. and SATO T., 1986. Evaluation of the test method "Activated sludge respiration inhibition test" proposed by the OECD. Ecotoxicol. Environ. Safety, 12, 206-212.

10 - ANNEXES

A N N E X E 1

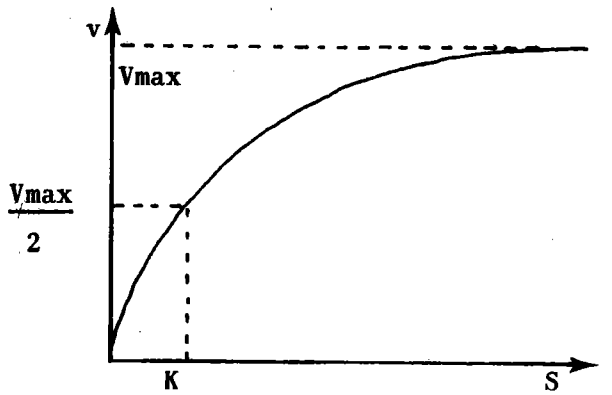


Figure 1 : Représentation graphique d'une cinétique de type Michaelis-Menten.

Cette cinétique est représentatée par l'équation

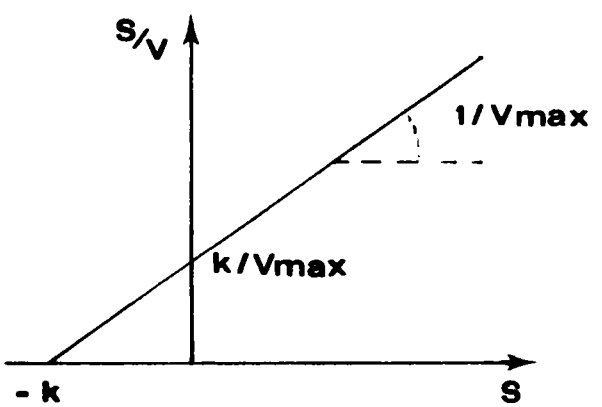
$$v = Vmax \cdot \frac{|S|}{K + |S|}$$

avec v = vitesse de la réaction enzymatique

Vmax = vitesse de la réaction lorsque la concentration en substrat est saturante

K = Concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est égale à $^1/_2$ de Vmax

K peut être assimilé à l'inverse de la constante d'affinité de l'enzyme pour son substrat.



$$\frac{|S|}{v} = \frac{K}{Vmax} + \frac{1}{Vmax} \cdot |S|$$

Figure 2 : Autre représentation graphique d'une réaction enzymatique type Michaelis-Menten.

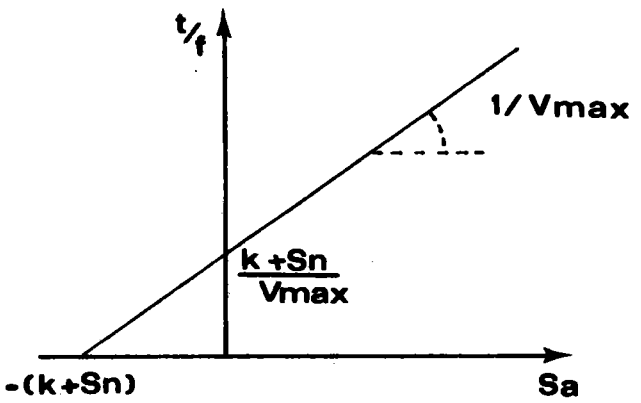


Figure 3 : Représentation graphique de la réaction d'assimilation d'un substrat carboné par des populations bactériennes selon le modèle de Michaelis Menten.

$$\frac{t}{f} = \frac{K + |Sn|}{Vmax} + \frac{|Sa|}{Vmax}$$

avec f = fraction de substrat radioactif assimilée

t = temps d'incubation (heure)

Sa = Concentration du substrat ajouté (ug/l)

Sn = Concentration du substrat naturel (ug/l)

Vmax = vitesse maximale d'assimilation du substrat (ug/l/h)

K = Concentration en substrat pour laquelle la vitesse d'assimilation est égale à $^1/_2$ de Vmax (ug/l).

A N N E X E 2

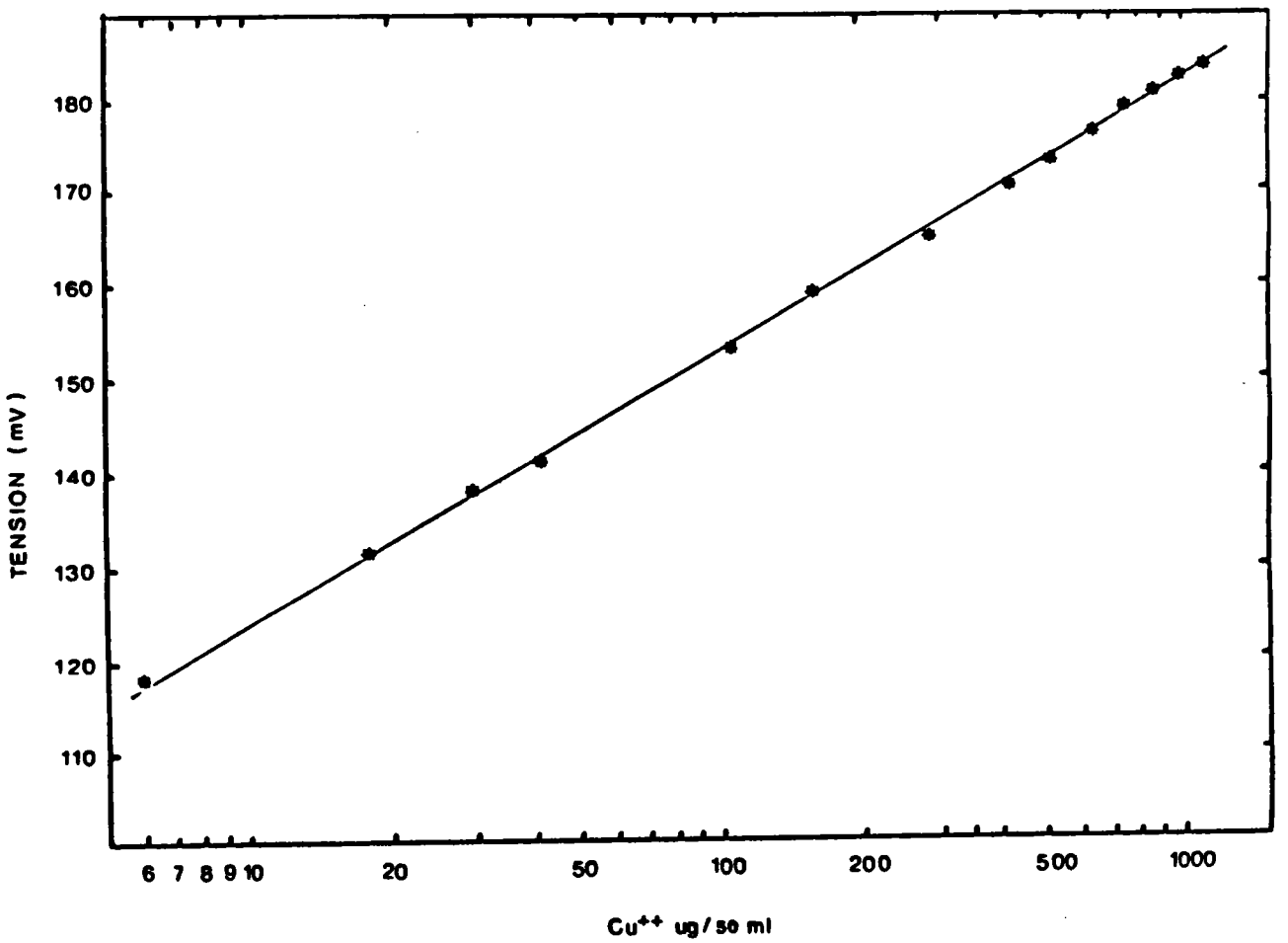


Figure 4 : Gamme étalon pour le dosage du cuivre libre.

ANNEXE 3

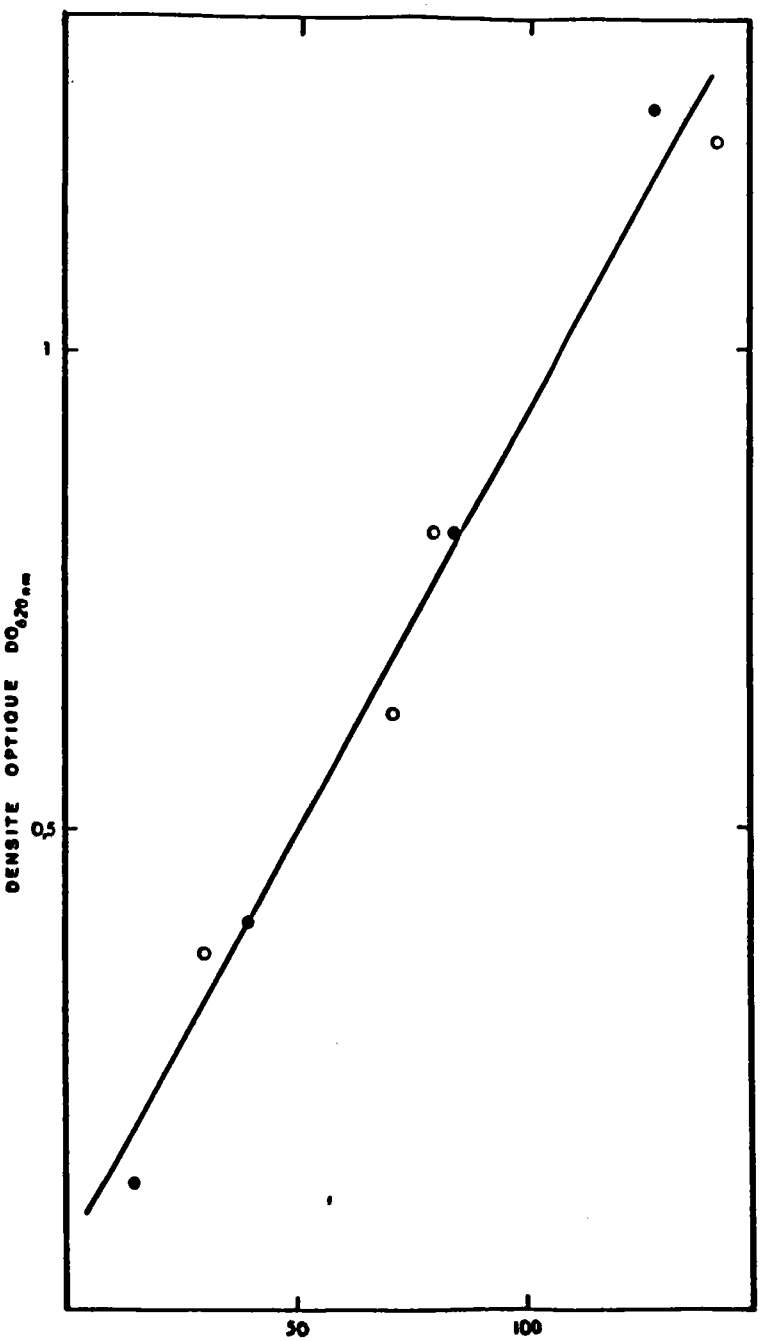


Figure 5 : Courbe étalon "$DO_{620\ nm}$ en fonction de la concentration en bactéries".

1er essai

2ème essai

ANNEXE 4

Détermination de la CI_{50} du 3-5 dichlorophénol au moyen du test Minéralisation du glucose réalisé avec *Escherichia coli* préalablement cultivé en milieu liquide.

- Milieu de culture

Le milieu de culture liquide utilisé pour Escherichia coli est le suivant :

* Bio-trypcase (5364 1, Biomerieux) 10 g
* Extrait de levure (112002, Biokar) 5 g
* NaCl 5 g
* Glucose 2 g

q.s.p. 1000 ml d'eau distillée

(pH entre 7 et 7,5 - stérilisation à 120°C pendant 15 min.).

- Préparation du réactif biologique

Les différentes étapes de la préparation du réactif biologique sont résumées dans la figure 6 ci-dessous.

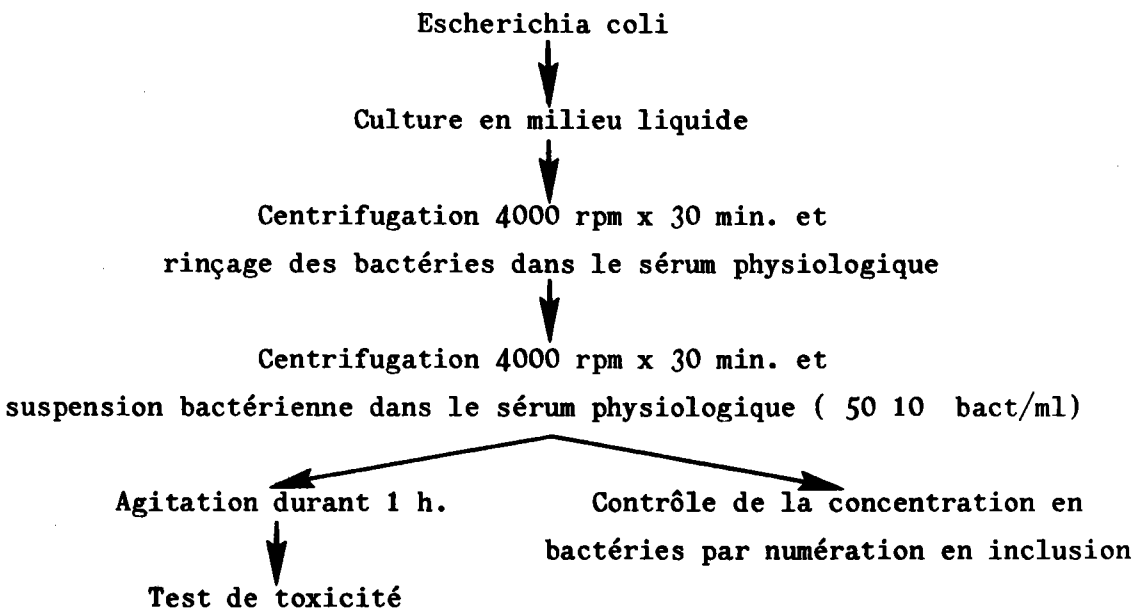


Figure 6 : Préparation du réactif biologique à partir de cultures d'Escherichia coli en milieu liquide.

Les colonies prélevées sur milieu PCA, sont mises en suspension dans 5 ml de bouillon nutritif utilisés pour ensemencer les 250 ml de milieu liquide contenus dans des erlenmeyers de 1 l.

Les cultures sont ensuite mises sous agitation dans un bain-marie à 37°C. La croissance est stoppée après 4 heures d'incubation (bactéries en phase exponentielle de croissance) ou après 20 heures (bactéries en phase stationnaire). Une première centrifugation à 4000 rpm pendant 30 min. permet l'élimination du milieu et le rinçage des bactéries avec le sérum physiologique. Après une deuxième centrifugation, la suspension bactérienne est ajustée à environ 50 10^5 bact./ml par l'ajout d'une quantité appropriée de sérum physiologique.

- Toxicité du 3-5 dichlorophénol

Les courbes dose-effet du 3-5 dichlorophénol, obtenues avec Escherichia coli prélevé en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance, sont voisines et les CI_{50} sont proches de 85 mg/l.
Ces valeurs de CI_{50} bien que plus faibles que celles obtenues avec des bactéries prélevées directement sur gélose (CI_{50} = 120 mg/l) restent cependant du même ordre de grandeur. Il en résulte que le mode de préculture d'Escherichia coli, sur gélose ou en milieu liquide, ne modifie que faiblement la toxicité du 3-5 dichlorophénol.

ANNEXE 5

Tableau 1 : Toxicité de quelques substances chimiques (exprimée en mole/litre) évaluée au moyen du test Microtox, Consommation d'oxygène des boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Substances testées	CI_{50}-Microtox (M/l)	CI_{50}-Consommation d'oxygène (M/l)	CI_{50}-Minéralisation du glucose (M/l)
Cu^{++}	2.10^{-6}	$1,5.10^{-4}$	$2,7.10^{-5}$
Cd^{++}	$2,4.10^{-5}$	$3,4.10^{-5}$	$4,7.10^{-3}$
Zn^{++}	$1,2.10^{-5}$	$7,3.10^{-5}$	$1,5.10^{-5}$
Cr^{6+}	$2,5.10^{-4}$	$1,9.10^{-4}$	$6,4.10^{-3}$
3-5 dichlorophénol	$2,8.10^{-5}$	$6,2.10^{-5}$	$7,4.10^{-4}$
Benzène	$1,1.10^{-3}$	$9,4.10^{-3}$	*NT ($1,3.10^{-2}$)
Dibromo 1-2 éthane	$3,9.10^{-3}$	$4,5.10^{-3}$	*NT ($5,3.10^{-3}$)
Diéthylamine	$3,2.10^{-4}$	$2,3.10^{-3}$	$8,4.10^{-4}$
Acide dodécylbenzène sulfonique	9.10^{-5}	$2,2.10^{-4}$	$1,7.10^{-4}$
Atrazine	$> 4.10^{-4}$	*NT ($4,6.10^{-4}$)	*NT ($4,6.10^{-4}$)
Malathion	$2,5.10^{-4}$	*NT (3.10^{-4})	*NT (3.10^{-4})

*NT = Non toxique (concentration maximale testée)

ANNEXE 6

Tableau 2 : Les essais de biodégradabilité et leurs caractéristiques.

Classification des essais de biodégradabilité	Objectifs	Conditions de l'essai	Différents tests OCDE	Réactif biologique	Mesures
Essai de biodégradabilité immédiate ou Ready biodegradability	Si essai + ↓ le produit est classé aisément biodégradable	Essai rigoureux. Seule source de carbone = produit testé. Acclimatation limitée des microorganismes,	. Essai AFNOR modifié (301 A-OCDE) . Essai STURM modifié (301 B-OCDE) . Essai en fiole fermée (301 D-OCDE) . Essai de screening modifié (301 E-OCDE)	. Eaux de surface polluées . Boues activées . Mélange (lixiviat, effluent) . Mélange (lixiviat, effluent, eau de surface)	. C.O.D. . CO_2 libéré . CO_2 consommé . C.O.D.
Essais de biodégradabilité intrinsèque ou Inherent biodegradability	Si essai + ↓ le produit est classé intrinsèquement biodégradable	Proportion plus favorable Produit/biomasse. Souvent autre source de carbone apportée. Exposition prolongée du produit aux microorganismes.	. Essai SCAS modifié (302 A-OCDE) . Essai Zahn-Wellens modifié (302 B-OCDE)	. Boues activées . Boues activées	. C.O.D. . C.O.D.
Essais de simulation	Détermine le taux de biodégradation dans des conditions semblables à celles de l'environnement	Simule un compartiment particulier, par exemple les stations d'épuration biologiques	. Essai d'unités couplées (303 A-OCDE)	. Boues activées	. D.C.O. ou C.O.D.

SOMMAIRE

INTRODUCTION..... 1

1 - GENERALITES..... 4

2 - LES TESTS DE TOXICITE SUR BACTERIES..... 8

2.1. PRESENTATION DU MATERIEL BACTERIEN..... 9

2.2. LES PRINCIPAUX TESTS DE TOXICITE BACTERIENS..... 11

2.2.1. Inhibition du fonctionnement global de la cellule bactérienne..... 11
2.2.2. Inhibition du fonctionnement de la chaîne respiratoire..... 12
2.2.3. Inhibition de l'assimilation de substrat carboné..... 17
2.2.4. Inhibition de mécanismes particuliers..... 17

2.3. QUELQUES REMARQUES SUR LES TESTS DE TOXICITE BACTERIENS..... 18

2.3.1. Critères d'évaluation et mesures de la toxicité..... 18
2.3.2. Choix du réactif bactérien..... 19
2.3.3. Conditions expérimentales..... 20

3 - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE..... 22

3.1. INHIBITION DE LA BIOLUMINESCENCE DE PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM..... 23

3.1.1. Principe..... 23
3.1.2. La luminescence bactérienne..... 23
3.1.3. Influence des conditions expérimentales 24
3.1.4. Influence des paramètres physico-chimiques..... 29
3.1.5. Répétabilité..... 31
3.1.6. Sensibilité du test Microtox et comparaison avec les autres bioessais..... 33
3.1.7. Applications du test Microtox..... 36

3.2. INHIBITION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE..... 39

3.2.1. Principe..... 39
3.2.2. Les mesures respirométriques..... 39
3.2.3. La consommation d'oxygène des boues activées..... 40
3.2.4. Les tests d'inhibition de la consommation d'oxygène.... 42
3.2.5. Influence des paramètres physico-chimiques..... 45
3.2.6. Répétabilité..... 46
3.2.7. Sensibilité du test Inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées et comparaison avec les autres bioessais..... 47
3.2.8. Applications du test Inhibition de la consommation d'oxygène de boues activées..... 48

3.3. INHIBITION DE LA MINERALISATION DU GLUCOSE..... 50

3.3.1. Assimilation hétérotrophe des bactéries..... 50
3.3.2. Le potentiel hétérotrophe..... 50
3.3.3. Problèmes posés par la détermination du potentiel hétérotrophe..... 54
3.3.4. Les autres approches basées sur l'assimilation de substrat carboné radioactif..... 58
3.3.5. Problèmes liés aux mesures de la radioactivité fixée par les bactéries..... 60
3.3.6. Les mesures de minéralisation d'un substrat carboné.... 61

4 - ETUDE EXPERIMENTALE DU TEST "INHIBITION DE LA BIOLUMINESCENCE DE PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM"..... 64

4.1. MATERIEL ET METHODES..... 65

4.1.1. Réactifs..... 65
4.1.2. Matériel..... 66
4.1.3. Mode opératoire..... 67
4.1.4. Expression des résultats..... 69

4.2. RESULTATS..... 70

4.2.1. Influence de la durée d'incubation..... 70
4.2.2. Influence de la température d'incubation..... 72
4.2.3. Etude de la répétabilité..... 74
4.2.4. Evaluation de la CI_{50} de quelques substances chimiques..... 79

5 - ETUDE EXPERIMENTALE DU TEST "INHIBITION DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE DE BOUES ACTIVEES..... 81

5.1. MATERIEL ET METHODES..... 82

5.1.1. Présentation du test..... 82
5.1.2. Réactif biologique..... 82
5.1.3. Réactifs chimiques..... 86
5.1.4. Matériel..... 91
5.1.5. Protocole expérimental..... 93
5.1.6. Expression des résultats..... 97
5.1.7. Dosage potentiométrique du cuivre libre dans le milieu réactionnel..... 98

5.2. RESULTATS..... 99

5.2.1. Influence du milieu synthétique sur la concentration en cuivre libre..... 99
5.2.2. Consommation d'oxygène des boues activées en présence d'autres milieux..... 101
5.2.3. Consommation d'oxygène chez les témoins..... 102
5.2.4. Etude de la répétabilité..... 102
5.2.5. Evaluation de la CI_{50} de quelques substances chimiques..... 107

6 - ETUDE EXPERIMENTALE DU TEST "INHIBITION DE LA MINERALISATION DU GLUCOSE CHEZ ESCHERICHIA COLI"..... 109

6.1. MATERIEL ET METHODES..... 110

6.1.1. Réactifs..... 110
6.1.2. Matériel..... 111
6.1.3. Protocole expérimental..... 111
6.1.4. Expression des résultats..... 115

6.2. RESULTATS..... 117

6.2.1. Influence de la concentration en bactéries sur la minéralisation du glucose..... 117
6.2.2. Mise en évidence d'un facteur facteur "temps" sur le taux de minéralisation du glucose..... 117
6.2.3. Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur les résultats de toxicité..... 120
6.2.4. Devenir du glucose et bilan carboné..... 122
6.2.5. Etude de la répétabilité..... 124
6.2.6. Evaluation de la CI_{50} de quelques substances chimiques..... 127

7 - DISCUSSION..... 129

7.1. PERFORMANCES DES TESTS MICROTOX, CONSOMMATION D'OXYGENE DE BOUES ACTIVEES ET MINERALISATION DU GLUCOSE U- C PAR ESCHERICHIA COLI..... 130

7.1.1. Sensibilité..... 130
7.1.2. Répétabilité..... 144
7.1.3. Faisabilité et rapidité..... 146
7.1.4. Prix de revient..... 147
7.1.5. En résumé..... 147

7.2. LES DOMAINES D'APPLICATION DES TESTS MICROTOX, CONSOMMATION D'OXYGENE DE BOUES ACTIVEES ET MINERALISATION DU GLUCOSE CHEZ ESCHERICHIA COLI..... 149

7.2.1. Evaluation de la toxicité des substances chimiques..... 149
7.2.2. Détection dans les milieux naturels..... 150
7.2.3. Contrôle de toxicité dans les essais de biodégradabilité..... 151

8 - CONCLUSION..... 152

9 - BIBLIOGRAPHIE..... 156

10 - ANNEXES..... 170

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du métabolisme du glucose chez les bactéries hétérotrophes aérobies.

Figure 2 : Réactions d'oxydo-réduction utilisables par les bactéries hétérotrophes à des fins énergétiques.

Figure 3 : Chaîne respiratoire d'Escherichia coli en milieu aérobie.

Figure 4 : Principe de la mesure de l'activité déshydrogénasique au moyen de l'INT.

Figure 5 : Synthèse d'ATP selon la théorie chimiosmotique de Mitchell.

Figure 6 : Mécanisme biochimique de la luminescence.

Figure 7 : Le Respiromètre de Warburg.

Figure 8 : Vitesse de consommation spécifique de l'oxygène dissous par des boues activées en fonction de la concentration en substrat.

Figure 9 : Vitesse de consommation de l'oxygène dissous en fonction de la concentration en boues activées.

Figure 10 : Effet inhibiteur du p-nitrophénol sur la Vmax d'assimilation du glucose.

Figure 11 : Détermination de la CI_{50}-Vmax du p- nitrophénol.

Figure 12 : Schéma de l'enregistrement de la bioluminescence.

Figure 13 : Evolution de la toxicité de $CuSO_4$ sur Photobacterium phosphoreum en fonction de la durée de l'essai (0 = 15°C).

Figure 14 : Exemple de relation dose-effet du 3-5 dichlorophénol sur la bioluminescence bactérienne permettant la détermination de la CI_{50}.

Figure 15 : Exemple de relation dose-effet de $CuSO_4$ sur la bioluminescence bactérienne permettant la détermination de la CI_{50}.

Figure 16 : Pilote de boues activées.

Figure 17 : Verrerie nécessaire au test Consommation d'oxygène de boues activées.

Figure 18 : Résumé des différentes étapes du mode opératoire.

Figure 19 : Consommation d'oxygène des boues activées dans l'essai témoin, et les essais A, B, C et D contenant des concentrations croissantes de 3-5 dichlorophénol.

Figure 20 : Exemple de relation dose-effet du 3-5 dichlorophénol sur la Consommation d'oxygène des boues activées permettant la détermination de la CI_{50}.

Figure 21 : Consommation d'oxygène des boues activées dans l'essai témoin et les essais A, B, C et D contenant des concentrations croissantes en CuSO .

Figure 22 : Exemple de relation dose-effet de $CuSO_4$ sur la Consommation d'oxygène de boues activées permettant la détermination de la CI_{50}.

Figure 23 : Matériel utilisé dans le test "Inhibition de la minéralisation du glucose chez Escherichia coli".

Figure 24 : Préparation du réactif biologique pour le test "Minéralisation du glucose chez Escherichia coli".

Figure 25 : Protocole expérimental du test "Minéralisation du glucose chez Escherichia coli".

Figure 26 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par $56,5.10^5$ bact/ml.

Figure 27 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par $9,7.10^7$ bact/ml.

Figure 28 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré sur une période de 2 h par $44,5.10^5$ bact/ml.

Figure 29 : Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur le taux de minéralisation du glucose par 35.10^5 bact/ml.

Figure 30 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par 46.10^5 bact/ml pour les essais témoins et 5 essais avec des concentrations croissantes en 3-5 dichlorophénol.

Figure 31 : Exemple de relation dose-effet du 3-5 dichlorophénol sur la minéralisation du glucose chez Escherichia coli permettant la détermination de la CI_{50}.

Figure 32 : Cinétique du $^{14}CO_2$ libéré par $57,5.10^5$ bact/ml pour les essais témoins et 5 essais avec des concentrations croissantes en $CuSO_4$.

Figure 33 : Exemple de relation dose-effet de $CuSO_4$ sur la minéralisation du glucose chez Escherichia coli permettant la détermination de la CI_{50}.

Figure 34 : Comparaison de la sensibilité à quelques substances chimiques des tests Microtox, Consommation d'oxygène et Minéralisation du glucose.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1a : Influence de la durée d'exposition sur la toxicité exprimée par la CI_{50} en mg/l (0 = 15°C) ; substances dites à action rapide.

Tableau 1b : Influence de la durée d'exposition sur la toxicité exprimée par la CI_{50} en mg/l (0 = 15°C) ; substances dites à action intermédiaire.

Tableau 1c : Influence de la durée d'exposition sur la toxicité exprimée par la CI_{50} en mg/l (0 = 15°C) ; substances dites à action lente.

Tableau 2 : Données bibliographiques concernant la répétabilité du bioessai Microtox.

Tableau 3 : Influence de la durée d'exposition sur la répétabilité du test Microtox (0 = 15°C).

Tableau 4 : Sensibilité comparée des tests Microtox, Daphnies et Poissons.

Tableau 5 : Détermination de la CI_{50}-Vmax de quelques produits chimiques.

Tableau 6 : CI_{50} du cadmium et du diquat mesurées sur l'assimilation de substrat carboné par des populations microbiennes naturelles.

Tableau 7 : Variation de la CI_{50} -15°C (mg/l) du 3-5 Dichlorophénol en fonction de la durée de l'essai.

Tableau 8 : Variation de la CI_{50}-15°C (mg/l) de $CuSO_4$ en fonction de la durée de l'essai.

Tableau 9 : Influence de la température sur la CI_{50}-30 min. (mg/l) de $CuSO_4$.

Tableau 10 : CI_{50} (en mg/l) du 3-5 dichlorophénol évaluée avec le test Microtox (t = 5 min., 0 = 15°C).

Tableau 11 : CI_{50} (en mg/l) de $CuSO_4$ évaluée avec le test Microtox (t = 30 min., 0 = 15°C).

Tableau 12 : CI_{50} (en mg/l) de quelques substances chimiques évaluée au moyen du test Microtox.

Tableau 13 : Composition chimique de l'effluent synthétique.

Tableau 14 : Composition chimique du milieu synthétique et des milieux de remplacement utilisés dans le test Consommation d'oxygène des boues activées.

Tableau 15 : Mesure du cuivre libre dans divers milieux réactionnels.

Tableau 16 : Activité respiratoire des boues activées avec différents milieux.

Tableau 17 : CI_{50} (mg/l) du 3-5 dichlorophénol évaluée au moyen du test Consommation d'oxygène des boues activées.

Tableau 18 : CI_{50} (mg/l) de $CuSO_4$ évaluée au moyen du test Consommation d'oxygène des boues activées.

Tableau 19 : CI_{50} (en mg/l) de quelques substances chimiques évaluée au moyen du test Consommation d'oxygène de boues activées.

Tableau 20 : Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur le taux de minéralisation du glucose et sur le nombre de germes viables.

Tableau 21 : Influence du délai d'utilisation du réactif bactérien sur l'Inhibition par le 3-5 dichlorophénol du taux de glucose minéralisé.

Tableau 22 : Répartition de la radioactivité au niveau des différents compartiments (CO_2, bactéries et filtrats).

Tableau 23 : CI_{50} (mg/l) du 3-5 dichlorophénol évaluée au moyen du test Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Tableau 24 : CI_{50} (mg/l) de CuSO évaluée au moyen du test Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Tableau 25 : CI_{50} (mg/l) de quelques substances chimiques évaluée au moyen du test Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Tableau 26 : Toxicité de quelques substances chimiques évaluée au moyen des tests Microtox, Consommation d'oxygène de boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Tableau 27 : Toxicité du cuivre, zinc, cadmium et 3-5 dichlorophénol évaluée au moyen de différents tests bactériens.

Tableau 28 : Toxicité de quelques substances chimiques évaluée avec les tests Daphnies, Poissons et Algues (Références IRCHA) et comparaison avec les résultats du test Microtox.

Tableau 29 : Etude comparative de la répétabilité des bioessais Microtox, Consommation d'oxygène de boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Tableau 30 : Toxicité de quelques substances chimiques (CI_{50} en mg/l) déterminée au moyen du test Microtox (Données bibliographiques).

Tableau 31 : Toxicité de quelques substances chimiques (CI_{50} en mg/l) déterminée au moyen du test Consommation d"oxygène de boues activées (Données bibliographiques).

Tableau 32 : Estimation de la durée des essais Microtox, Consommation d'oxygène de boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Tableau 33 : Estimation du prix de revient des essais Microtox, Consommation d'oxygène de boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.

Tableau 34 : Caractéristiques et performances des bioessais Microtox, Consommation d'oxygène de boues activées et Minéralisation du glucose chez Escherichia coli.