CSL-3531
SC041601 H37e
2e EX.

Évaluation de la spectrophotométrie comme technique d'estimation de la densité cellulaire lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*

CSL
25-4-95

Manon Harwood
Écotoxicologie et chimie environnementale
Centre Saint-Laurent

Conservation de l'environnement
Environnement Canada
Région du Québec

Janvier 1995

COMMENTAIRES DES LECTEURS

Veuillez adresser vos commentaires sur le contenu du présent rapport au Centre Saint-Laurent, Direction de la conservation, Environnement Canada, région du Québec, 105, rue McGill, 4e étage, Montréal (Québec), H2Y 2E7.

On devra citer la publication comme suit :
Harwood, M. 1994. *Évaluation de la spectrophotométrie comme technique d'estimation de la densité cellulaire lors des essais de toxicité avec* Selenastrum capricornutum. Environnement Canada - région du Québec, Conservation de l'environnement, Centre Saint-Laurent, Rapport scientifique et technique ST-9, 57 pages.

Perspective de gestion

Le présent document est publié dans le cadre du programme fédéral-provincial Saint-Laurent vision 2000. À l'intérieur du volet aide à la prise de décision de ce programme, des bioessais écotoxicologiques sont développés afin de fournir aux gestionnaires de programme des outils de décision en matière environnementale. Ce rapport est produit à la suite de travaux d'évaluation d'une technique bioanalytique visant à optimiser l'essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Selenastrum capricornutum*, et à le rendre plus efficace et économique.

Management Perspective

This report is produced as part of the federal-provincial St. Lawrence Vision 2000 action plan. Under the decision-support component of this program, ecotoxicological bioassays are being developed to provide program managers with environment-related decision-support tools. This report is the result of an assessment of a bioanalytic technique aimed at optimizing, and making cost effective, a growth inhibition test for the freshwater algae *Selenastrum capricornutum*.

Résumé

Le présent rapport regroupe les travaux effectués pour évaluer l'utilisation de la spectrophotométrie comme outil d'estimation de la densité cellulaire lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum* en remplacement du compteur de particules. Des travaux préliminaires nous ont permis de sélectionner certaines conditions permettant d'optimiser l'utilisation de la spectrophotométrie lors des essais. L'évaluation de la technique photométrique a été réalisée avec de l'eau purifiée, deux substances pures et cinq échantillons complexes. Tous les essais ont été effectués simultanément avec des volumes totaux de solution de 220 et 275 µL par puits dans des microplaques à fond rond. Pour chaque essai, la densité cellulaire a été évaluée par spectrophotométrie à 430 et 450 nm sur, *a*) des microplaques à fond rond, *b*) des microplaques à fond plat après transfert du contenu de la microplaque à fond rond, et par dénombrement cellulaire à l'aide d'un compteur de particules.

La technique photométrique s'est avérée efficace pour deux des échantillons testés, soit le sulfate de zinc et un des effluents industriels. Par contre, l'étude des résultats générés pour les autres échantillons a permis de faire ressortir certaines différences entre les méthodes d'évaluation de la densité cellulaire. Entre autres, les CI_{50} déterminées par photométrie sont généralement plus élevées que celles estimées par compteur de particules. La variation entre les répétitions d'un même essai est régulièrement supérieure à 20 p. 100, et va en augmentant avec la baisse de la concentration cellulaire. De plus, les pourcentages d'inhibition déterminés par les deux méthodes d'évaluation de la densité cellulaire diffèrent significativement dans la majorité des cas. Nous avons observé que la technique photométrique avait tendance à surestimer la concentration des algues et que les résultats pour un même échantillon sont moins reproductibles dans le temps.

À la lumière des résultats obtenus et dans les conditions actuelles, nous ne favorisons pas l'utilisation du spectrophotomètre pour l'évaluation de la densité cellulaire lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*. En effet, cette approche ne s'est pas révélée aussi précise, sensible et reproductible que le dénombrement par comptage électronique.

Abstract

This report is an assessment of the spectrophotometer as a tool for estimating cell density during toxicity assays on *Selenastrum capricornutum*, as a replacement tool for the particle counter. Certain optimal conditions were established for use of spectrophotometry for these tests. Photometers were assessed using purified water, two pure substances and five complex samples, and all tests were performed simultaneously in microplates with total solution volumes of 220 and 275 µL per u-shaped well. For each assay, cell density was assessed by spectrometer at 430 and 450 nm in u-shaped well microplates, in flat-bottomed microplates after transfer from u wells, and by cell count using a particle counter.

The photometric technique proved effective for two test samples: zinc sulphate and industrial effluents. However, results of the other samples highlighted certain differences between cell density assessment methods. For example, inhibitory concentrations (IC_{50}) determined by photometric technique are generally higher than if estimated by particle counter. Variations between test repetitions are typically higher than 20%, and increase as cell concentrations decline. In addition, inhibition percentages determined by both cell density assessment methods differ significantly in most cases. We have seen that the photometric technique had a tendency to underestimate algael concentrations and that results for a given sample are less reproducible over time.

In light of the results obtained and under real conditions, we would not encourage use of the spectrophotometer to assess cell density during toxicity testing of *Selenastrum capricornutum*. In fact, this approach has not proven to be as precise, as sensitive or as reproducible as an electronic counter.

Table des matières

RÉSUMÉ		v
ABSTRACT		vi
LISTE DES FIGURES		ix
LISTE DES TABLEAUX		xi
1	**INTRODUCTION**	1
2	**MÉTHODES**	3
2.1	Instrumentation	3
2.2	Culture de *Selenastrum capricornutum*	3
2.3	Mesure du spectre d'absorption	3
2.4	Vérification de la variabilité et de l'intensité des lesctures photométriques à différentes longueurs d'onde	4
2.5	Optimisation des conditions expérimentales afin de favoriser l'utilisation de la spectrophotométrie	5
2.6	Validation de la spectrophotométrie pour évaluer la densité des suspensions algales	7
2.6.1	Essai de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*	9
2.6.2	Choix des échantillons	10
2.6.3	Évaluation de la concentration cellulaire après la période d'incubation	11
2.6.4	Traitement des résultats	11
2.7	Contrôle de la qualité	13
3	**RÉSULTATS ET DISCUSSION**	16
3.1	Spectre d'absorption d'une suspension de *Selenastrum capricornutum*	16
3.2	Vérification de la variabilité et de l'intensité des lectures photométriques à différentes longueurs d'onde	16
3.2.1	Essais témoins	16
3.2.2	Essais simulant une dose-réponse	21
3.3	Optimisation des conditions d'essais afin de favoriser l'utilisation de la spectrophotométrie	25
3.3.1	Suivi de la croissance des algues	25
3.3.2	Suivi des conditions de pH	25

3.3.3 Essai de toxicité avec un toxique de référence 27

3.4 Validation de la spectrophotométrie pour évaluer la densité des suspensions algales 30

3.4.1 Essais sur les toxiques de référence 30

3.4.2 Essais avec des effluents industriels 40

3.5 Contrôle de la qualité 48

3.5.1 Homogénéité des absorbances 48

3.5.2 Seuil d'effet 49

4 CONCLUSION 51

RÉFÉRENCES 54

ANNEXES

1 Résultats du spectre d'absorption d'une suspension de *Selenastrum capricornutum* 55

2 Comparaison statistique des pourcentages d'inhibition obtenus lors des essais de toxicité avec le nettoyant en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration cellulaire 56

3 Comparaison statistique des pourcentages d'inhibition obtenus lors des essais de toxicité avec l'effluent industriel du secteur de la métallurgie en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration cellulaire 57

Liste des figures

1	Approche utilisée pour évaluer la technique photométrique	8
2	Configuration de la microplaque pour les essais de toxicité	9
3	Essais et mesures effectués afin de vérifier l'homogénéité des absorbances	14
4	Spectre d'absorption d'une suspension d'algues de 1,2 X 10^6 cellules/mL	17
5	Droites de régression obtenues lors des essais simulant une dose-réponse analysée (A) par compteur de particules et (B) par spectrophotométrie (longueur d'onde 430 nm)	23
6	Courbes de croissance obtenues en fonction du volume total par puits d'incubation pour les essais effectués dans des microplaques à puits à fond rond	26
7	Courbes de croissance obtenues en fonction du type de microplaque utilisé pour l'incubation	26
8	Droites de régression obtenues lors des essais de toxicité avec le chlorure de sodium (NaCl)	29
9	Diagramme de contrôle pour le chlorure de sodium (NaCl)	29
10	Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais standard avec le chlorure de sodium	33
11	Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais modifiés (275 µL/puits) avec *Selenastrum capricornutum* en présence de chlorure de sodium	36
12	Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais avec *Selenastrum capricornutum* en présence de sulfate de zinc	38
13	Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais avec le nettoyant	43
14	Résultats obtenus lors des essais de toxicité avec l'effluent industriel de chimie organique	47

15 Résultats des seuils d'effet déterminés pour chacune des méthodes utilisée pour l'évaluation de la densité cellulaire lors des essais avec *Selenastrum capricornutum* 50

Liste des tableaux

1	Préparation des microplaques simulant les essais doses-réponses	4
2	Approche expérimentale visant à mettre en évidence la variabilité et l'intensité des lectures photométriques lors de l'évaluation de la densité cellulaire	6
3	Conditions expérimentales testées et analyses effectuées	7
4	Concentrations testées pour les essais avec le chlorure de sodium et le sulfate de zinc en fonction des colonnes de la microplaque	10
5	Échantillons complexes analysés lors de la validation de la technique photométrique	11
6	Résultats des analyses de photométrie pour les essais témoins	18
7	Analyses des répétitions du témoin normalisé lors des essais	19
8	Moyennes des pourcentages d'inhibition et limites supérieures pour chacune des méthodes de mesure	20
9	Résultats des paramètres de mesure calculés (CI_{20}, CI_{50} et CMEO) pour les essais simulant une dose-réponse	22
10	Valeurs de *t* calculées lors des analyses statistiques effectuées sur les pourcentages d'inhibition obtenus pour chacune des conditions expérimentales lors des essais simulant une dose-réponse	24
11	Moyennes des pH obtenues pour chacune des conditions expérimentales en fonction du temps d'incubation	27
12	Résultats des paramètres de mesure obtenus pour chacune des conditions expérimentales lors des essais avec le chlorure de sodium	28
13	Comparaison des pourcentages d'inhibition obtenus lors des essais de toxicité avec le chlorure de sodium (dl = 52)	30
14	Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais standard avec le chlorure de sodium	31

15	Comparaison statistique des CI_{50} obtenues lors des essais standard avec le NaCl en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)	32
16	Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais modifiés (275 µL/puits) avec le chlorure de sodium	35
17	Comparaison des CI_{50} obtenues lors des essais modifiés avec le NaCl en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)	35
18	Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais avec le sulfate de zinc	37
19	Comparaison des CI_{50} obtenues lors des essais avec le sulfate de zinc en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)	39
20	Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais avec le nettoyant	41
21	Comparaison des CI_{50} obtenues lors des essais avec le nettoyant en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)	42
22	Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais avec l'effluent du secteur métallurgique	44
23	Compilation des CMEO obtenues lors des essais avec un effluent industriel du secteur de la métallurgie	45

1 Introduction

Le test de toxicité avec l'algue verte *Selenastrum capricornutum* est utilisé depuis de nombreuses années pour l'évaluation de la toxicité de substances pures solubles et de matrices complexes tels les effluents industriels, les lixiviats et les eaux usées. Le but de l'essai est de déterminer l'effet toxique des échantillons sur la croissance des algues. Des cultures de *Selenastrum capricornutum* en phase exponentielle de croissance sont exposées, sur plusieurs générations, à différentes concentrations d'une substance à tester, sous des conditions d'éclairage et de température spécifiques. L'inhibition de la croissance en relation avec un témoin normalisé est déterminée pour une période d'exposition fixe.

Ce test est réalisé dans une microplaque de 96 puits à l'intérieur de laquelle sont testées dix concentrations d'échantillon en plusieurs répétitions et où l'on retrouve dix puits témoins normalisés. Cet essai présente de nombreux avantages. Entre autres, les analyses nécessitent de petits volumes d'échantillon, permettent d'effectuer plusieurs répétitions et requièrent peu d'espace pour l'incubation. De plus, plusieurs échantillons peuvent facilement être préparés dans une même série d'essais (Blaise et *al.*, 1986). Par contre, l'évaluation de la concentration cellulaire suite à la période d'incubation est l'étape la plus limitante de l'essai. En effet, cette évaluation est présentement réalisée à l'aide d'un compteur de particules. Bien que cette technique ait fait ses preuves, le temps requis pour effectuer le comptage électronique d'une seule microplaque, incluant le temps de préparation, est d'environ 45 minutes. Le nombre d'échantillons pouvant être testé simultanément est donc limité.

L'évaluation de la concentration cellulaire par spectrophotométrie en microplaque, proposée dans le protocole d'Environnement Canada, *Méthode d'essai biologique : essai d'inhibition de la croissance de l'algue verte* Selenastrum capricornutum (rapport SPE 1/RM/25, novembre 1992) semblait une alternative intéressante au compteur de particules. La spectrophotométrie est une technique très rapide. Le temps de lecture par microplaque est approximativement de deux minutes et la saisie des données générées par le photomètre est complètement automatisée. Cette technique permet en outre un plus grand nombre de répétitions par concentration testée sans pour autant augmenter l'effort analytique, et la validation statistique

des résultats de l'essai est du même coup améliorée. Un transfert de la technique par dénombrement électronique à la technique photométrique nous semblait donc très avantageux et permettrait d'accélérer l'exécution de l'essai. Les résultats de certains travaux effectués par des stagiaires dans le cadre de projets de recherche portant sur la spectrophotométrie nous avaient d'autre part amenés à considérer très sérieusement cette alternative pour l'évaluation de la densité cellulaire.

L'objectif de ce projet était donc d'évaluer la spectrophotométrie comme technique d'estimation de la densité cellulaire lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*. La performance de la technique spectrophotométrique est évaluée par rapport aux résultats générés par dénombrement électronique.

Dans cette optique, nous présentons une démarche expérimentale divisée en deux étapes distinctes. La première (étape préliminaire) consistait à déterminer la ou les longueurs d'onde optimales pour l'évaluation de la concentration cellulaire, à vérifier la variabilité et l'intensité des lectures photométriques aux longueurs d'onde sélectionnées et à optimiser les conditions d'essais de façon à favoriser l'utilisation de la spectrophotométrie. Pour l'évaluation de la technique proprement dite, deuxième étape, nous avons procédé à des essais de toxicité avec des substances pures et des échantillons complexes. Nous avons effectué des analyses afin de vérifier certains critères de contrôle de la qualité, soit l'homogénéité des absorbances et le seuil d'effet.

2 Méthodes

2.1 INSTRUMENTATION

Les cultures d'algues et les microplaques pour les essais de toxicité ont été incubées dans des incubateurs Psychroterm New Brunswick™ (modèle G-27). Les dénombrements cellulaires électroniques ont été effectués à l'aide d'un compteur de particules Coulter Counter™ (modèle ZM). Le spectrophotomètre Beckman™ (modèle Du 70) avec des cuvettes de quartz a été utilisé pour déterminer le spectre d'absorption. Toutes les lectures photométriques ont été faites avec le lecteur à microplaque Titertek™ Multiskan MCC/340 (modèle MK II).

2.2 CULTURE DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

La souche mère des cultures de *Selenastrum capricornutum* utilisée pour ces travaux UTEX 1648, provient du *Department of Botany, University of Texas, Culture Collection of algae.*

Les cultures ont été maintenues et renouvelées sur une base continue au laboratoire selon les spécifications du protocole d'Environnement Canada (Rapport SPE 1/RM/25, novembre 1992) tout en appliquant l'ensemble des procédures de contrôle de la qualité applicables aux cultures de *Selenastrum capricornutum.*

2.3 MESURE DU SPECTRE D'ABSORPTION

Afin d'établir le spectre d'absorption, un inoculum d'algues ayant une densité cellulaire de 1,2 x 10^6 cellules/mL a été préparé. La concentration cellulaire a été déterminée à l'aide du compteur de particules et représente la concentration attendue dans les témoins normalisés pour les essais dont la période d'incubation est de 96 heures avec une concentration d'algues initiale de 20 000 cellules/mL/puits. La suspension a été préparée en diluant une culture d'algues avec une solution tampon de $NaHCO_3$ (15 mg/L).

La mesure du spectre a porté sur les longueurs d'onde comprises entre 350 et 740 nm inclusivement avec un incrément de 10 nm entre chaque lecture. Les absorbances ont été mesurées en trois répétitions pour toutes les longueurs d'onde.

2.4 VÉRIFICATION DE LA VARIABILITÉ ET DE L'INTENSITÉ DES LECTURES PHOTOMÉTRIQUES À DIFFÉRENTES LONGUEURS D'ONDE

La variabilité et l'intensité des lectures photométriques ont été vérifiées en simulant deux types d'essais, soit *a*) des essais témoins et *b*) des essais simulant une dose-réponse. Les essais témoins visaient à vérifier la variabilité intrinsèque de la méthode de mesure. Pour ces essais, tous les puits des colonnes 2 à 12 contenaient 220 µL d'une même suspension d'algues avec un nombre approximativement égal de cellules. Les puits de la colonne 1, réservés pour le blanc, contenaient 220 µL d'une solution tampon de $NaHCO_3$ (15 mg/L).

Les essais simulant une dose-réponse avaient pour but de vérifier l'intensité et la sensibilité de la méthode de mesure. Les microplaques servant aux essais de simulation contenaient, de la colonne 2 à la colonne 11, des dilutions arithmétiques d'une suspension d'algues (tableau 1), la colonne 1 étant réservée pour le blanc.

Tableau 1
Préparation des microplaques simulant les essais doses-réponses

Colonne	Susp. algale (µL)	Solution tampon (µL)	% théorique de la susp. algale
1	0	220	blanc
2	220	0	100,0
3	200	20	90,9
4	180	40	81,8
5	160	60	72,7
6	140	80	63,6
7	120	100	54,5
8	100	120	45,5
9	80	140	36,4
10	60	160	27,3
11	40	180	18,2

La *densité cellulaire de la culture* utilisée pour ces travaux était de 1,2 x 10^6 cellules/mL. La suspension d'algues a été préparée en utilisant une solution tampon de $NaHCO_3$.

La *densité cellulaire de tous les puits* a été évaluée par dénombrement cellulaire et spectrophotométrie. En ce qui concerne la photométrie, l'absorbance a été mesurée aux trois longueurs d'onde sélectionnées suite à l'établissement du spectre d'absorption, soit 430, 450 et 690 nm.

Présentement, les essais d'inhibition de croissance avec *Selenastrum capricornutum* sont effectués dans des microplaques à fond rond. Comme nous soupçonnions que ce type de microplaque pourrait provoquer une certaine diffraction de la lumière lors des analyses par spectrophotométrie, tous les essais ont été effectués parallèlement dans des microplaques à fond rond et à fond plat. De plus, après lecture de la densité optique des microplaques à fond rond, le contenu de ces dernières a été transféré dans des microplaques à fond plat et de nouvelles lectures de densité ont été prises. Cette approche a permis d'évaluer par la même occasion la variabilité associée au transfert du contenu d'une microplaque à fond rond dans une microplaque à fond plat. Le tableau 2 résume les différentes étapes de ces travaux préliminaires ainsi que les variables mesurées pour chacun des essais.

2.5 OPTIMISATION DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES AFIN DE FAVORISER L'UTILISATION DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE

Les deux principaux facteurs pouvant influencer les lectures de densité optique pour les essais effectués dans des microplaques sont *a*) la forme des puits et *b*) le volume de solution par puits. Le fabricant du lecteur de microplaque que nous utilisons, Flow Laboratories (1988), recommande de travailler avec des microplaques dont les puits sont à fond plat. Ces microplaques offrent des propriétés optiques supérieures et minimisent la diffraction de la lumière. De plus, il est suggéré de travailler avec un volume total de 300 µL par puits. Ce volume équivaut à une hauteur de lecture par puits de un centimètre, optimisant ainsi les lectures de densité optique (Ashour *et al.*, 1987). Des microplaques avec puits à fond rond et d'un volume total de 220 µL sont présentement utilisées lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*. Nous avons donc modifié les conditions expérimentales pour se rapprocher des conditions optimales pour la spectrophotométrie. Une analyse de la croissance algale ainsi qu'un suivi des conditions

de pH durant la période d'incubation de quatre jours ont été effectués afin de valider les nouvelles conditions expérimentales. Des essais avec un toxique de référence, soit le chlorure de sodium, ont également été réalisés pour chacune des conditions.

Tableau 2
Approche expérimentale visant à mettre en évidence la variabilité et l'intensité des lectures photométriques lors de l'évaluation de la densité cellulaire

	Microplaque à fond rond	Microplaque à fond rond + transfert	Microplaque à fond plat
Type d'essai	Variable mesurée		
Témoins			
	Abs.* (430 nm) Abs. (450 nm) Abs. (690 nm)	Abs. (430 nm) Abs. (450 nm) Abs. (690 nm) Dénombrement cellulaire	Abs. (430 nm) Abs. (450 nm) Abs. (690 nm) Dénombrement cellulaire
Simulation d'une dose-réponse			
	Abs. (430 nm) Abs. (450 nm) Abs. (690 nm)	Abs. (430 nm) Abs. (450 nm) Abs. (690 nm) Dénombrement cellulaire	Abs. (430 nm) Abs. (450 nm) Abs. (690 nm) Dénombrement cellulaire

* Abs. : absorbance.

Trois conditions expérimentales ont été analysées (tableau 3). Pour la troisième, nous avons limité le volume total par puits à 275 µL bien que le volume suggéré soit de 300 µL. Les puits des microplaques à fond rond utilisées lors des essais ont une capacité maximale de 300 µL mais la remise en suspension du culot d'algues et l'homogénéisation du contenu des puits requièrent un espace minimal de manipulation, d'où la contrainte de limiter le volume à 275 µL par puits.

Tableau 3
Conditions expérimentales testées et analyses effectuées

Condition n°	Type de microplaque	Volume total/puits (µL)	Analyse
1	Fond rond	220	
2	Fond plat	220	suivi de croissance suivi de pH toxique de référence
3	Fond rond	275	

Pour chacune des conditions expérimentales, le suivi de croissance a été effectué sur une période consécutive de huit jours à l'aide de trois microplaques. Six puits par microplaque ont été dénombrés quotidiennement à l'aide du compteur de particules.

Le suivi des conditions de pH a été réalisé sur une période de 96 heures. Les mesures de pH ont été prises en triplicata au temps zéro puis toutes les 24 heures à l'aide d'un pH-mètre de marque Fisher Accumet™ (modèle 805 MP). Les essais ont été préparés selon les procédures opératoires normalisées (PON) suivantes : *Suivi des conditions de pH en microplaque* (AQ-ALP-931209-1) et *Suivi de la croissance en microplaque* (AQ-ALS-931209-1).

Les essais avec le chlorure de sodium ont été exécutés selon les conditions d'incubation précisées dans le protocole d'Environnement Canada (1992). Par contre, la concentration cellulaire initiale par puits était de 20 000 cellules/mL.

2.6 VALIDATION DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR ÉVALUER LA DENSITÉ DES SUSPENSIONS ALGALES

Suite aux travaux préliminaires, deux types d'essais ont été réalisés avec différents échantillons afin d'évaluer la technique photométrique : des essais standard pour lesquels le volume total par puits était de 220 µL, et des essais modifiés pour lesquels le volume par puits a été porté à 275 µL. Pour toutes les analyses, la concentration cellulaire a été estimée à l'aide

d'un compteur de particules et d'un spectrophotomètre à deux longueurs d'onde : 430 et 450 nm. L'approche utilisée pour chaque échantillon est présentée à la figure 1.

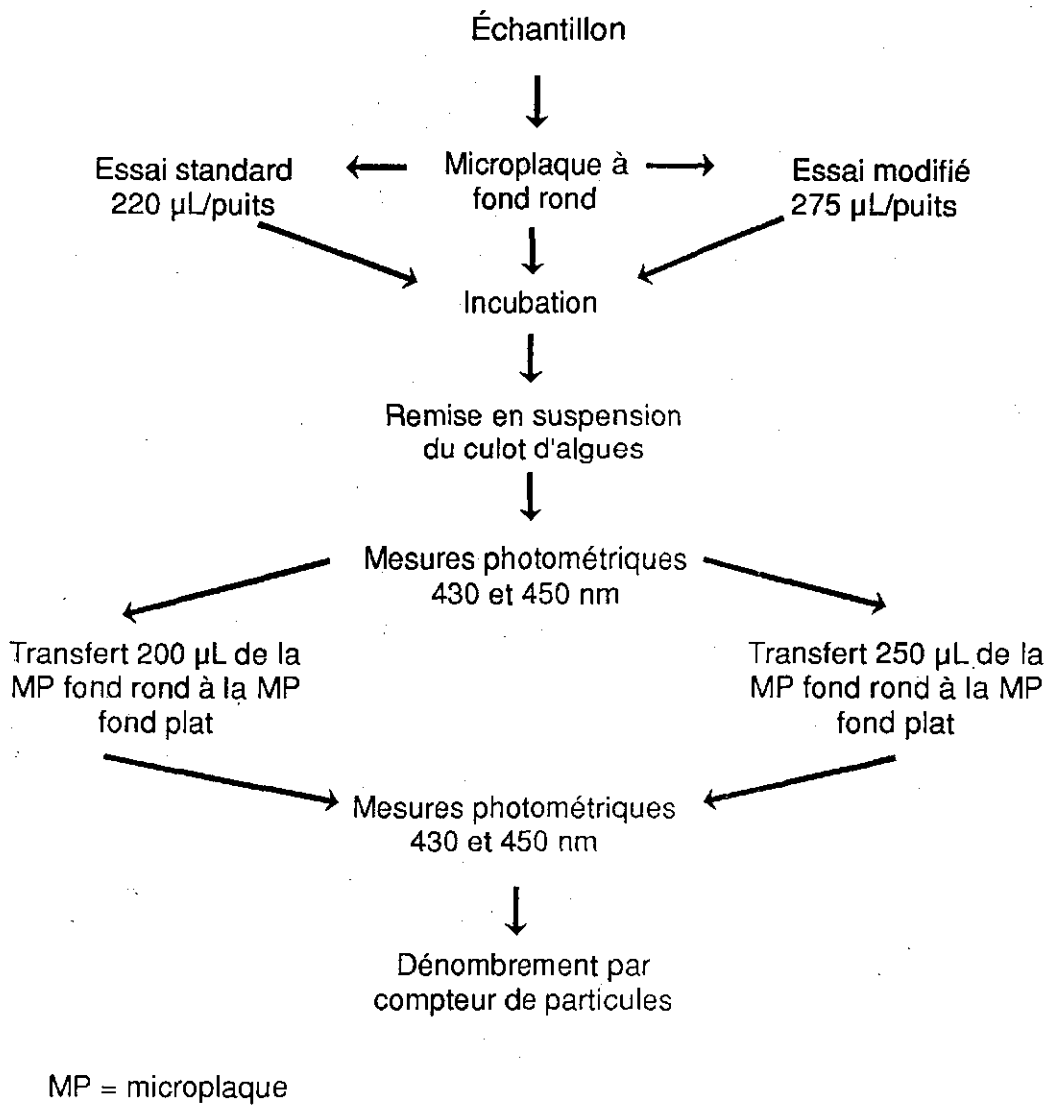


Figure 1 **Approche utilisée pour évaluer la technique photométrique**

2.6.1 Essai de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*

Les analyses avec *Selenastrum capricornutum* ont été réalisées conformément à la méthode d'essai biologique d'Environnement Canada *Essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce* Selenastrum capricornutum (rapport SPE 1/RM/25, novembre 1992). Par contre, la concentration algale initiale pour tous les essais était de 20 000 cellules/mL par puits avec un temps d'incubation de 96 heures. De plus, de légères modifications dans la configuration des échantillons dans la microplaque ont dû être apportées (figure 2) afin d'adapter l'essai à la technique photométrique.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A						eau purifiée						
B		B	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8	E_9	
C		B	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8	E_9	
D		B	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
E		B	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8	E_9	
F		B	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	E_7	E_8	E_9	
G		B	B_{E1}	B_{E2}	B_{E3}	B_{E4}	B_{E5}	B_{E6}	B_{E7}	B_{E8}	B_{E9}	
H						eau purifiée						

B Blanc pour les témoins.
T Témoin normalisé.
E_i Concentration d'échantillon testée.
B_{Ei} Blanc spécifique de chacune des concentrations testées.

Figure 2 Configuration de la microplaque pour les essais de toxicité

Pour les essais standard (volume total de 220 µL par puits), chacun des puits de la microplaque contenait 200 µL d'échantillon ou d'eau purifiée pour les témoins normalisés, 10 µL de milieu nutritif enrichi (AAP 13.75X) et 10 µL d'une suspension d'algues. Pour les essais modifiés, réalisés avec un volume total de 275 µL, chacun des puits était constitué de 250 µL

d'échantillon ou d'eau purifiée pour les témoins normalisés, 12,5 µL de milieu nutritif enrichi et 12,5 µL d'une suspension d'algues.

2.6.2 Choix des échantillons

Dans un premier temps, une série d'essais a été réalisée sur des substances pures, soit le chlorure de sodium et le sulfate de zinc, qui depuis un certain temps, sont utilisées dans nos laboratoires comme toxique de référence pour évaluer la qualité et la santé des cultures de *Selenastrum capricornutum*. Les concentrations testées pour chacun des produits sont énumérées au tableau 4.

Dans un deuxième temps, des essais ont été effectués sur une série d'échantillons complexes dont la liste apparaît au tableau 5. Les échantillons ont été filtrés à travers une membrane de polycarbonate de 0,45 µm et conservés à 4 °C jusqu'au moment des analyses.

Tableau 4
Concentrations testées pour les essais avec le chlorure de sodium et le sulfate de zinc en fonction des colonnes de la microplaque

Colonne	Chlorure de sodium (mg/L)	Sulfate de zinc (µg de Zn^{++}/L)
3	4000	100
4	3700	90
5	3400	80
6	3100	70
7	2800	60
8	2500	50
9	2200	40
10	1900	30
11	1600	20

Tableau 5
Échantillons complexes analysés lors de la validation de la technique photométrique

Échantillon n°	Industrie
1	Métallurgie
2	Pâtes et papiers
3	Chimie organique
4	Chimie inorganique
5	Minière
6	Nettoyant

2.6.3 Évaluation de la concentration cellulaire après la période d'incubation

Les concentrations cellulaires ont été mesurées par dénombrement avec un compteur de particules et par spectrophotométrie à 430 et 450 nm. Les mesures ont été effectuées dans l'ordre suivant : premièrement, par photométrie sur les microplaques utilisées lors de l'essai, c'est-à-dire les microplaques avec puits à fond rond. Deuxièmement, le contenu des microplaques à fond rond a été transféré dans des microplaques à fond plat à l'aide d'une pipette à canaux multiples et les absorbances ont été mesurées à nouveau. Troisièmement, nous avons mesuré la densité des suspensions d'algues à l'aide du compteur de particules (figure 1).

2.6.4 Traitement des résultats

Pour tous les essais et pour chaque méthode d'évaluation de la densité cellulaire, nous avons évalué les pourcentages d'inhibition associés à chaque répétition pour toutes les concentrations testées. Afin de démontrer que les pourcentages d'inhibition obtenus avec les diverses méthodes d'estimation de la densité cellulaire ne sont pas significativement différents, des tests de *t* de Student pour échantillons indépendants et appariés (Snedecor et Cochran, 1984) ont été effectués. L'hypothèse nulle (H_0) des deux analyses vérifie l'égalité des pourcentages d'inhibition en posant pour les échantillons indépendants :

$$t = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)/s_{\bar{X}1} - s_{\bar{X}2}) \qquad dl = n - 1$$

et pour les échantillons appariés :

$$t = \frac{\bar{D}}{s_{\bar{D}}} \qquad dl = n - 1$$

où $\bar{X}$ moyenne des pourcentages d'inhibition de chacune des méthodes d'estimation de la densité des algues;

$s_{\bar{X}}$ écarts types associés aux moyennes;

dl degré de liberté;

$\bar{D}$ moyenne des différences entre les pourcentages d'inhibition des différentes méthodes d'estimation de la densité cellulaire;

$s_{\bar{D}}$ écart type des différences.

Si le t calculé est inférieur au $t_{0,05}$ de la table de Student, l'hypothèse H_0 est acceptée, ce qui signifie que les résultats générés par les diverses méthodes de mesure ne sont pas significativement différents au seuil de 5 p. 100 (Snedecor et Cochran, 1984).

Pour chacun des essais, les paramètres de mesure suivants ont été déterminés : CI_{20} et CI_{50} (concentration inhibant respectivement 20 et 50 p. 100 de la croissance cellulaire par rapport au témoin normalisé) avec les intervalles de confiance; CMEO (concentration minimale avec effet observé) et CSEO (concentration sans effet observé). Les CI sont estimées à partir de la relation entre les concentrations testées (X) et les pourcentages d'inhibition obtenus (Y). Une droite de régression simple peut alors être tracée. À partir de l'équation de la droite, une prédiction inverse est effectuée afin d'établir les valeurs des CI et les intervalles de confiance à 95 p. 100. La CMEO est déterminée à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. La CSEO correspond à la première concentration testée inférieure à la CMEO. En dernier lieu, lorsque nécessaire, des tests d'égalité des coefficients de régression (b) ont été effectués. Le test vérifie les hypothèses $H_0 : b_1 = b_2$; $H_1 : b_1 \neq b_2$, selon un test de t de Student en posant :

$$t = (b_1 - b_2)/s_b \qquad dl = n - 2$$

où b_1 et b_2 pentes respectives des droites de régression des deux échantillons;

s_b somme des écarts type des deux coefficients de régression.

Si le t calculé est inférieur au $t_{0,05}$ de la table de Student, l'hypothèse H_0 est acceptée, ce qui implique que les pentes obtenues ne sont pas significativement différentes l'une de l'autre.

2.7 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Nous avons fait quelques analyses afin de vérifier certains critères de contrôle de la qualité, soit l'homogénéité des lectures optiques mesurées en microplaque et le seuil d'effet.

Les essais avec *Selenastrum capricornutum* sont réalisés en microplaque selon une disposition bien définie. Il est important de vérifier que les absorbances de base (blanc) sont homogènes pour les différentes colonnes et rangées de la microplaque. En effet, si les absorbances de base ne sont pas homogènes, comment pourrions-nous, le cas échéant, associer les différences observées à l'effet toxique des échantillons. Nous avons donc cherché à vérifier s'il existait ou non une différence statistique significative des lectures d'absorbance entre les colonnes et les rangées d'une même microplaque.

Pour vérifier l'homogénéité des absorbances, nous avons pris en considération tous les facteurs pouvant affecter les mesures, soit le type de microplaque, le volume total par puits ainsi que l'ordre de distribution des échantillons dans la microplaque, à savoir une distribution de la solution d'essai dans le sens des rangées ou dans le sens des colonnes. La figure 3 résume les analyses et mesures effectuées dont voici une brève description.

Tous les essais ont été effectués en distribuant de l'eau purifiée dans des microplaques à fond rond et à fond plat. Des volumes totaux de 220 µL et 275 µL par puits ont été utilisés pour ces travaux. Pour la première série d'analyses, la distribution de l'eau purifiée dans les microplaques a été réalisée dans le sens des rangées, tandis que pour la deuxième série, l'eau a été introduite dans le sens des colonnes. Les lectures d'absorbance ont été prises à 430 et 450 nm pour toutes les microplaques. Des analyses de comparaison multiple avec le test de Tukey (Snedecor et Cochran, 1984) ont ensuite été effectuées sur les densités optiques mesurées pour

toutes les microplaques afin de comparer *a*) les colonnes d'une même microplaque entre elles et *b*) les rangées.

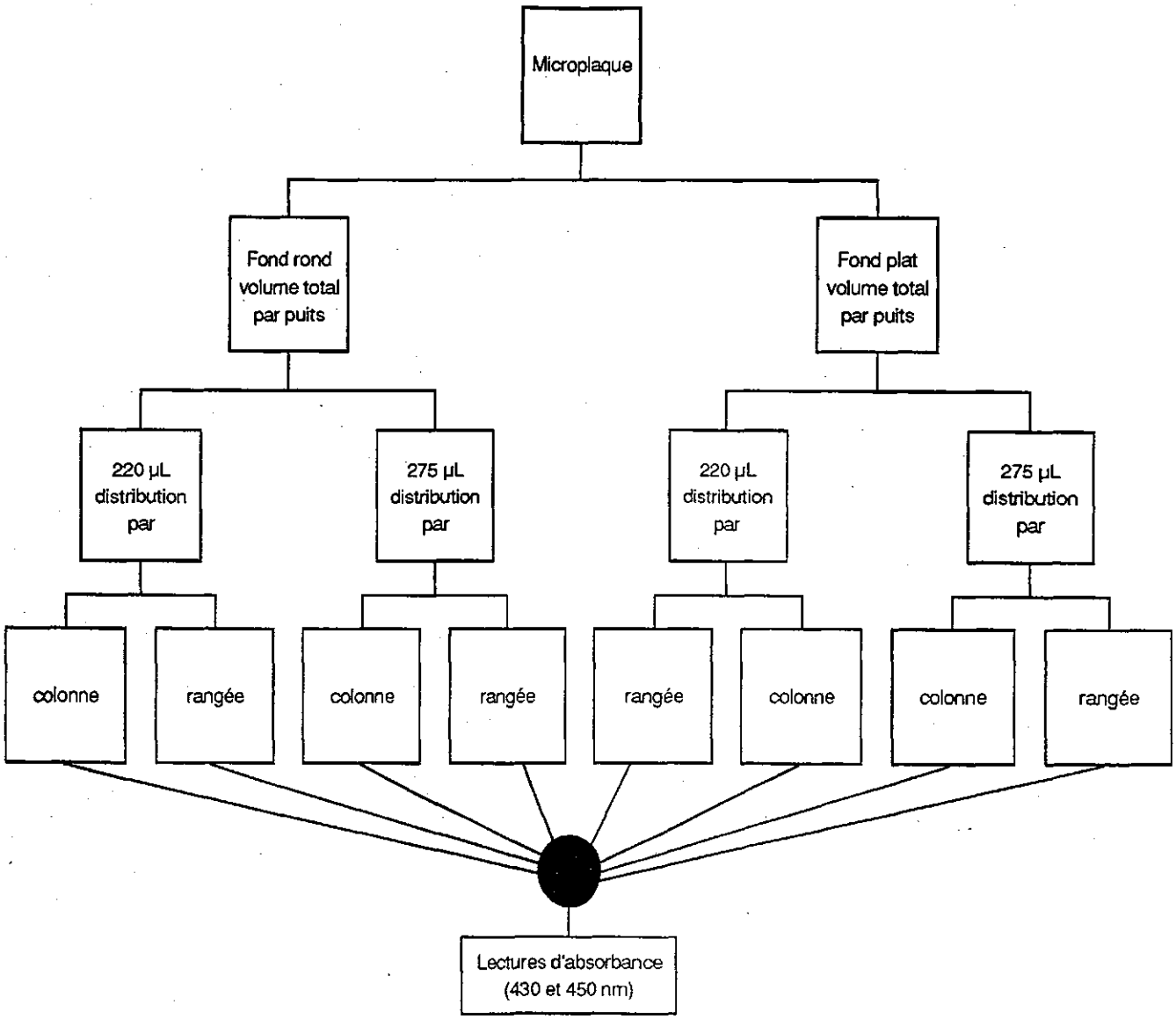


Figure 3 Essais et mesures effectués afin de vérifier l'homogénéité des absorbances

De plus, nous avons procédé à des essais témoins constitués d'eau purifiée, d'une suspension algale et de milieu de culture enrichi dans des microplaques à fond rond avec des

volumes totaux de 220 et 275 µL par puits. Après la période d'incubation de quatre jours, la concentration cellulaire a été évaluée conformément à la section 2.6.3. Ces tests visaient principalement à compléter l'analyse de l'homogénéité des absorbances mais également à établir le seuil d'effet pour chacune des méthodes de mesure. Le seuil d'effet est défini comme le pourcentage d'inhibition minimum pouvant être rapporté comme une valeur significativement différente du témoin.

3 Résultats et discussion

3.1 SPECTRE D'ABSORPTION D'UNE SUSPENSION DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

Afin d'établir la ou les longueurs d'onde optimales à utiliser pour l'évaluation de la concentration cellulaire lors des essais avec *Selenastrum capricornutum*, le spectre d'absorption d'une suspension d'algues a été déterminé.

Les moyennes des absorbances obtenues pour les différentes longueurs d'onde sont présentées à l'annexe 1 et la figure 4 illustre le spectre d'absorption. L'analyse du spectre d'absorption démontre un pic d'absorbance très net à 690 nm et une zone d'absorbance maximale entre 430 et 450 nm. Bien que le pic d'absorbance soit mieux défini à 690 nm, les valeurs de densité optique plus faibles à cette longueur d'onde suggèrent un pouvoir discriminatoire plus faible comparativement aux absorbances mesurées entre 430 et 450 nm.

À la lumière de ces résultats, les essais ultérieurs ont porté spécifiquement sur trois longueurs d'onde, soit 430, 450 et 690 nm. Ces travaux servaient à mettre en évidence la sensibilité de chacune des longueurs d'onde ainsi que le degré de la variabilité intrinsèque des deux méthodes de mesure comparées.

3.2 VÉRIFICATION DE LA VARIABILITÉ ET DE L'INTENSITÉ DES LECTURES PHOTOMÉTRIQUES À DIFFÉRENTES LONGUEURS D'ONDE

3.2.1 Essais témoins

Le tableau 6 présente un résumé des résultats obtenus pour les essais témoins analysés à l'aide de la photométrie. La moyenne globale des densités optiques pour chacune des longueurs d'onde, l'écart type et le coefficient de variation y sont regroupés. L'analyse des puits représentant les témoins normalisés dans les essais (figure 2), soit les puits D2, D4, D5, D6, D8, et D10 est présentée au tableau 7. En dernier lieu, le tableau 8 rassemble la moyenne des pourcentages d'inhibition supérieurs à zéro pour chacun des essais, ainsi que la limite supérieure. Celle-ci est déterminée en additionnant la moyenne des pourcentages d'inhibition supérieurs à zéro et deux fois son écart type (s). La limite supérieure représente un indice ponctuel de l'effet seuil, soit la limite de détection pour chacune des méthodes d'évaluation de la densité cellulaire.

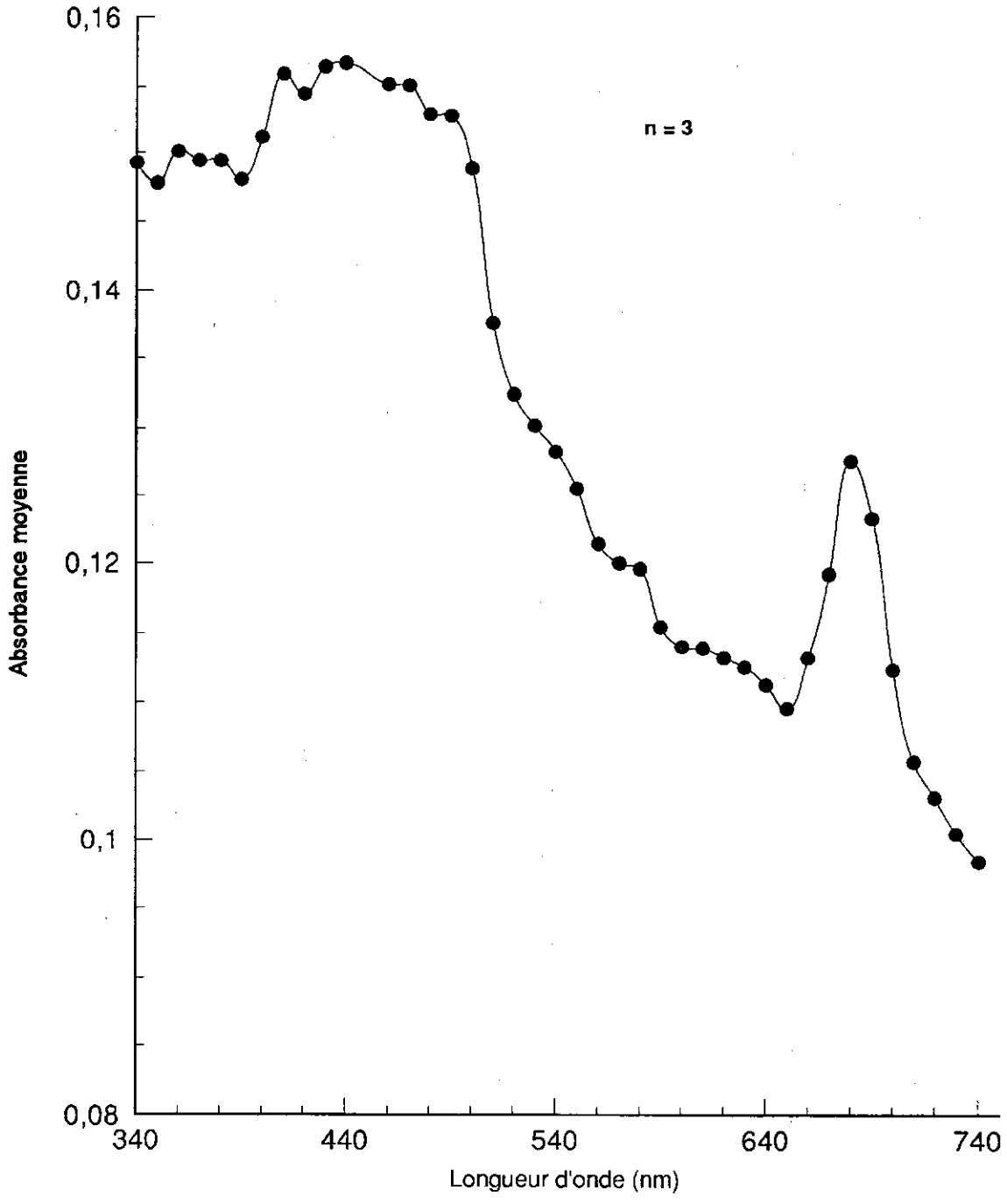


Figure 4 Spectre d'absorption d'une suspension d'algues de 1,2 X 10^6 cellules/mL

Tableau 6
Résultats des analyses de photométrie pour les essais témoins

Condition expérimentale n°	Type de microplaque	Moyenne globale (n = 40)	Écart type	Coefficient de variation (%)
Absorbance à 430 nm				
1	À fond rond	0,084	0,002	3,3
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	0,047	0,001	3,3
3	À fond plat	0,059	0,001	3,2
Absorbance à 450 nm				
1	À fond rond	0,077	0,002	3,8
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	0,043	0,001	4,3
3	À fond plat	0,052	0,001	3,8
Absorbance à 690 nm				
1	À fond rond	0,053	0,002	3,9
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	0,028	0,001	5,5
3	À fond plat	0,035	0,001	5,4

Tableau 7
Analyses des répétitions du témoin normalisé lors des essais

Condition expérimentale n°	Type de microplaque	Moyenne puits témoins (n = 12)	Écart type	Coefficient de variation (%)
Absorbance à 430 nm				
1	À fond rond	0,086	0,001	1,5
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	0,055	0,002	3,8
3	À fond plat	0,066	0,0008	1,2
Absorbance à 450 nm				
1	À fond rond	0,078	0,002	3,7
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	0,052	0,003	5,7
3	À fond plat	0,061	0,001	2,0
Absorbance à 690 nm				
1	À fond rond	0,054	0,002	3,6
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	0,038	0,002	5,1
3	À fond plat	0,044	0,002	4,2
Compteur de particules				
1	À fond rond	2774	99,14	3,6
3	À fond plat	3016	16,50	0,5

Tableau 8
Moyennes des pourcentages d'inhibition et limites supérieures pour chacune des méthodes de mesure

Condition expérimentale n°	Type de microplaque	Moyenne	n	Écart type	Limite supérieure (X ± 2 *s*)
Absorbance à 430 nm					
1	À fond rond	3,53	21	1,83	7,2
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	1,08	7	1,42	3,9
3	À fond plat	2,03	10	1,23	4,5
Absorbance à 450 nm					
1	À fond rond	3,26	21	1,96	7,2
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	3,51	6	1,72	6,9
3	À fond plat	1,33	22	1,49	4,3
Absorbance à 690 nm					
1	À fond rond	3,23	24	2,08	7,4
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	2,17	9	1,38	4,9
3	À fond plat	4,06	9	1,81	7,7
Compteur de particules					
1	À fond rond	2,49	18	3,35	9,1
2	À fond plat	1,26	12	0,91	3,8

Les résultats de densité optique pour les essais témoins (tableau 6 et 7) révèlent que dans l'ensemble les plus faibles valeurs d'absorbance sont toujours observées lors des lectures à 690 nm, tandis que les plus fortes sont associées aux lectures à 430 nm. Lorsque nous examinons les lectures de densité optique en fonction du type de microplaque utilisé, soit pour les conditions expérimentales 1 et 3, nous constatons que pour une même longueur d'onde, les densités optiques mesurées dans les microplaques à fond rond sont supérieures à celles des microplaques à fond plat. D'autre part, pour toutes les longueurs d'onde, les absorbances les plus faibles sont obtenues pour la deuxième condition expérimentale, c'est-à-dire pour les microplaques à fond plat dans lesquelles on avait transféré le contenu des microplaques à fond rond. Ces résultats suggèrent une certaine perte du contenu des puits lors du transfert.

Les résultats présentés aux tableaux 6 et 7 démontrent que peu importe la méthode de mesure (spectrophotométrie et compteur de particules) et la longueur d'onde, les coefficients de variation sont très faibles (variation entre 1 et 5 p. 100). De plus, les moyennes des pourcentages d'inhibition supérieurs à zéro pour tous les résultats (tableau 8) sont également faibles et se traduisent par des limites supérieures ($\bar{X} + 2\ s$) très basses. Par contre, on doit garder en mémoire que ces travaux préliminaires n'ont pas été effectués dans des conditions d'essais véritables mais sur une simulation sans période d'incubation. Le pourcentage d'inhibition pour les essais avec une concentration cellulaire initiale de 20 000 cellules/mL/puits après une période d'incubation de 96 heures, déterminé dans nos laboratoires par dénombrement cellulaire, est de 18 p. 100.

3.2.2 Essais simulant une dose-réponse

Pour les essais simulant une dose-réponse, nous observons les mêmes types de résultats (non présentés) que pour les essais témoins, soit une absorbance maximale à 430 nm; les lectures à 690 nm sont les plus faibles et les microplaques à fond plat avec contenu transféré des microplaques à fond rond présentent les absorbances les plus faibles quelque soit la longueur d'onde.

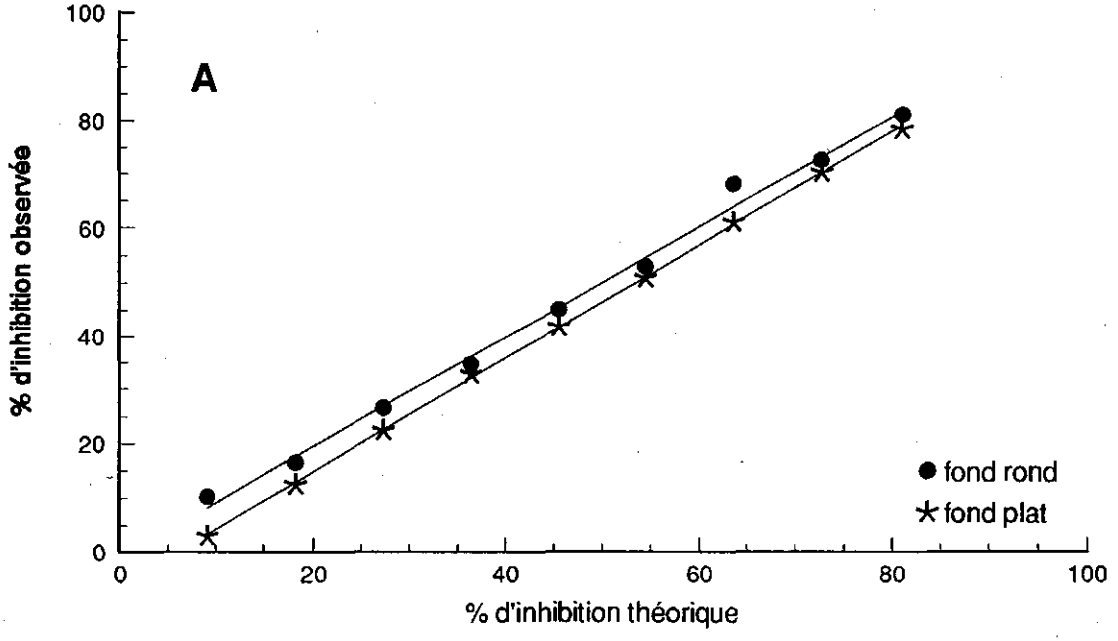
Les résultats des CI_{20}, des CI_{50} et des CMEO obtenues par dénombrement cellulaire et spectrophotométrie sont présentés au tableau 9. Pour ces essais, la CI_{20} et la CI_{50} théoriques se situent respectivement à 20 et 50 p. 100 et les valeurs déterminées pour ces tests, peu importe

la méthode de mesure, sont très près des valeurs théoriques, avec 20 à 25 p. 100 pour la CI_{20} et 48 à 53 p. 100 pour la CI_{50}. D'autre part, les intervalles de confiance associés à chacune des CI sont très petits et les coefficients de corrélation (non présentés) sont tous supérieurs à 0,99. Les droites de régression illustrées à la figure 5 démontrent une forte similitude entre les résultats. Les analyses pour échantillons indépendants et appariés (tableau 10) confirment que les pourcentages d'inhibition théoriques obtenus pour chacune des méthodes d'évaluation de la densité cellulaire ne sont pas significativement différents. En effet, aucun des *t* calculés n'excède la valeur de *t* de la table, soit ± 2,045 (dl = 29) au seuil de 5 p. 100.

Pour les CMEO, seul le résultat pour la microplaque à fond plat dont la densité cellulaire a été évaluée par dénombrement cellulaire est légèrement supérieur, avec un pourcentage d'inhibition théorique de 27,3 p. 100 comparativement à 9,1 p. 100 pour les autres conditions expérimentales.

Tableau 9
Résultats des paramètres de mesure calculés (CI_{20}, CI_{50} et CMEO) pour les essais simulant une dose-réponse

Condition expérimentale n°	Type de microplaque	CI_{20} Int. de confiance	CI_{50} Int. de confiance	CMEO % inhibition théorique
Compteur de particules				
1	À fond rond	20.6 13,7 - 27,3	50,0 43,4 - 56,7	9,1
3	À fond plat	25,0 21,9 - 27,9	53,5 50,5 - 56,5	27,3
Lecture photométrique 430 nm				
1	À fond rond	20,0 14,3 - 25,5	48,5 42,9 - 53,9	9,1
2	À fond plat, contenu transféré de microplaque à fond rond	20,3 14,8 - 25,7	51,1 45,8 - 56,4	9,1
3	À fond plat	21,3 17,5 - 24,9	51,1 47,5 - 54,8	9,1



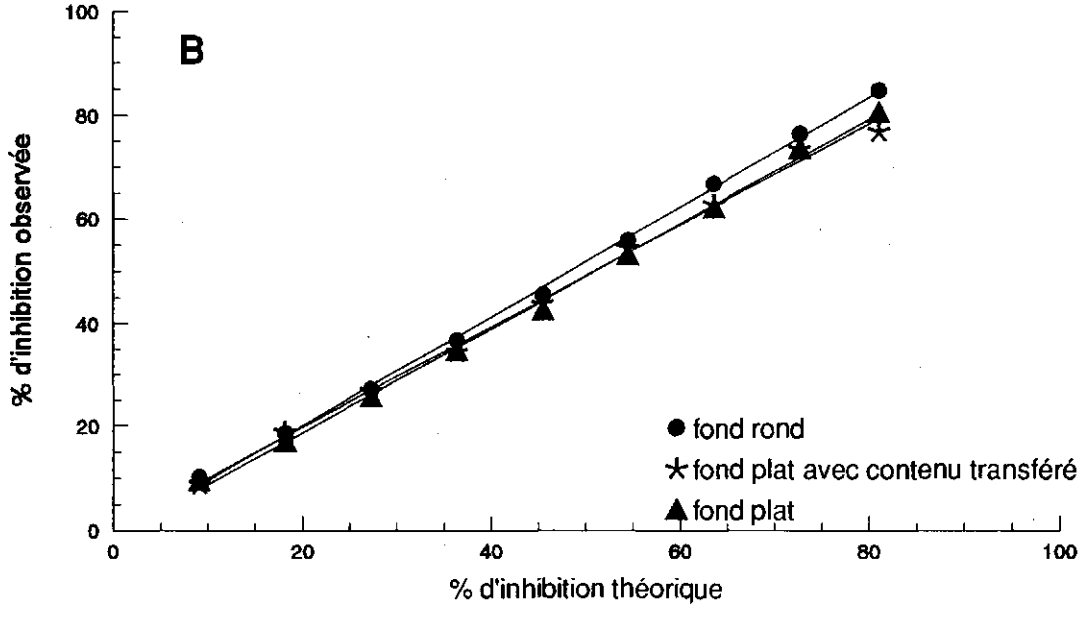


Figure 5 **Droites de régression obtenues lors des essais simulant une dose-réponse analysée (A) par compteur de particules et (B) par spectrophotométrie (longueur d'onde 430 nm)**

Tableau 10
Valeurs de *t* calculées lors des analyses statistiques effectuées sur les pourcentages d'inhibition obtenus pour chacune des conditions expérimentales lors des essais simulant une dose-réponse

		Compteur de particules		Photométrie	
Méthode d'évaluation de la densité cellulaire	Condition expérimentale n°	1	3	1	2
Compteur de particules	3	0,48*	---	---	---
Photométrie	1	-1,47**	-0,67*	---	---
Photométrie	2	0,92**	-0,39*	0,47**	---
Photométrie	3	1,23**	0,13*	0,33**	0,03**

* Échantillons indépendants.
** Échantillons appariés.

En dernier lieu, le jumelage des valeurs d'absorbance obtenues avec les comptes cellulaires met en lumière la sensibilité de la technique spectrophotométrique. En effet, ce jumelage révèle qu'une variation de la densité cellulaire inférieure à 10 p. 100 peut être détectée par spectrophotométrie. De plus, les résultats nous indiquent que la limite de détection pour la photométrie serait égale ou même inférieure à 350 000 cellules/mL.

En résumé, ces travaux préliminaires confirmaient que l'évaluation de la concentration cellulaire par spectrophotométrie pouvait être envisagée. La variabilité des résultats est très faible pour toutes les conditions expérimentales lors des essais simulés. Par contre, les valeurs d'absorbance plus faibles pour les lectures à 690 nm et pour les microplaques à fond plat avec contenu transféré des microplaques à fond rond nous ont incité à éliminer ces deux conditions expérimentales. Les absorbances supérieures à 430 nm nous ont amené à privilégier cette longueur d'onde pour la suite des essais, bien que les résultats obtenus à 450 nm soient tout aussi valables. Pour le choix définitif du type de microplaque à utiliser, des travaux complémentaires ont été effectués afin de vérifier l'effet sur la croissance des algues et sur le pH dans les puits durant la période d'incubation.

3.3 OPTIMISATION DES CONDITIONS D'ESSAIS AFIN DE FAVORISER L'UTILISATION DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE

3.3.1 Suivi de la croissance des algues

Les figures 6 et 7 représentent les résultats obtenus pour les différentes conditions expérimentales. En observant la courbe de croissance à la figure 6, nous constatons immédiatement que le fait d'avoir augmenté le volume de 220 µL à 275 µL par puits d'incubation ne semble pas influencer la croissance des algues dans la microplaque. Par contre, la situation est différente en ce qui concerne le type de microplaque utilisé. En effet, la croissance est beaucoup plus importante dans les microplaques à fond plat (figure 7). Après quatre jours d'incubation, soit la durée d'exposition des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*, la croissance des algues dans les microplaques à fond plat est de trois fois supérieure à celle observée dans les microplaques à fond rond. Cette augmentation de la densité cellulaire pour les microplaques à fond plat est probablement liée à la plus grande disponibilité de la lumière ainsi qu'à une surface d'éclairage plus importante.

3.3.2 Suivi des conditions de pH

On présente au tableau 11 les valeurs de pH obtenues pour chacune des conditions expérimentales en fonction du nombre d'heures d'incubation. Le suivi démontre que l'évolution du pH dans les microplaques à fond rond dont les puits contiennent des volumes totaux de 220 et 275 µL est similaire. Ces résultats confirment la validité des conditions expérimentales puisque comme spécifié dans le protocole d'Environnement Canada (1992), le pH des témoins ne doit pas varier de plus de 1,5 unité durant la période d'exposition.

Par contre, les données de pH pour les essais réalisés dans les microplaques à fond plat révèlent une forte augmentation des valeurs de pH, particulièrement après trois et quatre jours d'incubation. Cette augmentation, supérieure au critère de 1,5 unité précisé dans le protocole normalisé, est probablement liée à la forte croissance des algues (figure 7). En effet, l'augmentation de la densité des algues s'accompagne d'une demande croissante de dioxyde de carbone, celle-ci excédant le taux de transfert du dioxyde de carbone de la phase gazeuse à la phase liquide. Dans ces conditions et avec l'absence d'ajout externe durant la période

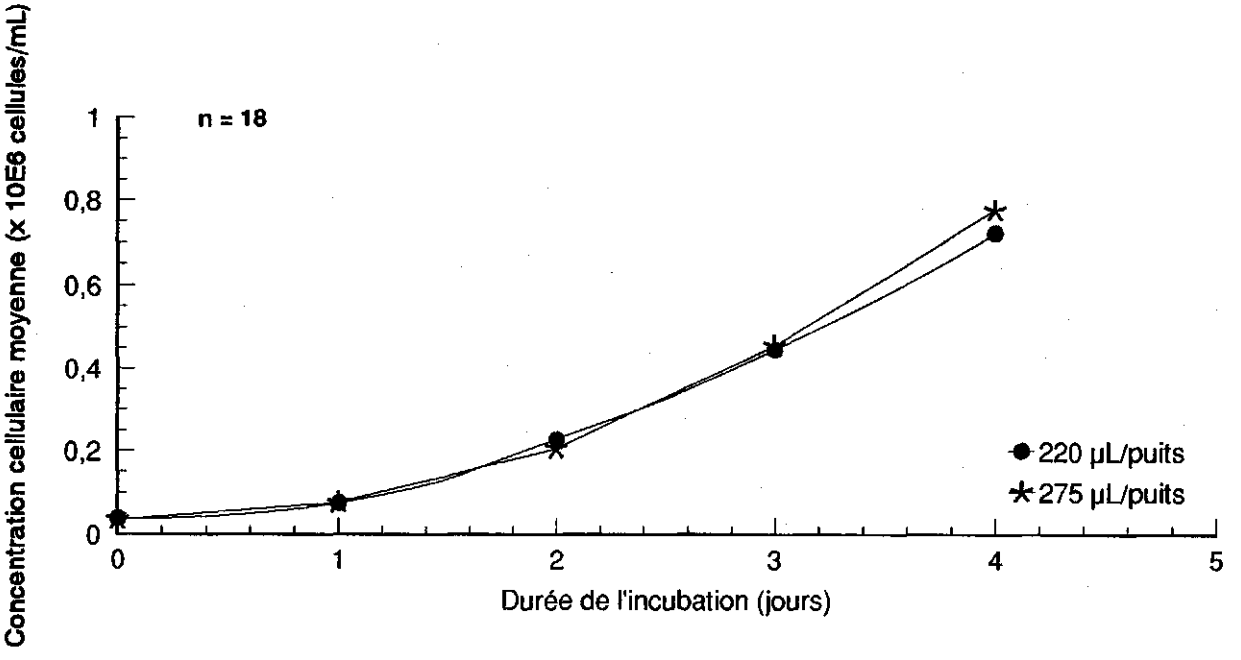


Figure 6 'Courbes de croissance obtenues en fonction du volume total par puits d'incubation pour les essais effectués dans des microplaques à puits à fond rond

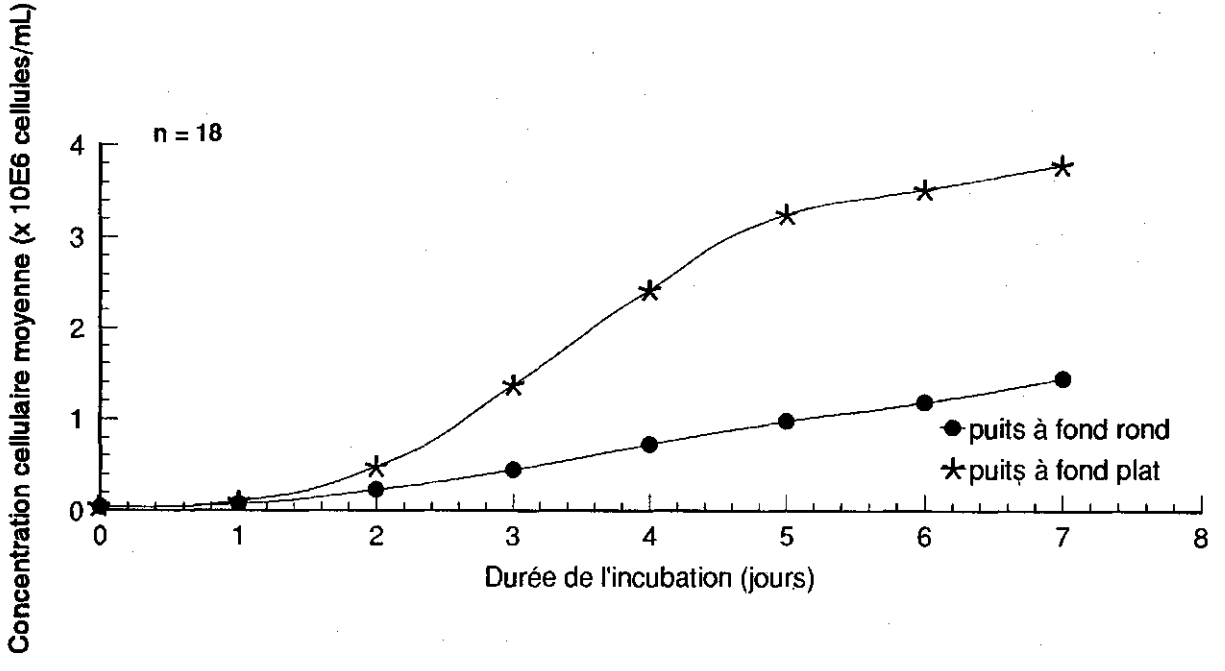


Figure 7 Courbes de croissance obtenues en fonction du type de microplaque utilisé pour l'incubation

Tableau 11
Moyennes des pH obtenues pour chacune des conditions expérimentales en fonction du temps d'incubation

Condition expérimentale n°	Description	Durée de l'incubation (heures)				
		0	24	48	72	96
1	Microplaque à fond rond 220 µL	7,1	7,2	7,3	7,3	7,3
2	Microplaque à fond rond 275 µL	7,1	7,2	7,3	7,5	7,5
3	Microplaque à fond plat 220 µL	7,2	7,2	7,5	9,0	9,4

d'incubation, le dioxyde de carbone nécessaire à la croissance des algues sera dérivé des bicarbonates présents dans le milieu selon la réaction suivante $HCO_3^- \rightarrow OH^- + CO_2$. L'utilisation des bicarbonates s'accompagne de la formation d'ions OH^- et par conséquent d'une augmentation du pH (Nyholm et Källqvist, 1989).

3.3.3 Essai de toxicité avec un toxique de référence

Les résultats des essais de toxicité avec le chlorure de sodium (NaCl) sont présentés au tableau 12. Les trois droites de régression issues de cette expérience sont illustrées à la figure 8. Les CI_{50} déterminées pour les essais dans les microplaques à fond rond avec des volumes de 220 et 275 µL sont égales avec une valeur de 2700 mg/L (tableau 12). De plus, les courbes et les droites de régression pour ces deux conditions expérimentales (figure 8) sont similaires. L'analyse statistique d'égalité des coefficients de régression (b) d'une valeur de 0,063 et 0,068 avec des écarts types (s_b) respectifs de 0,036 et 0,004 confirme l'égalité des pentes. Le t calculé pour ces deux essais, soit 0,69 (dl = 19) étant inférieur au $t_{0,05}$ de la table de Student d'une valeur de 2,093 confirme que les coefficients de régression obtenus ne sont pas significativement différents l'un de l'autre. En dernier lieu, la comparaison statistique des pourcentages d'inhibition obtenus avec un t calculé de 1,1 (dl = 52) nous révèle que les résultats pour ces deux essais ne sont pas significativement différents.

Tableau 12
Résultats des paramètres de mesure obtenus pour chacune des conditions expérimentales lors des essais avec le chlorure de sodium

Condition expérimentale	CI_{50} (mg/L) (intervalle de confiance)	CMEO (mg/L)	CSEO (mg/L)
Microplaque à fond rond 220 µL	2700 (2520 - 2880)	2000	1 700
Microplaque à fond rond 275 µL	2700 (2490 - 2910)	2200	1 900
Microplaque à fond plat 220 µL	< 1200	< 1200	< 1 200

Par contre, les résultats dans la microplaque à fond plat diffèrent considérablement des essais réalisés dans les microplaques à fond rond d'une part, mais également des valeurs cumulatives de notre diagramme de contrôle (figure 9). Les limites représentées dans le diagramme sont les limites d'avertissement et de contrôle. Les limites supérieure et inférieure d'avertissement (LSA et LIA) correspondent à un seuil de confiance de 95 p. 100 et sont déterminées par la moyenne des CI_{50} plus ou moins deux fois l'écart type ($\bar{X} \pm 2\ s$). Les limites supérieure et inférieure de contrôle (LSC et LIC) représentent un seuil de 99 p. 100 soit, la moyenne des CI_{50} plus ou moins trois écarts types ($\bar{X} \pm 3\ s$). La CI_{50} pour l'essai dans la microplaque à fond plat est inférieure à 1200 mg/L (tableau 12) et se situe à l'extérieur de la limite inférieure de contrôle à 99 p. 100 (LIC) définie par le diagramme de contrôle, soit 1300 mg/L de NaCl. La comparaison des pourcentages d'inhibition (tableau 13) atteste que les résultats déterminés pour cet essai sont significativement différents de ceux obtenus pour les deux autres conditions expérimentales avec des valeurs de t de -10,4 et -10,7 (dl = 52). Le coefficient de régression d'une valeur de 0,0167 avec un s_b de 0,0008 diffère aussi significativement des coefficients déterminés pour les essais dans les microplaques à fond rond.

Cette toxicité beaucoup plus importante dans les microplaques à fond plat n'est pas le reflet d'une plus grande sensibilité des organismes au produit. Elle serait plutôt attribuable à l'effet combiné du toxique et de la variation de pH dans les puits de la microplaque.

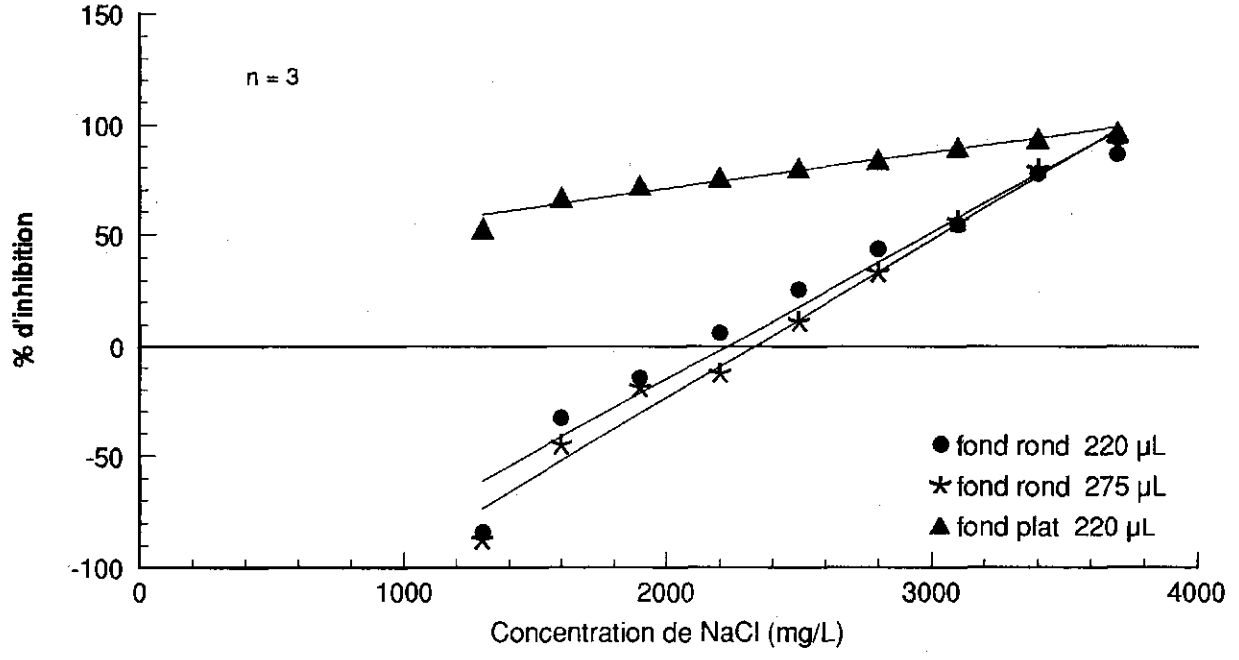


Figure 8 **Droites de régression obtenues lors des essais de toxicité avec le chlorure de sodium (NaCl)**

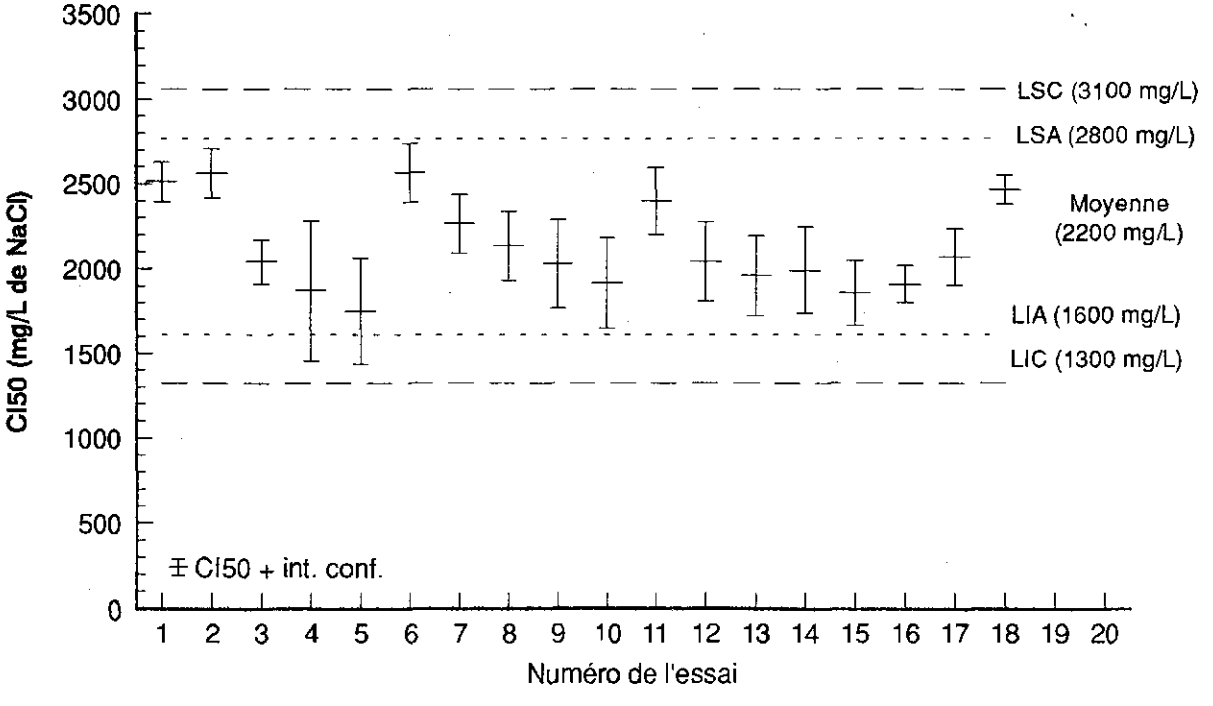


Figure 9 **Diagramme de contrôle pour le chlorure de sodium (NaCl)**

Tableau 13
Comparaison des pourcentages d'inhibition obtenus lors des essais de toxicité avec le chlorure de sodium (dl = 52)

Condition expérimentale n°	Description	Microplaque à fond plat (220 µL)		
		t calculé	$t_{0,05}$ de la table	dl
1	Microplaque à fond rond 220 µL	-10,4	2,006	52
2	Microplaque à fond rond 275 µL	-10,7	2,006	52

Il est clair que les essais avec *Selenastrum capricornutum* ne peuvent être exécutés dans des microplaques à fond plat, bien que celles-ci possèdent des propriétés optiques intéressantes pour la spectrophotométrie. En effet, la croissance importante des algues observée dans les microplaques à fond plat provoque une hausse du pH à l'intérieur des puits d'incubation, modifiant par la suite la réponse des algues aux toxiques.

L'augmentation du volume total par puits pour les essais effectués dans les microplaque à fond rond ne semble affecter ni la croissance ni le pH ou la toxicité comparativement aux conditions standard pour les bio-essais avec *Selenastrum capricornutum.*

Suite à ces travaux, deux conditions expérimentales ont été retenues, soit les essais en microplaque à fond rond avec des volumes totaux respectifs de 220 et 275 µL par puits. Nous avons conservé également trois méthodes d'évaluation de la concentration cellulaire, soit le dénombrement cellulaire électronique et la photométrie à 430 et 450 nm.

3.4 VALIDATION DE LA SPECTROPHOTOMÉTRIE POUR ÉVALUER LA DENSITÉ DES SUSPENSIONS ALGALES

3.4.1 Essais sur les toxiques de référence

Les résultats de toxicité pour les essais standard avec le chlorure de sodium sont regroupés au tableau 14. Les CI_{50} déterminées à l'aide de la spectrophotométrie sont

systématiquement plus élevées que celles obtenues par compteur de particules. La moyenne des CI_{50} déterminées avec le compteur de particules est de 2500 mg/L comparativement à des moyennes respectives de 2900, 3100, et 3000 mg/L par photométrie. La comparaison des CI_{50} présentée au tableau 15 confirme que les différences observées sont statistiquement significatives. Nous constatons également que plusieurs des CI_{50} déterminées par photométrie sont à l'extérieur des limites de confiance à 95 p. 100 (LIA et LSA) établies par le diagramme de contrôle, soit 1600 à 2800 mg/L (figure 9). Les CI_{50} et les intervalles de confiance présentés à la figure 10 illustrent bien la différence des résultats obtenus avec le compteur de particules et la photométrie. En effet, nous observons que les intervalles de confiance calculés à partir des résultats de photométrie sont beaucoup plus grands. De plus, la comparaison des pourcentages d'inhibition à l'aide du test *t* pour échantillons appariés révèle que les résultats obtenus par spectrophotométrie sont significativement différents de ceux générés avec le compteur de particules.

Tableau 14
Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais standard avec le chlorure de sodium*

		Microplaque avec puits à fond rond		Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	
Essai n°	Compteur	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm
1	2700	3100	3100	---	---
2	2700	2800	2900	---	---
3	2600	3000	2900	3200	3300
4	2100	2700	2700	2800	2700
Moyenne	2500	2900	3100	3000	3000

D.O. = Densité optique.

* Les résultats sont exprimés en mg/L de NaCl.

Comparaison statistique des CI_{50} obtenues lors des essais standard avec le NaCl en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)

Méthode d'évaluation de la concentration des algues	*t* calculé	P calculé	$t_{0,05}$ de la table de Student
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 5,08	0,014	3,182
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 4,47	0,021	3,182
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 316,0	0,002	12,71
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 14,0	0,046	12,71

Nos études démontrent également que le degré de variabilité pour l'estimation de la densité algale entre les différents puits pour une même concentration et dans une même microplaque est toujours plus élevé lorsque déterminé par photométrie (résultats non présentés). Cette variabilité observée se reflète directement dans les intervalles de confiance obtenus pour les CI_{50}. L'estimation de faibles concentrations cellulaires est beaucoup plus précise par compteur de particules. Nous avons noté que pour de faibles concentrations cellulaires, représentant une inhibition de la croissance supérieure à 50 p. 100, les coefficients de variation obtenus par photométrie sont généralement supérieurs à 20 p. 100, ce qui invalide les essais. En effet, comme spécifié dans la méthode normalisée (Environnement Canada, 1992), le coefficient de variation entre les répétitions ne doit pas excéder 20 p. 100. Cette condition est valable pour les concentrations démontrant des pourcentages d'inhibition se situant entre 10 et 90 p. 100.

Les résultats obtenus pour les microplaques à fond plat, après transfert des suspensions algales, démontrent une plus grande variabilité que toutes les autres techniques. Cette variabilité est probablement imputable au transfert lui-même. En effet, plusieurs facteurs dans la procédure peuvent influencer les lectures d'absorbance, entre autres, l'homogénéité du contenu

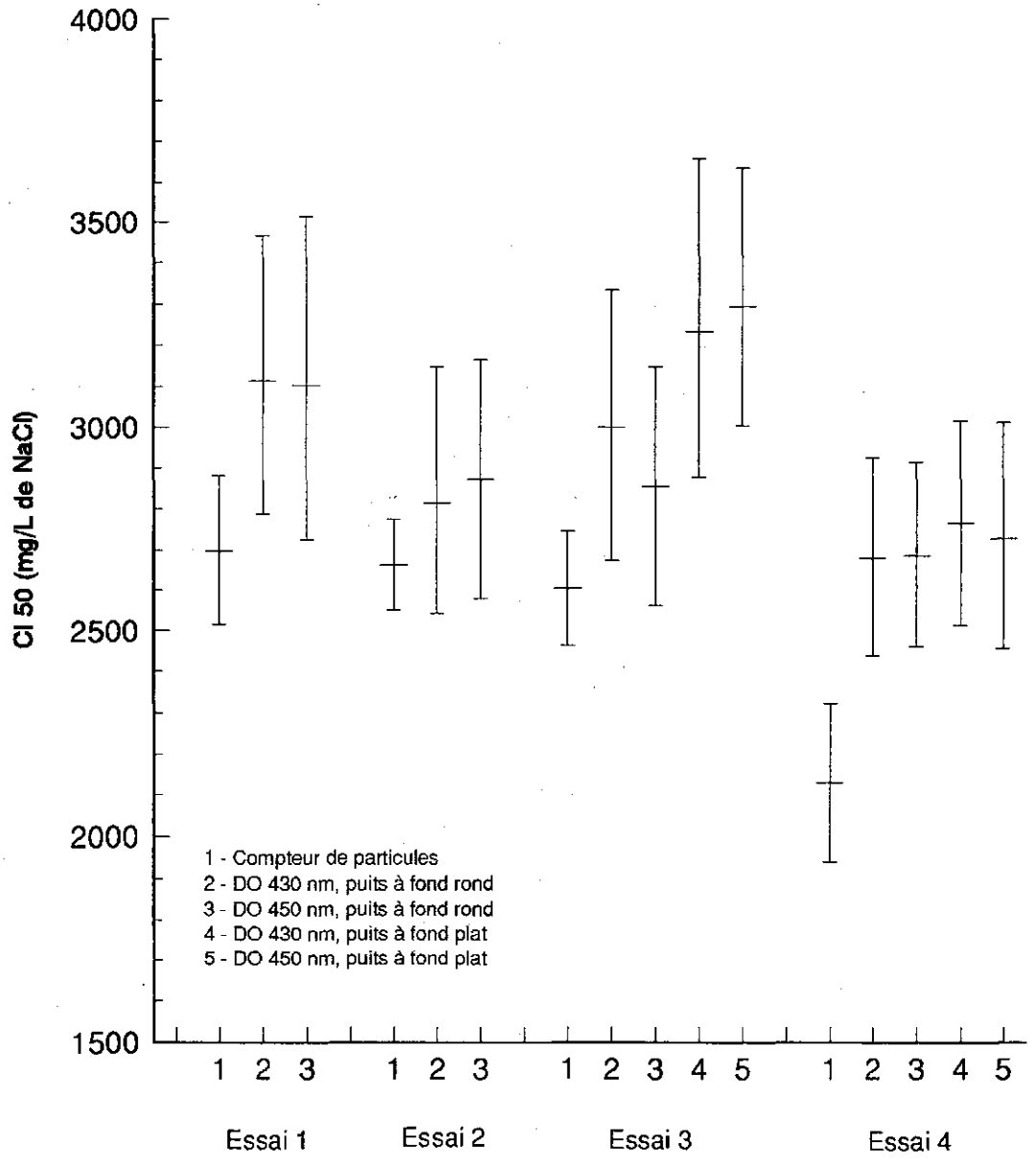


Figure 10 Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais standard avec le chlorure de sodium

transféré, la précision des pipettes utilisées, ainsi que l'expertise de l'analyste. Bien que les microplaques à fond plat possèdent des qualités optiques supérieures, les manipulations de transfert occasionnent une plus grande variabilité des résultats.

En dernier lieu, suite à une analyse de variance (Anova) à un seul critère sur les valeurs de CI_{50}, nous constatons qu'il n'existe aucune différence significative en ce qui concerne la longueur d'onde utilisée lors des mesures photométriques et ce, pour les deux types de microplaque. Les résultats de l'analyse statistique, soit un F calculé de 0,84, un p de 0,51 avec un $F_{0,05}$ de 4,17, confirment l'égalité des CI_{50} obtenues au seuil de signification de 5 p. 100.

Les résultats pour les essais modifiés avec un volume total de 275 µL par puits sont présentés au tableau 16 et à la figure 11. On retrouve les mêmes tendances que pour les essais standard, soit des CI_{50} plus élevées avec des valeurs moyennes de 2400 mg/L (tableau 16) pour la technique photométrique comparativement à 2000 mg/L pour le compteur de particules. Ces différences observées sont significatives au seuil de 5 p. 100 (tableau 17) sauf en ce qui concerne les CI_{50} obtenues à l'aide des lectures optiques à 450 nm effectuées dans les microplaques à fond rond avant transfert. De plus, l'analyse de variance (Anova) à un seul critère effectuée sur les CI_{50} obtenues aux deux longueurs d'onde pour les microplaques à fond rond et à fond plat, avec un F calculé de 0,06, un p de 0,98 et une valeur de $F_{0,05}$ de 3,7, démontre encore un fois que les différences observées pour ces conditions expérimentales ne sont pas significatives au seuil de 5 p. 100. Nous avons noté, par contre, une plus grande variation des CI_{50} obtenues pour une même méthode d'évaluation de la concentration cellulaire. Cette variation est imputable à la manipulation plus délicate lorsque le volume des puits est de 275 µL. En effet, la capacité maximale des puits dans les microplaques à fond rond étant de 300 µL, la remise en suspension des algues est alors plus difficile car l'espace disponible par puits est minime et les débordements sont fréquents. Nous avons par ailleurs noté que les coefficients de variation pour ces essais sont fréquemment supérieurs à 20 p. 100 et ce, même pour la technique de dénombrement cellulaire à l'aide du compteur de particules.

Pour les essais avec le sulfate de zinc (tableau 18, figure 12), les résultats entre les différentes techniques d'évaluation de la densité cellulaire concordent mieux avec des CI_{50} moyennes qui varient entre 38 et 46 µg/L pour les essais standard et entre 36 à 43 µg/L pour les essais modifiés.

Tableau 16
Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais modifiés (275 µL/puits) avec le chlorure de sodium*

		Microplaque avec puits à fond rond		Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	
Essai n°	Compteur	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm
1	2700	3100	3100	---	---
2	1800	2100	2000	2300	2300
3	1400	2200	2100	2200	2200
4	2100	2400	2300	2600	2500
Moyenne	2000	2400	2400	2400	2400

* Les résultats sont exprimés en mg/L de NaCl.

Tableau 17
Comparaison des CI_{50} obtenues lors des essais modifiés avec le NaCl en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)

Méthode d'évaluation de la concentration des algues	*t* calculé	P calculé	$t_{0,05}$ de la table de Student
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 3,71	0,034	3,182
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 2,91	0,062	3,182
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 4,89	0,039	4,30
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 5,45	0,046	4,30

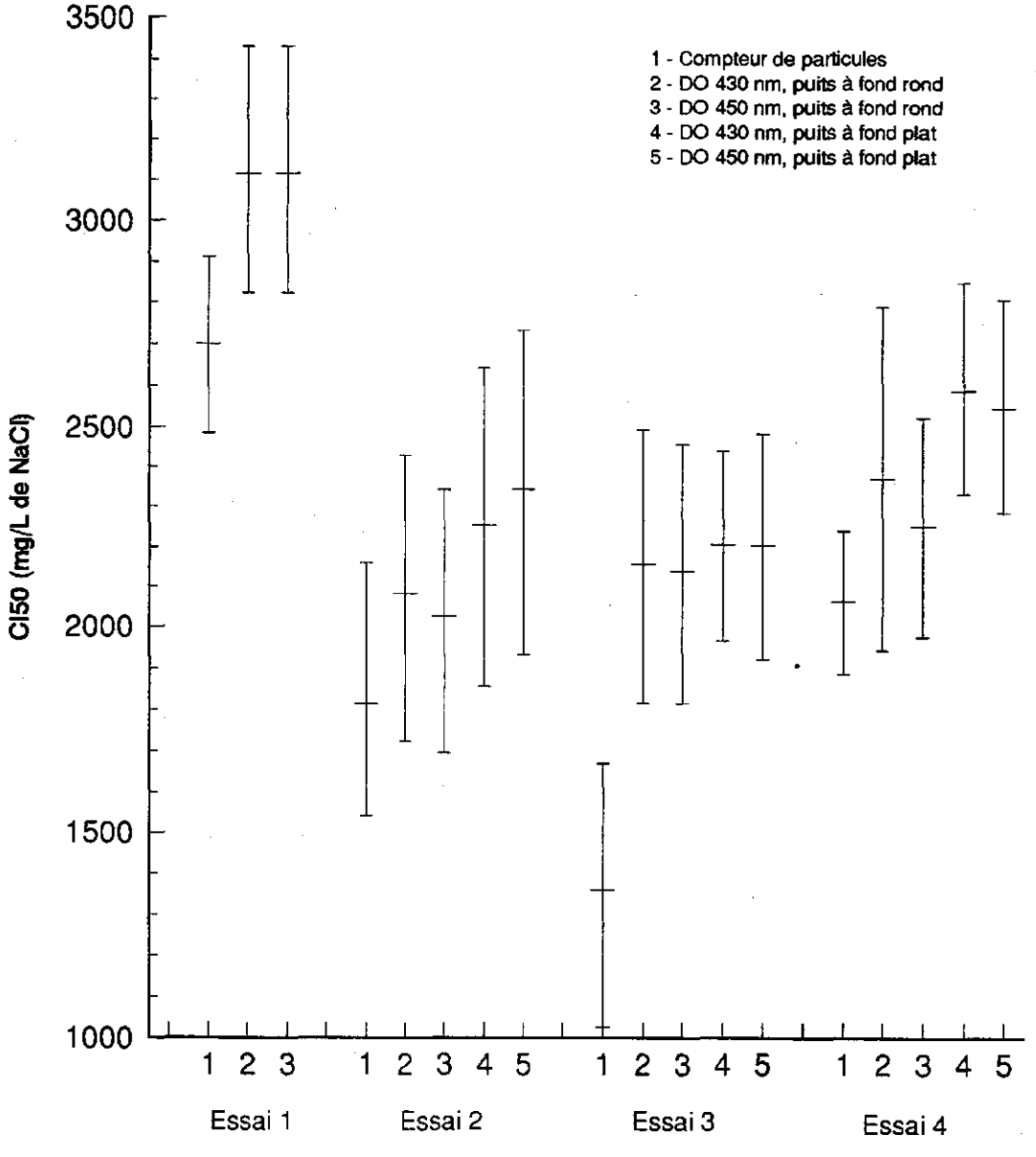


Figure 11 **Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais modifiés (275 µL/puits) avec *Selenastrum capricornutum* en présence de chlorure de sodium**

Tableau 18
Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais avec le sulfate de zinc*

		Microplaque avec puits à fond rond		Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	
Essai n°	Compteur	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm
Essai standard (220 µL/puits)					
1	42	41	40	49	53
2	33	27	30	29	37
3	46	46	46	48	47
Moyenne	40	38	39	42	46
Essai modifié (275 µL/puits)					
1	33	38	39	31	33
2	32	42	42	35	35
3	43	47	47	45	45
Moyenne	36	43	43	37	38

* Les résultats sont exprimés en µg/L de Zn^{++}.

La comparaison des CI_{50} obtenues par photométrie avec celles établies avec le compteur de particules démontre que les différences ne sont pas significatives au seuil de 5 p. 100 (tableau 19) à l'exception des résultats à 450 nm avec les microplaques à fond rond. Par contre, les intervalles de confiance des différentes CI_{50} (figure 12) sont généralement plus larges lors de l'utilisation de la photométrie. Nous constatons également que les résultats pour les microplaques à fond plat avec contenu transféré de microplaques à fond rond sont plus variables que ceux obtenus directement dans les microplaques à fond rond. Un test de *t* de Student pour échantillons appariés effectué sur les pourcentages d'inhibition générés par les lectures photométriques à 430 et 450 nm avant et après transfert dans les microplaques à fond plat, nous indique que les résultats ne sont pas significativement différents au seuil de 5 p. 100, sauf en ce

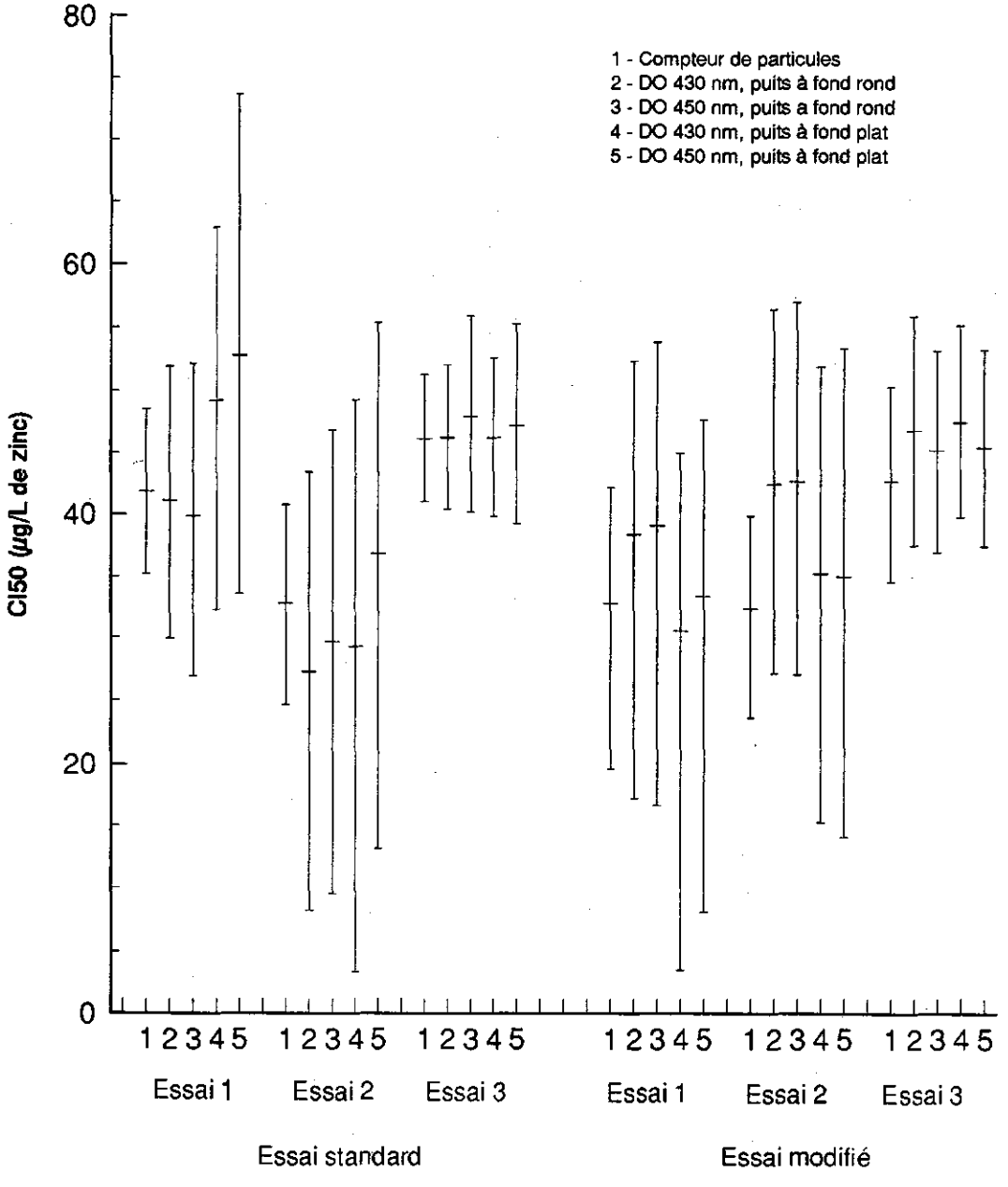


Figure 12 **Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais avec *Selenastrum capricornutum* en présence de sulfate de zinc**

qui concerne l'essai standard numéro 1 avec des valeurs de t de 3,86 et 4,5 (dl = 26) et l'essai modifié numéro 2 dont les t sont de -3,62 et -3,65 (dl = 26).

Tableau 19
Comparaison des CI_{50} obtenues lors des essais avec le sulfate de zinc en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)

Méthode d'évaluation de la concentration des algues	t calculé	P calculé	$t_{0,05}$ de la table de Student
Essai standard (220 µL/puits)			
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond rond	1,17	0,360	4,30
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond rond	1,80	0,213	4,30
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 0,58	0,619	4,30
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 1,84	0,208	4,30
Essai modifié (275 µL/puits)			
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 3,73	0,362	4,30
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 5,34	0,033	4,30
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 0,63	0,592	4,30
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 2,66	0,177	4,30

L'examen des résultats obtenus avec les deux toxiques de référence selon les différentes techniques de mesure fait douter de la pertinence d'utiliser la photométrie comme outil d'évaluation de la densité cellulaire. En effet, en comparant les CI_{50} obtenues pour l'ensemble des essais (n = 14), nous constatons que la majorité des CI_{50} déterminées à l'aide des mesures photométriques sont plus élevées que celles établies avec le compteur de particules. Ce facteur nous semble important car il suggère une plus faible sensibilité pour la technique photométrique. De plus, les résultats générés par photométrie sont plus variables et des coefficients de variation supérieurs à 20 p. 100 ont été notés dans tous les essais. Nous avons également observé que la précision du compteur de particules pour de faibles concentrations cellulaires est de loin supérieure à celle de la photométrie, et que pour les concentrations où l'inhibition de croissance est faible, c'est-à-dire inférieure à 30 p. 100, le pouvoir discriminatoire du compteur de particules est plus élevé que celui du spectrophotomètre.

Bien que les CI_{50} moyennes avec le sulfate de zinc ne sont pas significativement différentes, nous avons obtenu des différences significatives entre les CI_{50} déterminées avec les deux techniques d'évaluation de la densité cellulaire lors des essais avec le chlorure de sodium. Par contre, les résultats générés aux deux longueurs d'onde, soit 430 et 450 nm, pour le même type d'essai et de microplaque ne sont pas significativement différents. En dernier lieu, le transfert de microplaques se traduit par une variation plus importante des résultats et les essais modifiés, c'est-à-dire avec un volume total de 275 µL, sont plus variables et moins reproductibles dans le temps.

3.4.2 Essais avec des effluents industriels

Pour deux des cinq échantillons complexes testés, soit l'effluent du secteur métallurgique et le nettoyant, nous avons remarqué les mêmes tendances dans les résultats. Pour ces deux échantillons, nous observons que les CI_{50} déterminées par photométrie sont systématiquement plus élevées et les intervalles de confiance très larges.

Lors des essais avec le nettoyant, nous avons obtenu pour les essais standard et modifiés des CI_{50} moyennes respectives de 0,024 et 0,03 p. 100 volume sur volume (v/v) pour les résultats générés par dénombrement avec le compteur de particules comparativement à des CI_{50} moyennes se situant entre 0,1 et 0,24 p. 100 v/v pour la technique photométrique

(tableau 20). Les différences observées entre les CI_{50} des deux techniques d'évaluation de la densité cellulaire sont significatives au seuil de 5 p. 100 (tableau 21). La figure 13 illustre bien les différences pour les CI et pour les intervalles de confiance en fonction de la technique d'évaluation de la densité cellulaire et du type d'essai, c'est-à-dire standard et modifié.

Tableau 20
Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais avec le nettoyant*

		Microplaque avec puits à fond rond		Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	
Essai n°	Compteur	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm
Essai standard (220 µL/puits)					
1	0,029	0,15	0,154	0,16	0,14
2	0,024	0,082	0,08	0,16	0,27
3	0,019	0,091	0,101	0,103	0,10
Moyenne	0,024	0,11	0,11	0,14	0,17
Essai modifié (275 µL/puits)					
1	0,03	0,103	0,10	0,13	0,29
2	0,029	0,09	0,09	0,18	0,30
3	0,031	0,09	0,12	0,13	0,13
Moyenne	0,03	0,094	.103	0,15	0,24

* Les résultats sont exprimés en pourcentage v/v d'échantillon.

La CI_{50} moyenne des essais standard avec l'effluent du secteur métallurgique lorsque le compteur de particules est utilisé est de 12 p. 100 v/v (tableau 22), tandis que les CI_{50} moyennes pour les différentes méthodes d'évaluation à l'aide de la photométrie sont de 41, 41, 27 et 24 p. 100 v/v. D'autre part, contrairement à tous les autres échantillons, les résultats lors des essais modifiés associés au compteur de particules et à la photométrie concordent

relativement bien, particulièrement pour l'essai n° 2 avec des CI_{50} variant entre 10,8 et 23,9 p. 100 v/v (tableau 22).

Tableau 21
Comparaison des CI_{50} obtenues lors des essais avec le nettoyant en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration des algues (compteur de particules versus spectrophotométrie)

Méthode d'évaluation de la concentration des algues	*t* calculé	P calculé	$t_{0,05}$ de la table de Student
Essai standard (220 µL/puits)			
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 4,38	0,48	4,303
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 8,77	0,48	4,303
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 7,06	0,019	4,303
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 8,89	0,012	4,303
Essai modifié (275 µL/puits)			
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 14,72	0,005	4,303
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond rond	- 8,35	0,014	4,303
D.O. 430 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 6,70	0,022	4,303
D.O. 450 nm Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	- 7,70	0,017	4,303

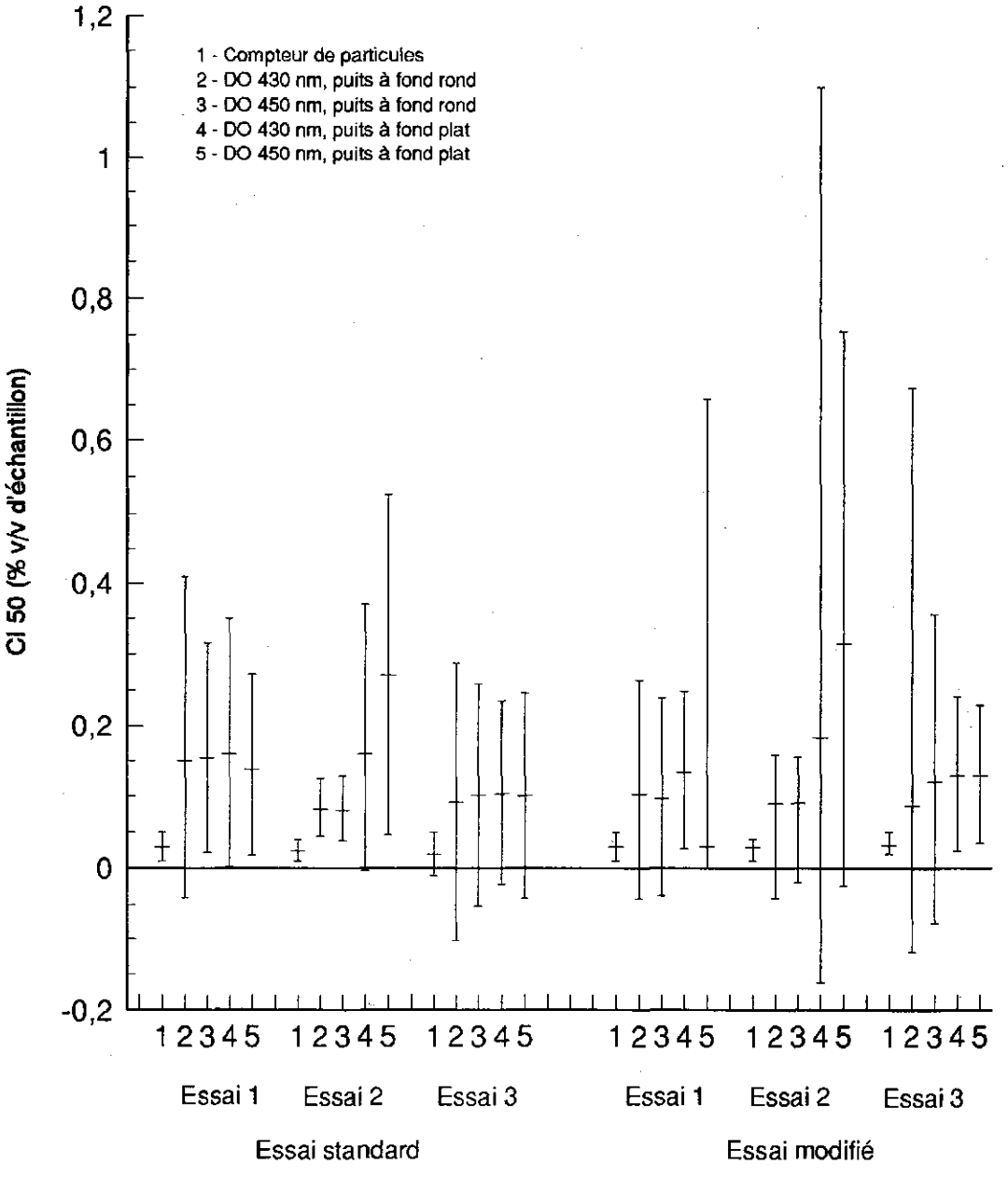


Figure 13 **Résultats des CI_{50} et des intervalles de confiance à 95 p. 100 obtenus lors des essais avec le nettoyant**

Tableau 22
Compilation des CI_{50} obtenues lors des essais avec l'effluent du secteur métallurgique*

		Microplaque avec puits à fond rond		Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	
Essai n°	Compteur	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm	D.O. 430 nm	D.O. 450 nm
Essai standard (220 µL/puits)					
1	12,7	50,9	50,8	35,1	26,7
2	11,9	30,6	30,4	17,9	20,2
Moyenne	12,3	40,8	40,6	26,5	23,5
Essai modifié (275 µL/puits)					
1	11,1	23,8	37,1	18,7	19,1
2	11,5	13,4	13,6	23,9	10,8
Moyenne	11,3	18,6	25.4	21,3	15,0

* Les résultats sont exprimés en pourcentage v/v d'échantillon.

Par contre, des test de *t* de Student pour échantillons appariés effectués sur les pourcentages d'inhibition obtenus tant pour l'échantillon d'effluent du secteur métallurgique que pour le nettoyant démontrent qu'il existe des différences significatives entre les résultats générés par le compteur de particules et ceux provenant des densités optiques (annexes 2 et 3). Ces différences ont été observées pour tous les essais avec les deux échantillons.

Les résultats pour ces deux échantillons démontrent que la sensibilité de la technique photométrique est plus faible. Les CMEO présentées au tableau 23 reflètent cette tendance. En effet, toutes les valeurs de CMEO obtenues par photométrie sont systématiquement plus élevées que celles déterminées à partir des résultats de dénombrement cellulaire. Finalement, nous avons constaté pour les deux échantillons la présence de nombreuses valeurs aberrantes ainsi que des coefficients de variation supérieurs à 20 p. 100 dans les données générées par photométrie.

Tableau 23
Compilation des CMEO obtenues lors des essais avec un effluent industriel du secteur de la métallurgie et un nettoyant*

Échantillon	Type d'essai	Essai n°	Compteur	D.O. 430 nm	
				Microplaque avec puits à fond rond	Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré
Effluent	Standard	1	2,8	22,7	11,4
Industriel	Standard	2	5,7	45,5	11,4
	Modifié	1	2,8	11,4	11,4
	Modifié	2	2,8	11,4	11,4
Nettoyant	Standard	1	0,007	0,03	0,03
	Standard	2	0,004	0,03	0,03
	Standard	3	0,004	0,02	0,02
	Modifié	1	0,004	0,008	0,02
	Modifié	2	0,004	0,02	0,03
	Modifié	3	0,004	0,03	0,02

* Les résultats sont exprimés en p. 100 v/v d'échantillon.

Les résultats de toxicité estimée par les deux méthodes d'évaluation de la concentration cellulaire pour l'effluent de pâtes et papiers ne concordent aucunement. La CI_{50} déterminée à l'aide du compteur de particules pour cet effluent est de 68 p. 100 v/v avec un intervalle de confiance de 45 à 91 p. 100 v/v. Les valeurs de CMEO et CSEO sont évaluées respectivement à 23 et 11 p. 100 v/v d'effluent. Aucune inhibition de croissance n'a été mise en évidence lorsque la concentration cellulaire a été évaluée à l'aide de la photométrie. Les résultats de photométrie démontrent au contraire une forte stimulation de la croissance des algues. La technique photométrique serait responsable d'une surestimation de la concentration cellulaire. Cette surestimation de la densité cellulaire pourrait être reliée à la diffraction de la lumière par les particules et (ou) à la coloration de l'échantillon, bien que toutes les données de photométrie aient été corrigées par des blancs spécifiques aux concentrations testées. Il semble que la

correction ne soit pas suffisante. Des travaux effectués par la compagnie B.A.R. Environmental (1990) concluaient dans ce sens. Il semble que pour certains échantillons, l'augmentation des absorbances soit due non pas à la croissance des algues mais plutôt à des réactions chimiques dans les puits d'incubation. Ces réactions seraient spécifiques à l'échantillon mais également à chacune des concentrations testées.

Les résultats avec l'effluent du secteur de la chimie organique suivent cette même tendance. Aucune toxicité n'est observée pour cet échantillon. Nous observons plutôt une importante stimulation de la croissance algale, particulièrement pour les trois premières concentrations testées, soit 100, 50 et 25 p. 100 v/v. Toutes les méthodes d'évaluation de la concentration cellulaire abondent dans ce sens. Par contre, les pourcentages de stimulation de la croissance mesurés par photométrie sont beaucoup plus élevés. Les courbes de stimulation obtenues lors d'un des essais et présentées à la figure 14 illustrent bien la surestimation de la densité cellulaire associée à la technique photométrique. Des tests de *t* pour échantillons appariés confirment que les pourcentages de stimulation obtenus pour les deux techniques d'évaluation de la concentration cellulaire sont significativement différents au seuil de 5 p. 100.

Les résultats pour le dernier échantillon testé, soit l'effluent du secteur de la chimie inorganique, démontrent une bonne concordance. La toxicité de cet échantillon n'est pas caractérisée par une courbe dose-réponse progressive. Cet échantillon provoque plutôt une inhibition complète de la croissance algale jusqu'à une concentration de 0,016 p. 100 v/v pour ensuite, sans transition, stimuler fortement la croissance cellulaire à la concentration suivante, soit 0,008 p. 100 v/v d'échantillon. En l'absence de toxicité progressive, il est impossible de déterminer une CI pour cet échantillon. Les CMEO et CSEO pour tous les essais sont respectivement de 0,016 et 0,008 p.100 v/v d'échantillon. Le type de toxicité que démontre cet échantillon explique l'analogie des résultats pour les différentes techniques d'évaluation de la densité cellulaire. En effet, pour ce type d'échantillon où la réponse toxique passe sans transition de l'inhibition complète de la croissance à une stimulation importante, les résultats peuvent, dans une certaine limite, être évalués visuellement sans grand risque d'erreur.

Suite à ces travaux, nous constatons que l'utilisation de la spectrophotométrie pour l'évaluation de la densité cellulaire lors des essais avec *Selenastrum capricornutum* comporte certains désavantages. Bien que plus rapide, elle semble moins reproductible, moins sensible et

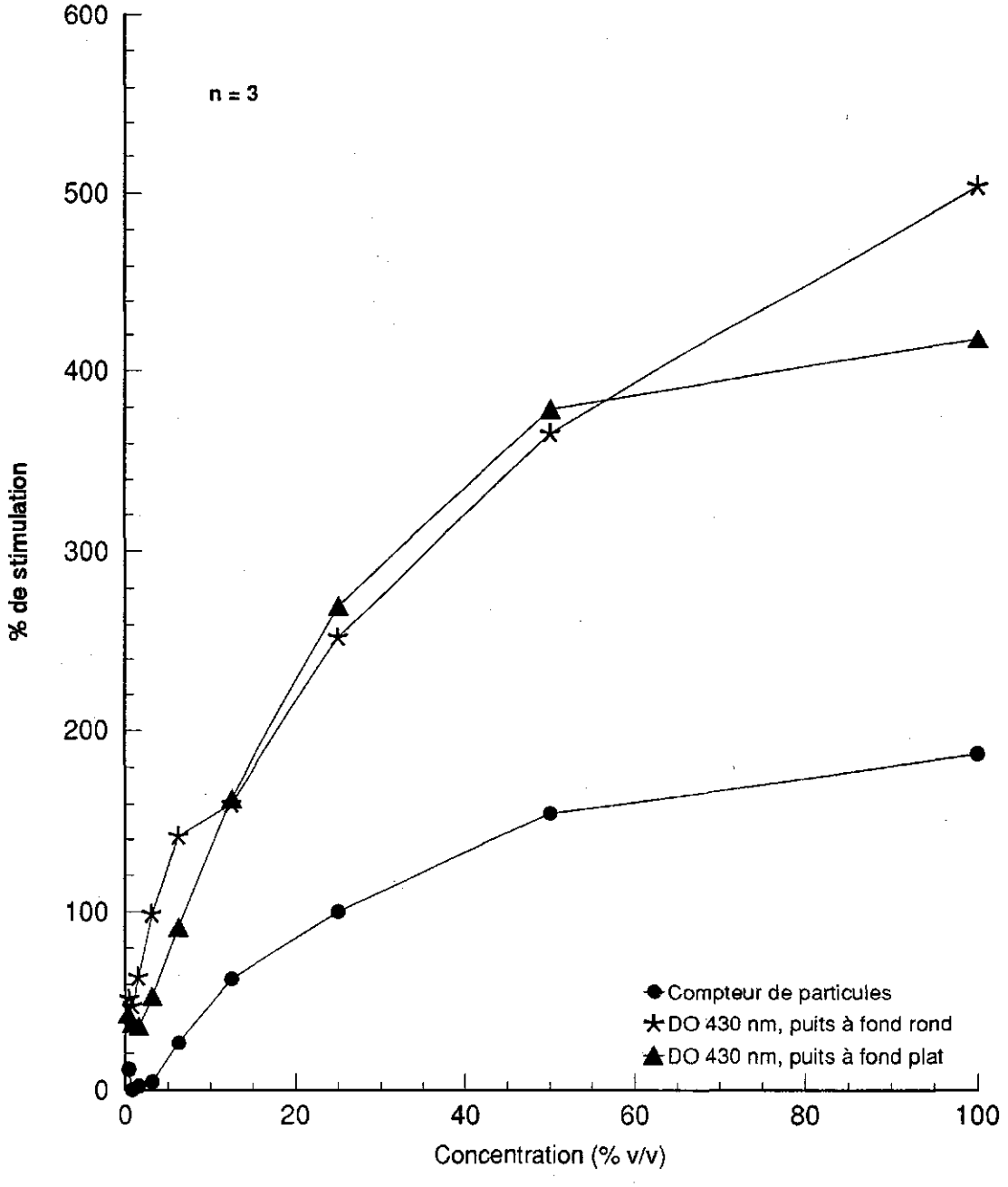


Figure 14 **Résultats obtenus lors des essais de toxicité avec l'effluent industriel de chimie organique**

beaucoup plus variable que la technique par compteur de particules. Cette variabilité des résultats augmente avec la baisse de la concentration des algues dans les puits d'incubation et est systématiquement supérieure pour la technique photométrique. De plus, l'estimation de la biomasse algale par absorbance est généralement plus élevée que celle déterminée par comptage électronique. Par conséquent, les pourcentages d'inhibition associés à la technique photométrique ont tendance à être plus faibles que ceux calculés à partir des dénombrements cellulaires.

3.5 CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

3.5.1 Homogénéité des absorbances

Les résultats des analyses de comparaison multiple avec le test de Tukey sur les absorbances obtenues suite à la distribution d'eau purifiée dans des microplaques, démontrent qu'il n'existe aucune différence significative au seuil de 5 p. 100 entre les absorbances des différentes colonnes d'une même microplaque. Ce résultat a été obtenu pour toutes les conditions testées, c'est-à-dire en fonction du type de microplaque utilisé, du volume distribué par puits et de l'ordre de distribution dans la microplaque. Par contre, pour toutes ces conditions, des différences significatives ont été observées entre les rangées d'une même microplaque. Afin de vérifier si le problème mis en évidence par ces essais ne serait pas imputable aux microplaques elles-mêmes, nous avons effectué les mêmes analyses statistiques sur des résultats d'absorbance obtenus sur les puits vides des microplaques à fond rond et plat. Les résultats n'ont démontré aucune différence significative entre les rangées et les colonnes des microplaques. Les différences observées ne sont donc pas attribuables aux microplaques. Nous avons également effectué le même type d'analyse sur des essais témoins, c'est-à-dire avec des algues soumises à une période d'incubation de quatre jours. Les conclusions des analyses statistiques sont les mêmes que pour l'eau purifiée, soit aucune différence significative entre les colonnes mais des différences ont été observées entre les rangées. Les différences entre les rangées observées dans ces essais ne démontrent aucune constance. En effet, les rangées significativement différentes les unes des autres varient d'un essai à l'autre.

Il est difficile d'expliquer ces différences mais on peut facilement en extrapoler les conséquences. Entre autres, les résultats entre les essais et les répétitions d'une même concentration seront difficilement reproductibles. De plus, les coefficients de variation associés

aux répétitions seront élevés lors des analyses. Les résultats obtenus lors des essais avec les différents échantillons (section 3.4) démontrent bien cette tendance.

3.5.2 Seuil d'effet

Le deuxième critère de contrôle de la qualité qui était évalué dans cette étude est le seuil d'effet. Le seuil d'effet est analogue à la limite de détection en chimie analytique. Les résultats pour chaque technique d'évaluation de la concentration cellulaire sont présentés à la figure 15. Les plus petites valeurs de seuil d'effet sont associées à la technique par dénombrement électronique avec une limite pour les deux types d'essais fixée à 19 p. 100 d'inhibition. Ces résultats ne nous surprennent pas outre mesure car cette approche s'est révélée moins variable et plus sensible que la technique photométrique (section 3.4).

Les plus fortes valeurs de seuil, soit 33 et 34 p. 100 correspondent aux essais modifiés réalisés dans les microplaques à fond rond dont la concentration cellulaire a été évaluée à l'aide de la photométrie. Ces résultats sont attribuables, tel que mentionné à la section 3.4, aux difficultés de manipulation, particulièrement pour la remise en suspension des algues suite à la période d'incubation.

Les seuils d'effet pour toutes les autres conditions se situent entre 20 et 30 p. 100. Bien que ces valeurs soient plus élevées que celles obtenues pour le compteur de particules, elles sont tout à fait acceptables du fait que nous travaillons avec des organismes vivants.

À la lumière de ces résultats, nous constatons que l'évaluation de la concentration cellulaire par dénombrement à l'aide du compteur de particules démontre la plus grande sensibilité. Cependant, les seuils d'effet déterminés avec la technique photométrique, particulièrement pour les essais standard, sont tout à fait acceptables.

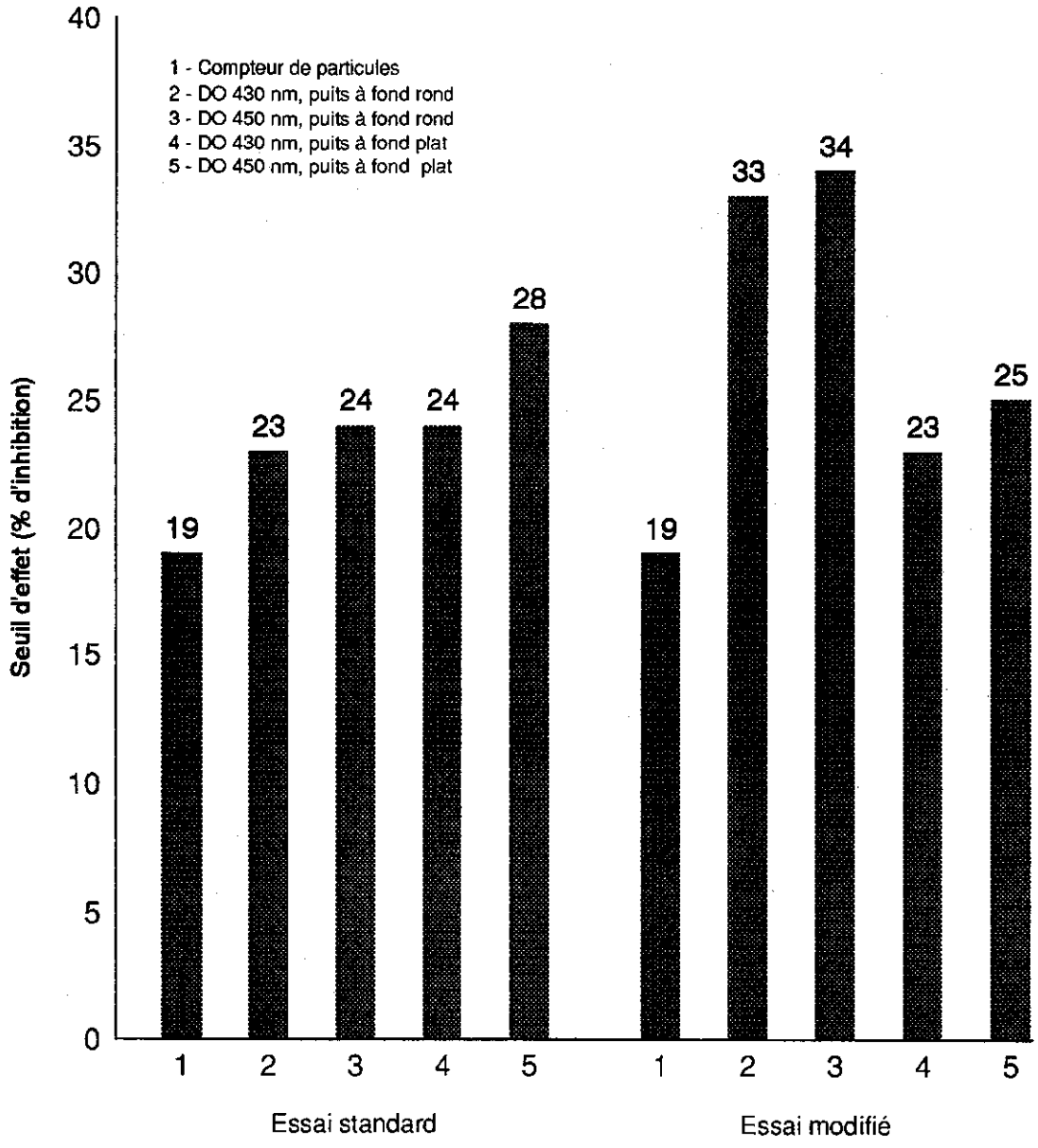


Figure 15 **Résultats des seuils d'effet déterminés pour chacune des méthodes utilisée pour l'évaluation de la densité cellulaire lors des essais avec *Selenastrum capricornutum***

4 Conclusion

Le but de ces travaux était d'évaluer la spectrophotométrie comme outil d'estimation de la concentration cellulaire lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*. Le dénombrement par compteur de particules est la technique utilisée dans nos laboratoires depuis de nombreuse années. Cette technique a fait ces preuves. Par contre, le temps de préparation et de comptage par échantillon est relativement long. La technique photométrique est une méthode alternative proposée dans le protocole normalisée d'Environnement Canada (rapport SPE 1/RM/25, novembre 1992). Cette technique a l'avantage d'être très rapide.

L'évaluation de la spectrophotométrie a été réalisée en deux phases. Une première phase, regroupant les travaux préliminaires, nous a permis d'établir les conditions d'essais mais également de constater que l'utilisation du spectrophotomètre était envisageable. Dans une deuxième phase, les travaux de validation ont porté sur des essais avec de l'eau purifiée, des substances pures et des échantillons complexes.

Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que pour certains échantillons, soit le sulfate de zinc et un des effluents industriels, la technique photométrique était tout aussi valable que le dénombrement par comptage électronique pour évaluer la toxicité.

Les résultats pour les autres échantillons analysés ont démontré par contre que la technique avec le compteur de particules était la plus sensible, particulièrement pour de faibles concentrations cellulaires, que les résultats générés par photométrie étaient beaucoup plus variables et, finalement, que les essais avec dénombrement cellulaire démontraient une plus grande reproductibilité.

En effet, bien que les résultats pour le zinc et un des effluents soient comparables pour les différentes conditions d'essai, les résultats pour les autres échantillons diffèrent significativement. Tel que démontré à la section 3.4, les CI_{50} et les CMEO déterminées par dénombrement cellulaire sont systématiquement plus faibles. Cette tendance met en évidence la plus grande sensibilité de la technique par dénombrement. Les intervalles de confiance très larges associés aux mesures de densité optique sont le reflet de la grande variation notée entre les différentes répétitions pour un même essai. Cette variation est d'autant plus importante lorsque

la concentration des algues diminue et se traduit par des coefficients de variation supérieurs à 20 p. 100. D'ailleurs, les analyses effectuées afin de vérifier l'homogénéité des absorbances nous ont permis de mettre en lumière que les densités optiques entre les rangées d'une même microplaque sont hétérogènes, expliquant ainsi, dans une certaine mesure, les variations obtenues lors des essais de toxicité.

De plus, lors des essais avec les effluents industriels, nous avons constaté que la technique photométrique avait tendance à surévaluer les concentrations cellulaires, d'où une sous-estimation des effets toxiques en ce qui concerne les pourcentages d'inhibition. Les comparaisons statistiques des pourcentages d'inhibition pour les différents essais en fonction des techniques de mesure confirment que les différences observées sont significatives.

Par ailleurs, deux des conditions d'essai sélectionnées, soit l'utilisation d'un volume total de solution d'essai de 275 µL par puits et le transfert du contenu de la microplaque à fond rond dans une microplaque à fond plat, sont à éliminer. Pour ces deux approches, nous avons observé une grande variabilité dans les résultats ainsi qu'une faible reproductibilité des essais. Les difficultés de manipulation liées à ces conditions d'essai expliquent les résultats obtenus.

De toutes les conditions d'essai analysées, le dénombrement à l'aide du compteur de particules pour les conditions standard offre les meilleures performances, soit une sensibilité plus élevée, une faible variabilité, une meilleure reproductibilité et enfin, un seuil d'effet à 19 p. 100.

En dernier lieu, il est important de préciser que depuis quelques années, la tendance pour les essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum* est de diminuer la densité algale initiale ainsi que le temps d'exposition. Dans les faits, la concentration algale initiale est passée de 20 000 cellules/mL/puits à 10 000 cellules/mL/puits. Le temps d'exposition a été réduit de 96 heures à 72 heures. Les conséquences de tels changements sur la concentration cellulaire après la période d'incubation sont importantes. Au lieu d'obtenir des biomasses de l'ordre de 10^6 cellules/mL celles-ci ne seront plus que de l'ordre de 300 000 cellules/mL. Dans ces conditions, il est évident que la technique photométrique n'est pas assez sensible. De plus, la majorité des absorbances enregistrées lors d'effet toxique seront sous la limite de détection de l'appareil. En effet, celle-ci se situe aux environs de 350 000 cellules/mL, ce qui correspond à une valeur d'absorbance approximative de 0,007.

À la lumière de nos résultats et dans les conditions actuelles, nous ne suggérons aucunement l'utilisation de la spectrophotométrie pour l'estimation de la densité cellulaire lors des essais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum*. Par contre, cette technique pourrait s'avérer utile dans d'autres circonstances. Entre autres, lorsqu'un grand nombre d'échantillons doivent être analysés, le spectrophotomètre pourrait servir à effectuer une première sélection des échantillons susceptibles d'être problématiques pour l'environnement. Cette technique pourrait également servir lors des essais de fertilisation ou encore pour mettre en évidence non pas une inhibition de croissance mais plutôt une stimulation.

Références

Ashour A. M-B. Gee J.S. et B.D. Hammock (1987). «Use of a 96-well microplate reader for measuring routine enzyme activities», *Analytical Biochemistry*, 166 : 353-360.

Blaise C., R. Legault, N. Bermingham et R. Van Coillie (1986). «A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment», *Toxicity Assessement : An International Quaterly*, 1 : 261 - 281.

B.A.R. Environmental (1990). *Report on industrial effluent testing by the algal microplate assay*. Gelph, Ontario, Version préliminaire.

Environnement Canada (1992). *Méthode d'essai biologique: essai d'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce* Selenastrum capricornutum. Rapport SPE 1/RM/25.

Environnement Canada (1993). *Procédure de contrôle de la qualité; test d'inhibition de la croissance en microplaque avec l'algue verte* Selenastrum capricornutum. Version 1.0.

Environnement Canada (1993). *Procédure opératoire normalisée; Initiation de l'essai de toxicité avec* Selenastrum capricornutum; effluents industriel. PON n° AQ-ALE-931125-1.

Environnement Canada (1993). *Procédure opératoire normalisée; Initiation de l'essai de toxicité avec* Selenastrum capricornutum; *toxique de référence*. PON n° AQ-ALT-931130-1.

Environnement Canada (1993). *Procédure opératoire normalisée; Suivi des conditions de pH en microplaque*. PON n° AQ-ALP-931209-1.

Environnement Canada (1993). *Procédure opératoire normalisée; Suivi de la croissance en microplaque*. PON n° AQ-ALS-931209-1.

Flow Laboratories (1988). *Multiskan MCC/340 MK II Operating Instructions*. Flow Laboratories inc., Mississauga, Ontario.

Nyholm N. et T. Källqvist (1989). «Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae», *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 : 689-703.

Snedecor G.W. et W.G. Cochran (1984). *Méthodes statistiques*. Association de coordination et technique agricole, sixième édition, Paris.

ANNEXE 1

Résultats du spectre d'absorption d'une suspension de *Selenastrum capricornutum*

Longueur d'onde (nm)	Densité optique	Longueur d'onde (nm)	Densité optique
350	0,1492	550	0,1255
360	0,1477	560	0,1214
370	0,1501	570	0,1200
380	0,1494	580	0,1196
390	0,1494	590	0,1155
400	0,1480	600	0,1140
410	0,1512	610	0,1139
420	0,1560	620	0,1132
430	0,1545	630	0,1125
440	0,1565	640	0,1112
450	0,1568	650	0,1095
460	0,1552	660	0,1132
470	0,1551	670	0,1192
480	0,1529	680	0,1276
490	0,1528	690	0,1233
500	0,1488	700	0,1123
510	0,1376	710	0,1057
520	0,1324	720	0,1031
530	0,1302	730	0,1004
540	0,1283	740	0,0983

ANNEXE 2

Comparaison statistique des pourcentages d'inhibition obtenus lors des essais de toxicité avec le nettoyant en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration cellulaire (compteur de particules versus la spectrophotométrie)

Méthode d'évaluation de la concentration des algues	Essai n°	t calculé	P calculé	$t_{0,05}$ de la table de Student
Essai standard				
D.O. 430 nm	1	6,9	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond rond	2	10,3	< 0,0001	2,045
	3	12,0	< 0,0001	2,045
D.O. 450 nm	1	5,8	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond rond	2	9,0	< 0,0001	2,045
	3	12,1	< 0,0001	2,045
D.O. 430 nm	1	8,0	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond plat,	2	11,7	< 0,0001	2,045
contenu transféré	3	10,3	< 0,0001	2,045
D.O. 450 nm	1	6,3	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond plat,	2	11,2	< 0,0001	2,045
contenu tranféré	3	10,2	< 0,0001	2,045
Essai modifié				
D.O. 430 nm	1	5,1	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond rond	2	4,8	< 0,0001	2,045
	3	8,4	< 0,0001	2,045
D.O. 450 nm	1	4,4	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond rond	2	4,9	< 0,0001	2,045
	3	6,5	< 0,0001	2,045
D.O. 430 nm	1	8,4	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond plat,	2	13,1	< 0,0001	2,045
contenu transféré	3	8,1	< 0,0001	2,045
D.O. 450 nm	1	11,0	< 0,0001	2,045
Microplaque avec puits à fond plat,	2	13,9	< 0,0001	2,045
contenu transféré	3	5,4	< 0,0001	2,045

ANNEXE 3

Comparaison statistique des pourcentages d'inhibition obtenus lors des essais de toxicité avec l'effluent industriel du secteur de la métallurgie en fonction de la méthode d'évaluation de la concentration cellulaire (compteur de particules versus la spectrophotométrie)

Méthode d'évaluation de la concentration des algues	Essai n°	t calculé	P calculé	$t_{0,05}$ de la table de Student
Essai standard				
D.O. 430 nm	1	4,3	0,0002	2,056
Microplaque avec puits à fond rond	2	8,0	< 0,0001	2,056
D.O. 450 nm	1	4,3	0,0002	2,056
Microplaque avec puits à fond rond	2	5,1	< 0,0001	2,056
D.O. 430 nm	1	3,1	0,0351	2,056
Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	2	5,7	< 0,0001	2,056
D.O. 450 nm	1	3,1	0,0331	2,056
Microplaque avec puits à fond plat, contenu tranféré	2	3,8	0,0008	2,056
Essai modifié				
D.O. 430 nm	1	6,0	< 0,0001	2,056
Microplaque avec puits à fond rond	2	8,2	< 0,0001	2,056
D.O. 450 nm	1	5,6	< 0,0001	2,056
Microplaque avec puits à fond rond	2	8,0	< 0,0001	2,056
				2,056
D.O. 430 nm	1	7,2	< 0,0001	2,056
Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	2	6,4	< 0,0001	2,056
				2,056
D.O. 450 nm	1	7,8	< 0,0001	2,056
Microplaque avec puits à fond plat, contenu transféré	2	7,9	< 0,0001	2,056