

Contrat 37SS.KE102-0-0182
(février-décembre 1981)

pour
ENVIRONNEMENT CANADA
et
MINISTÈRE DES APPROVISIONNEMENTS ET SERVICES
DU CANADA

MISE AU POINT D'UNE EVALUATION
RAPIDE DE LA TOXICITE ORIGINALE
DES EFFLUENTS ET DE LEURS
COMPOSANTES A L'AIDE D'ALGUES

préparé par

R. Van Coillie*, P. Couture**, R. Schoenert* et C. Thellen*

* Eco-Recherches Inc. (filiale de C-I-L Inc.)

** Institut National de la Recherche Scientifique (INRS-Eau),
Université du Québec.

Mars 1982

Environnement Canada / Environment Canada
Bibliothèque Montréal Library
105, rue McGill
Montréal (Québec) H2Y 2E7
Tél. / Tel. (514) 283-9503

RESUME

L'étude a expérimenté, dans cinq programmes d'activités, les possibilités et limites de l'emploi des algues unicellulaires vertes en toxicologie aquatique.

- 1- Les bioessais d'inhibition de croissance de 7-14 jours avec *Selenastrum capricornutum* sont plus sensibles aux composés toxiques que les bioessais d'inhibition de mobilité de 24 heures avec *Chlamydomonas variabilis* ; les seconds peuvent servir comme tests préliminaires pour ensuite préciser la toxicité avec les premiers. Par ailleurs, il y a une variation "inter-souche" de sensibilité qui se révèle plus élevée pour l'inhibition de la croissance de *S. capricornutum* après 7-14 jours que pour l'inhibition de la mobilité de *Chlamydomonas variabilis* après 24 heures.
- 2- Le délai de réponse de *S. capricornutum* à un produit toxique peut être raccourci de 7-14 jours à 1-4 jours si on choisit les paramètres de la fluorescence, l'assimilation du ^{14}C ou l'ATP (Adénosine Triphosphate) plutôt que celui de la croissance; avec la fluorescence entre autres, on obtient des réponses très rapides et très différenciées.
- 3- Les tests avec *S. capricornutum* et d'autres espèces d'algues permettent de préciser la toxicité originale des effluents et ses changements avec plus de sensibilité que les bioessais létaux avec les truites *Salmo gairdneri*.
- 4- Les toxicités des différentes fractions d'un effluent se différencient bien avec *S. capricornutum*, notamment au niveau de la fluorescence.

5- L'utilisation de *S. capricornutum* peut être envisagée pour des tests de mutagénicité vu que des composés mutagènes reconnus provoquent un déroulement de l'algue qui persiste ultérieurement en milieu normal.

Ces diverses données indiquent que les algues unicellulaires vertes peuvent représenter des indicateurs très polyvalents et sensibles en toxicologie aquatique.

ABSTRACT

The possibilities and limitations of using unicellular green algae in aquatic toxicology were studied in five experimental programs.

- 1- Growth inhibition bioassays of 7-14 days using *Selenastrum capricornutum* are more sensitive to toxic components than mobility inhibition bioassays of 24 hours using *Chlamydomonas variabilis*; the latter tests could serve as preliminary tests to be followed by growth inhibition bioassays to accurately determine the toxicity. Besides, there is a variation in sensitivity amongst different strains of the species which is more evident in the growth inhibition of *S. capricornutum* after 7-14 days, than for the inhibition of mobility of *C. variabilis* after 24 hours.
- 2- The delay in response of *S. capricornutum* to a toxicant may be shortened to 1-4 days from 7-14 days if the parameters of fluorescence, ^{14}C assimilation or ATP (Adenosine Triphosphate) are substituted for that of growth; with fluorescence, for example, responses are very rapid and well differentiated.
- 3- Tests using *S. capricornutum* and other species of algae can be used to determine the original toxicity of effluents and their changes with more sensitivity than lethal bioassays using rainbow trout, *Salmo gairdneri*
- 4- The toxicities of different fractions of an effluent can be differentiated well with *S. capricornutum*, particularly in the case of fluorescence.

5- The use of *S. capricornutum* for tests of mutagenicity might be proposed considering that known mutagenic components induce an unrolling of the algae which persists under normal conditions.

The collected data indicate that unicellular green algae could serve as versatile and sensitive indicator organisms in aquatic toxicology.

EQUIPE DE TRAVAIL

Direction du projet : R. Van Coillie, Ph.D.
Directeur des services biologiques
à Eco-Recherches*

Co-direction du projet : P. Campbell, Ph.D.
Directeur de l'INRS-Eau**

Supervision scientifique: N. Bermingham,
Environnement Canada,
Services de Protection de l'Environnement
1001 Avenue Pierre Dupuy,
Longueuil, Québec
J4K 1A1

Supervision de dotation scientifique:

J.T. Cole
Ministère des Approvisionnements et
Services,
Direction de l'Approvisionnement
Scientifique,
1201 Place du Portage,
11 rue Laurier,
Hull, Québec
K1A 0S5

* Eco-Recherches Inc. (filiale de C-I-L Inc.)

- Coordination : C. Thellen, biologiste
Responsable de la section écotoxicologie
: R. Schoenert, biologiste
Responsable opérationnel du projet
- Travaux biologiques : P. Benoit, technicien
: C. Cadieux, biologiste
: L. McLaughlin, biologiste
: L. Plouffe, technicienne
: R. Roy, biologiste

- Travaux chimiques : L. Dehelean, technicienne
 - : J. P. Fiset, chimiste
 - Responsable de la section chimie de l'eau
 - : G. Martinez, technicienne
 - : E. Soarec, technicienne
- Travaux statistiques : Y. Roy, biologiste
 - : N. St-Louis, biologiste
 - Responsable de la section traitement des données
- Secrétariat et graphisme: R. Tridemy, technicien
 - : D. Richardt, secrétaire
 - : F. Viau, responsable du secrétariat

** Institut National de la Recherche Scientifique: INRS-Eau
(Université du Québec)

- Coordination : P. Couture, Ph.D.
Professeur
- Travaux biologiques : M. Bordeleau, technicienne
 - : P. Bourget, technicien
 - : G. Guay Correau, technicienne
 - : B. Veilleux, technicien
- Travail de calibration : P. Boisvert, technicien

* Eco-Recherches Inc. (filiale de C-I-L Inc.), 121 boulevard Hymus,
Pointe Claire, Québec, H9R 1E6 (Tél.: (514) 697-3273)

** Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Eau,
(Université du Québec), Complexe Scientifique du Québec,
2700 rue Einstein, Sainte-Foy, Québec, G1V 4C7
(Tél.: (418) 657-2522)

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
LISTE DES FIGURES	i
LISTE DES TABLEAUX	vi
A. INTRODUCTION	1
B. METHODES UTILISEES	4
1) Nettoyage de la verrerie	4
2) Milieu minéral de culture	5
3) Entretien des souches d'algues	6
4) Incubation en laboratoire	7
5) Tests de mobilité	9
6) Détermination de la croissance par dénombrement ...	10
7) Mesure de la fluorescence	13
8) Assimilation du carbone	15
9) Dosage d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate)	16
10) Présentation des données	18
C. ACTIVITES ET RESULTATS	21
1. PROGRAMME 1 D'ACTIVITES: Evaluation de la sensibilité des algues à des composés toxiques de référence	22
a) Objectifs	23
b) Problématique	23
c) Protocole expérimental	23
d) Résultats	24
e) Interprétation	30

TABLE DES MATIERES (suite)

	<u>Page</u>
2. PROGRAMME 2 D'ACTIVITES: Evaluation rapide de la toxicité avec des algues	60
a) Objectifs	61
b) Problématique	61
c) Protocole expérimental	62
d) Résultats	63
e) Interprétation	68
3. PROGRAMME 3 D'ACTIVITES: Evaluation de la toxicité originale des effluents et de ses changements ultérieurs avec des algues.....	77
a) Objectifs	78
b) Problématique	78
c) Protocole expérimental	79
d) Résultats	80
e) Interprétation	84
4. PROGRAMME 4 D'ACTIVITES: Evaluation de la toxicité d'un effluent et de ses principales composantes au moyen de bio-essais avec des algues.....	98
a) Objectifs	99
b) Problématique	99
c) Protocole expérimental	99
d) Résultats	101
e) Interprétation	103

TABLE DES MATIERES (suite)

	<u>Page</u>
5. PROGRAMME ADDITIONNEL 5 D'ACTIVITES:	
Evaluation de la possibilité de tests de mutagénicité avec des algues	110
a) Objectifs	111
b) Problématique	111
c) Protocole expérimental	112
d) Résultats	113
e) Interprétation	114
D. CONCLUSIONS.....	121
E. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	124

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
 PROGRAMME 1 D'ACTIVITES	
Figure 1.1 - Schéma du protocole expérimental utilisé lors de la réalisation du programme no 1.	35
Figure 1.2 - Inhibition de la croissance des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> exposées au phénol	36
Figure 1.3 - Inhibition de la croissance des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> exposées au lauryl sulfate de sodium	37
Figure 1.4 - Inhibition de la croissance des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> exposées à l'azide de sodium	38
Figure 1.5 - Inhibition de la croissance des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> exposées au dichromate de potassium	39
Figure 1.6 - Inhibition de la croissance des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> exposées au nitrate de cadmium	40
Figure 1.7 - Inhibition de la croissance des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> exposées au sulfate de cuivre	41
Figure 1.8 - Variations des CI50-14 j. par rapport à leur moyenne pour des composés organiques en fonction des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i>	42
Figure 1.9 - Variations des CI50-14 j. par rapport à leur moyenne pour des composés inorganiques en fonction des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i>	43
Figure 1.10 - Variations des croissances des témoins par rapport à leur moyenne en fonction des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i>	44

LISTE DES FIGURES (suite)

		<u>Page</u>
Figure 1.11	- Variations des croissances des témoins par rapport à leur moyenne en fonction des souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> (suite)	45
Figure 1.12	- Inhibition de la mobilité des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i> exposées au phénol	46
Figure 1.13	- Inhibition de la mobilité des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i> exposées au lauryl de sodium	47
Figure 1.14	- Inhibition de la mobilité des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i> exposées à l'azide de sodium	48
Figure 1.15	- Inhibition de la mobilité des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i> exposées au dichromate de potassium	49
Figure 1.16	- Inhibition de la mobilité des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i> exposées au nitrate de cadmium	50
Figure 1.17	- Inhibition de la mobilité des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i> exposées au sulfate de cuivre	51
Figure 1.18	- Variations des CI50-24 h. par rapport à leur moyenne pour des composés organiques en fonction des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i>	52
Figure 1.19	- Variations des CI50-24 h. par rapport à leur moyenne pour des composés inorganiques en fonction des souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i>	53

LISTE DES FIGURES (suite)

	<u>Page</u>
 PROGRAMME 2 D'ACTIVITES	
Figure 2.1 - Schéma du protocole expérimental utilisé lors de la réalisation du programme no 2...	72
Figure 2.2 - Effet inhibiteur du sulfate de cuivre sur la croissance, l'ATP, la fluorescence et l'assimilation de $^{14}\text{CO}_2$ chez <i>Selenastrum capricornutum</i>	73
Figure 2.3 - Détection de la toxicité d'un effluent après 1 et 4 jours d'incubation chez <i>Selenastrum capricornutum</i> à l'aide du dénombrement de croissance et de la fluorescence	74
 PROGRAMME 3 D'ACTIVITES	
Figure 3.1 - Schéma du protocole expérimental utilisé lors de la réalisation du programme no 3...	89
Figure 3.2 - Valeurs des CI50-14 j. de l'effluent de l'usine 1 en fonction de la durée et de la température de conservation des échantillons pour <i>Chlamydomonas variabilis</i> et <i>Selenastrum capricornutum</i>	90
Figure 3.3 - Valeurs des CI50-14 j. de l'effluent de l'usine 1 en fonction du traitement des échantillons pour <i>Chlamydomonas variabilis</i> et <i>Selenastrum capricornutum</i>	91
Figure 3.4 - Valeurs des CI50-14 j. de l'effluent de l'usine 2 en fonction de la durée et de la température de conservation des échantillons pour <i>Chlamydomonas variabilis</i> et <i>Selenastrum capricornutum</i>	92
Figure 3.5 - Valeurs des CI50-14 j. de l'effluent de l'usine 2 en fonction du traitement des échantillons pour <i>Chlamydomonas variabilis</i> et <i>Selenastrum capricornutum</i>	93

LISTE DES FIGURES (suite)

	<u>Page</u>
Figure 3.6 - Valeurs des LC50-96 h. de l'effluent de l'usine 2 en fonction de la durée et de la température de conservation des échantillons pour la truite arc-en-ciel	94
Figure 3.7 - Valeurs des LC50-96 h. de l'effluent de l'usine 2 en fonction du traitement des échantillons pour la truite arc-en-ciel ...	95
 PROGRAMME 4 D'ACTIVITES	
Figure 4.1 - Schéma du protocole expérimental utilisé lors de la réalisation du programme no 4 ..	105
Figure 4.2 - Inhibition de la croissance, fluorescence et assimilation de $^{14}\text{CO}_2$ chez <i>Selenastrum capricornutum</i> exposé à l'effluent original et synthétique de l'usine 3	106
Figure 4.3 - Inhibition de la croissance, de la fluorescence et de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ chez <i>Selenastrum capricornutum</i> exposé à des fractions de l'effluent de l'usine 3.....	107
Figure 4.4 - Regroupement statistique des résultats obtenus chez <i>Selenastrum capricornutum</i> exposé à des fractions de l'effluent de l'usine 3.....	108
 PROGRAMME ADDITIONNEL 5 D'ACTIVITES	
Figure 5.1 - Schéma du protocole expérimental utilisé lors de la réalisation du programme no 5...	115
Figure 5.2 - Inhibition de la croissance de <i>Selenastrum capricornutum</i> exposé à des polyélectrolytes et à des agents mutagènes (phtalate de potassium et 5-fluoro-uracyle)	116

LISTE DES FIGURES (suite)

	<u>Page</u>
Figure 5.3 - Cellules de <i>Selenastrum capricornutum</i> après 14 jours d'incubation en con- ditions normales	117
Figure 5.4 - Cellules d'aspect normal et d'aspect déroulé chez <i>Selenastrum capricornutum</i> après 14 jours d'incubation avec 1 mg/l de 5 fluoro-uracyle	118
Figure 5.5 - Cellules d'aspect normal et d'aspect fusiforme chez <i>Selenastrum capricornutum</i> après 14 jours d'incubation avec 100 mg/l de phtalate de potassium	119

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
 PROGRAMME 1 D'ACTIVITES	
Tableau 1.1 - Provenance des différentes souches de <i>Selenastrum capricornutum</i> et <i>Chlamydomonas variabilis</i>	54
Tableau 1.2 - Croissances moyennes des différentes souches de <i>Selenastrum capricornutum</i>	55
Tableau 1.3 - Evaluation des CI50-14 j. des composés organiques avec les différentes souches de <i>Selenastrum capricornutum</i>	56
Tableau 1.4 - Evaluation des CI50-14 j. des composés inorganiques avec les différentes souches de <i>Selenastrum capricornutum</i>	57
Tableau 1.5 - Evaluation des CI50-24 h. des composés organiques avec les différentes souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i>	58
Tableau 1.6 - Evaluation des CI50-24 h. des composés inorganiques avec les différentes souches de <i>Chlamydomonas variabilis</i>	59
 PROGRAMME 2 D'ACTIVITES	
Tableau 2.1 - CI50 du sulfate de cuivre pour la croissance, l'assimilation de $^{14}\text{CO}_2$, l'ATP et la fluorescence chez <i>Selenastrum capricornutum</i>	75
Tableau 2.2 - Caractérisation chimique d'un effluent industriel après stérilisation et filtration	76

LISTE DES TABLEAUX (suite)

	<u>Page</u>
 PROGRAMME 3 D'ACTIVITES	
Tableau 3.1 - Résultats des analyses physico-chimiques et des bioessais de l'effluent de l'usine 1 en fonction de la durée et de la température d'entreposage des échantillons et en fonction du traitement de ceux-ci	96
Tableau 3.2 - Résultats des analyses physico-chimiques et des bioessais de l'effluent de l'usine 2 en fonction de la durée et de la température d'entreposage des échantillons et en fonction du traitement de ceux-ci ..	97
 PROGRAMME 4 D'ACTIVITES	
Tableau 4.1 - Caractérisation physico-chimique de l'effluent original de l'usine 3	109
 PROGRAMME ADDITIONNEL 5 D'ACTIVITES	
Tableau 5.1 - Déformations observées chez <i>Selenastrum capricornutum</i> après 14 jours d'incubation avec des polyélectrolytes et des agents mutagènes à des concentrations supérieures à leurs CI50-14 j.....	120

A. INTRODUCTION

La détérioration du milieu aquatique contraint les gestionnaires d'environnement à orienter des programmes d'études dans les domaines suivants:

- i) le contrôle qui vise à suivre les variations de la qualité du milieu;
- ii) la compréhension des mécanismes qui interviennent dans les processus de transformation du système aquatique.

Les efforts réalisés dans ces deux secteurs ont permis le développement de diverses méthodes utilisant des indicateurs biologiques et ont mis en évidence le rôle important des bioessais (Maciorowski et al, 1981). Conséquemment, des institutions aussi réputées que l' "American Public Health Association", l' "American Water Works Association" et le "Water Pollution Control Federation" reconnaissent aujourd'hui la nécessité des bioessais puisque les effets des polluants en écologie aquatique ne peuvent être uniquement déterminés par des paramètres chimiques ou physiques (APHA et al, 1980).

Dans cette optique, les bio-analyses effectuées avec des algues ont une signification primordiale. En effet, situées au premier maillon de la chaîne alimentaire, les algues sont considérées comme les piliers de l'organisation du biota aquatique de telle sorte que si leur croissance est inhibée, la biomasse des niveaux trophiques supérieurs en sera affectée.

D'ailleurs, depuis le symposium international portant sur "Experimental use of algal cultures in limnology" (SIL, 1978) où on a fait ressortir que les algues étaient des indicateurs

sensibles pour définir les effets (inhibitifs ou stimulateurs) des substances qui sont déversées dans l'environnement, on constate de plus en plus une ampleur des bio-analyses avec algues dans des programmes de contrôle de qualité du milieu aquatique (EPA, 1978; APHA et al, 1980).

Au Canada, durant ces dernières années, l'efficacité des tests biologiques avec algues et notamment de celui avec *Selenastrum capricornutum* a été vérifiée en montrant:

- a) l'influence des interventions humaines (urbanisation, agriculture et mise en eau d'un réservoir) sur le potentiel primaire du milieu aquatique, soit ses teneurs en substances bio-disponibles pour le phytoplancton (Couture et al, 1980a; Van Coillie et al, 1981b);
- b) la toxicité des fractions organique et/ou inorganique d'effluents et celle des métaux lourds et des pesticides (Joubert, 1980; Couture et al, 1980b et 1981).

Toutefois, les bioessais réalisés avec l'algue *Selenastrum capricornutum* présentent les trois inconvénients suivants:

- les possibilités de fluctuation de sensibilité entre les cultures utilisées sont très souvent peu connues;
- les temps de réponse varient entre 8 et 21 jours, ce qui s'avère un long délai pour connaître la toxicité d'un échantillon;
- les délais dus au transport et à l'entreposage de l'effluent ainsi que la stérilisation et la filtration des échantillons risquent de changer la toxicité originale.

Notre étude vise à réduire ces désavantages. A cette fin, les démarches suivantes ont été faites avec *Selenastrum capricornutum* et/ou *Chlamydomonas variabilis*:

- i) vérifier la sensibilité de plusieurs souches de même espèce à différents composés toxiques de référence;
- ii) tester des paramètres biochimiques simples (assimilation de $^{14}\text{CO}_2$, fluorescence *in vivo*, Adénosime Tri-Phosphate) pour déceler une toxicité après 24-72 heures;
- iii) préciser la toxicité originale d'un effluent et les effets de son transport, son entreposage, sa stérilisation et sa filtration sur cette toxicité et comparer les résultats acquis avec ceux obtenus en conditions similaires avec des poissons (*Salmo gairdneri*).

En outre, deux nouvelles possibilités d'application des bio-essais avec algues ont été expérimentées:

- iv) déterminer la toxicité fractionnée des principales composantes d'un effluent vis-à-vis de *Selenastrum capricornutum*;
- v) vérifier si cette espèce serait utilisable pour des tests de mutagénicité.

B. METHODES UTILISEES

Celles-ci seront présentées de manière assez "énumérative" afin d'éviter de longs textes techniques fastidieux à lire.

1. Nettoyage de la verrerie

- Lavage et brossage des fioles "Erlenmeyer" et autres pièces avec une solution chaude de Decon à 5%
- Rinçage avec eau du robinet et ensuite avec eau déionisée
- Trempage dans HCl 10% (V/V) ou dans HNO₃ 14% (V/V) pendant 30 à 180 minutes
- Rinçages répétés 7 fois à l'eau déminéralisée
- Séchage au four à 105° C
- Stérilisation à 121° C et 1,1 kg/cm² durant 15 à 30 minutes

N.B.: Les électrodes du pH-mètre et les couvercles des fioles "Erlenmeyer" étaient rincés à l'alcool éthylique et ensuite à l'eau déionisée et filtrée (Millipore 0,45 µm) avant leur utilisation.

2. Milieu minéral de culture

(i) Composition

Milieu AAP (EPA, 1971) sans EDTA et avec modifications* pour Zn, Co et Fe (Chiaudani et Vighi, 1978)

<u>Composé</u>	<u>Concentration initiale du composé</u>	<u>Elément</u>	<u>Concentration finale de l'élément</u>
MACRONUTRIENTS			
NaNO ₃	25,500 mg/l	N	4,200 mg/l
K ₂ HPO ₄	1,044 mg/l	P	0,186 mg/l
MgCl ₂	5,700 mg/l	Mg	2,904 mg/l
		S	1,911 mg/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	14,700 mg/l	C	2,143 mg/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	4,410 mg/l	Ca	1,202 mg/l
		Na	11,001 mg/l
NaHCO ₃	15,000 mg/l	K	0,469 mg/l
MICRONUTRIENTS			
HBO ₃	185,520 µg/l	B	32,460 µg/l
MnCl ₂	264,264 µg/l	Mn	115,374 µg/l
ZnCl ₂	0,334*µg/l	Zn	0,160*µg/l
CoCl ₂	0,154*µg/l	Co	0,070*µg/l
CuCl ₂	0,009 µg/l	Cu	0,004 µg/l
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	7,260 µg/l	Mo	2,878 µg/l
FeSO ₄ *	149,600*µg/l	Fe	55,000*µg/l

* Modifications adoptées par rapport au milieu AAP conventionnel (EPA, 1971) renfermant 32,709 µg/l en ZnCl₂, 0,780 µg/l en CoCl₂ et 96,000 µg/l en FeCl₃

(ii) Préparation

- Solutions "stock" 1000 fois plus concentrées:
 - . 6 pour les 6 premiers composés
 - . 1 pour les 6 composés suivants
 - . 1 pour FeSO₄
- Stérilisation durant 15-30 minutes à 121° C et 1,1 kg/cm² pour les:
 - . 6 premières solutions diluées 1000 fois et ensuite mélangées
 - . solution des 6 composés suivants
- Filtration (Millipore 0,22 µm) sous conditions stériles pour la solution de FeSO₄
- Mélange final en ajoutant 1 ml de chacune des deux dernières solutions dans 998 ml des 6 premières solutions mélangées

N.B.: Toutes les solutions et dilutions ont été faites avec une eau déionisée et filtrée (Millipore 0,45 µm).

3. Entretien des souches d'algues

- Espèces d'algues : *Chlamydomonas variabilis*
Selenastrum capricornutum
- Milieu de culture : AAP (voir B.2)
- Contenants : microcosmes en verre contenant 6,5 litres de culture

- pH : maintenu à $7,0 \pm 0,2$, grâce à des ajouts contrôlés de gaz carbonique CO_2
- Etat physiologique : cultures entretenues en phase exponentielle de croissance par remplacement quotidien de 2 à 3 litres de culture par de la solution AAP
- Eclairement : 5400 lux $\pm 10\%$
- Photopériode : 12 heures
- Température : $24^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$
- Agitation : continue avec barre magnétique

4. Incubation en laboratoire

- Conditions d'incubation:
 - . durée : 14 jours (ou moins dans certains cas)
 - . température : $24^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$
 - . agitation : 110 oscillations/minute
 - . éclairage : 5400 lux $\pm 10\%$
 - . photopériode : 16 heures de lumière
8 heures d'obscurité
- Contenants : fioles "Erlenmeyer" de 125 ml
- Volume total : 40 ml (ou plus dans certains cas)
- Quantité d'algues : 1000 cellules/ml (ou plus dans certains cas) en début d'incubation

- Milieu nutritif : AAP (voir B.2)
- Dilution du produit étudié:
 - . composé toxique simple: 5 concentrations décroissantes (ou plus dans certains cas) déterminées après des tests préliminaires (voir plus loin B.5)
 - . effluent: voir ci-après

Concentration Effluent	Volume Effluent	Volume Eau	Volume AAP*	Volume Algues**	Volume Total
90 %	36 ml	2 ml	1 ml	1 ml	40 ml
50 %	20 ml	18 ml	1 ml	1 ml	40 ml
10 %	4 ml	34 ml	1 ml	1 ml	40 ml
5 %	2 ml	36 ml	1 ml	1 ml	40 ml
0,5%	0,2 ml	37,8 ml	1 ml	1 ml	40 ml
Témoin	-	38 ml	1 ml	1 ml	40 ml

N.B.: Dans certains cas (voir C.2.c), on préfère un volume total de 100 ml avec les mêmes concentrations d'effluent, 1 ml de solution AAP à 62,5%* et 2 ml de volume d'algues (inoculum de 2,000,000 cellules).

- Triplicata des concentrations
- Vérifications intermittentes: observations de minimes parties de la culture au microscope durant l'incubation

* Milieu AAP concentré 25 fois, sa concentration étant alors équivalente à $25/40 = 62,5\%$

** Ce volume d'algues correspondait à un inoculum de 40,000 cellules

5. Tests de mobilité

(i) Tests préliminaires d'immobilisation

- Incubation de *Chlamydomonas variabilis* (500,000 cellules/ml) durant 24 heures dans des tubes à essais renfermant 10 ml de solution AAP avec le produit considéré à tester à différentes concentrations préliminaires
- Observation microscopique de la mobilité des cellules
- Classification de la mobilité observée:
 - . cote 0 : immobilité
 - . cote 1 : faible mobilité
 - . cote 2 : mobilité quelque peu amoindrie
 - . cote 3 : mobilité normale semblable à celle des témoins
- Cotation de chaque échantillon en triplicata et évaluation de la toxicité entre:

cote totale:0, soit 100% inhibition → concentration très toxique
 et du produit

cote totale:9, soit 0 % inhibition → concentration non toxique du produit

(ii) CI50 de mobilité
.....

Après avoir défini, à l'aide des tests préliminaires, la zone de concentrations où se situait la toxicité du produit étudié, on effectuait des tests analogues avec des teneurs en triplicata du produit comprises dans cette zone. Les résultats acquis étaient ensuite indiqués sur un graphique où figuraient le pourcentage d'inhibition en ordonnée et la concentration du produit en abscisse. Au moyen du programme "Probit" (Stefan, 1977), on pouvait finalement estimer la CI50-24 heures de mobilité, c'est-à-dire la concentration du produit provoquant 50% d'inhibition de la mobilité en 24 heures chez *Chlamydomonas variabilis*.

6. Détermination de la croissance par dénombrement

Après 14 jours (ou moins) d'incubation, les cellules présentes dans les cultures étaient dénombrées avec un compteur de particules ou un hématimètre.

(i) Compteur de particules
.....

- Utilisation limitative: échantillons stérilisés et filtrés avant l'incubation de manière à y éviter la présence et la prolifération d'autres microorganismes tels que des bactéries, fungi et algues (autres que celles qui sont étudiées) ainsi que des particules
- Type: "Coulter Counter", modèle B ou TA
- Fenêtre: 0,70 μm

- Solution de comptage: 1/20 échantillon
 19/20 isoton (1% NaCl + 0,1% NaN₃ dans eau filtrée avec Millipore 0,45 μm)
- Comptage en triplicata pour des portions de 0,5 ml
- Nombre d'algues/ml = 40 x dénombrement moyen des particules dans les triplicata - nombre de particules/ml dans échantillon sans algues

(ii) Hématimètre

- Utilisation : échantillons non stérilisés et/ou filtrés avant l'incubation, lesquels contenaient des microorganismes particulaires autres que les algues étudiées: pour distinguer celles-ci de ceux-là, un comptage microscopique était nécessaire.
- Type : "Neubauer" (American Optical Corporation)
- Chambre de comptage: carré de 9 mm² x 0,1 mm de profondeur = 0,90 μl
- Comptage en duplicata dans des quadrillages de 1 mm²

- Nombre d'algues/ml = 10^4 x dénombrement
moyen des algues dans les duplicata
- Remarques:
 - . Mobilité de *Chlamydomonas variabilis*
interrompue pour le comptage avec addition
de 1 μ l de formaldéhyde/ml d'échantillon
à analyser
 - . Agglomération de *Selenastrum capricornutum*
dispersée par l'addition de quelques
gouttes de détergent "Tween 80" lors du
comptage

(iii) CI50 de croissance
.....

- Détermination de la croissance de la culture
des algues en conditions normales
- Détermination de la croissance de la culture
des algues en présence de concentrations
différentes du produit étudié
- Pourcentages d'inhibition de croissance des
cultures pour les algues soumises à diverses
teneurs du produit étudié par rapport aux
algues placées en conditions-témoins
- Graphiques de ces teneurs en abscisse et de
ces pourcentages d'inhibition en ordonnée
- Estimation, à partir des graphiques précités et
avec le programme "Probit" (Stefan, 1977), des
CI50-14 jours (ou moins) de croissance, c'est-
à-dire des concentrations du produit étudié

occasionnant 50% de réduction de croissance en 14 jours (ou moins) chez *Selenastrum capricornutum* ou *Chlamydomonas variabilis*

7. Mesure de la fluorescence

Afin de détecter plus rapidement les effets toxiques de divers produits vis-à-vis des algues, on a fait appel à certains paramètres biochimiques qui changent plus rapidement que la croissance des cultures: la fluorescence est un de ces paramètres (Roy et Legendre, 1979).

A cette fin, on utilise depuis peu le DCMU (3, 4 Di-Chloro-phenyl - 1,1 di-Méthyle-Urée), herbicide qui bloque le transfert des électrons au niveau du cytochrome B-559 peu avant le photosystème II du complexe chlorophyllien (Cramer, 1977). Ce composé inhibe ainsi le transfert de l'énergie issue de la photoexcitation vers la phosphorylation oxydative des ATP (Adenosine Tri-Phosphate), ce qui accroît indirectement la fluorescence. Cette hausse (Δ) de fluorescence (F_{DCMU}^{-F}) dépend de l'état physiologique de la chlorophylle et traduit ainsi la capacité de celle-ci à soutenir *in vivo* la photosynthèse; des conditions défavorables ou toxiques affectent la chlorophylle et subséquemment sa Δ fluorescence F_{DCMU}^{-F} (Samuelsson et Oquist, 1977).

(i) Tests préliminaires de fluorescence

- Incubation de *Selenastrum capricornutum* (20000 cellules/mL) durant 24 heures dans des fioles "Erlenmeyer" renfermant 40 ml de solution AAP avec le composé à tester à différentes concentrations préliminaires

- Mesure de la fluorescence F en triplicata pour des échantillons de 5 ml avec un spectrofluorimètre "Turner Associates"
- Addition de 100 μ l de DCMU (solution de 5,8 mg DCMU/100 ml éthanol) aux échantillons de 5 ml
- Délai de 5 minutes
- Mesure en triplicata de la fluorescence F_{DCMU} des échantillons
- Détermination du Δ fluorescence $F_{DCMU} - F$

(ii) CI50 de fluorescence
.....

Les concentrations auxquelles se manifestait la toxicité du produit considéré ayant été précisées lors des tests préliminaires, on adoptait ces concentrations en triplicata pour des incubations de *Selenastrum capricornutum* (4000 ou 20000 cellules/ml dans 100 ml selon qu'on testait un produit simple ou un effluent) pendant 1 à 7 jours après lesquels on déterminait le Δ fluorescence $F_{DCMU} - F$. En comparant les valeurs de ce paramètre avec celles obtenues pour celui-ci dans les cultures-témoins, on établissait des pourcentages d'inhibition du Δ fluorescence pour les différents teneurs du produit testé et on estimait ensuite, par programme "Probit" (Stefan, 1977), des CI50 1 à 7 jours de fluorescence, à savoir les concentrations qui inhibent la fluorescence à 50% après 1 à 7 jours chez *Selenastrum capricornutum*.

8. Assimilation du carbone

Pour quantifier l'assimilation du carbone lors de la photosynthèse, on utilise de plus en plus le radiocarbone sous forme de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$; la technique adoptée à cette fin dans notre étude a été mise au point à partir des méthodes préconisant l'emploi du ^{14}C pour l'étude des potentiels autotrophes (Campbell et al, 1976). Après des tests préliminaires de fluorescence (voir B.7 i), le protocole suivant fut appliqué:

- Incubation de *Selenastrum capricornutum* (4000 à 20000 cellules/ml dans 100 ml selon qu'on testait un produit simple ou un effluent) durant 1 à 7 jours en présence de différentes concentrations en triplicata du produit étudié.
- Ajout de 100 μl de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, soit 0,2 μCi de radioactivité, à des échantillons de 5 ml des cultures
- Délai de 10 minutes
- Addition de 100 μl de formaldéhyde et de 100 μl de HCl N aux échantillons pour y provoquer respectivement l'arrêt d'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ par les algues et le dégagement gazeux du $^{14}\text{CO}_2$ non assimilé
- Exposition des échantillons à une lumière intense durant 20 heures pour y dégrader la chlorophylle et ainsi réduire le "quenching" dû à celle-ci lors du radiocomptage

- Addition de 10 ml d'Aquasol-2 (New England Nuclear, Boston, USA) aux échantillons
- Radiocomptage de ceux-ci en triplicata dans un compteur à scintillation LKB Rack beta et corrections occasionnées par le "quenching" et les autres fluorescences à scintillation
- Comparaison des valeurs cpm (coups par minute) obtenues pour les échantillons contenant différentes concentrations du produit étudié avec celles acquises pour les échantillons-témoins et détermination des pourcentages d'inhibition de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$
- Estimation, à l'aide du programme "Probit" (Stefan, 1977), des CI50 1 à 7 jours d'assimilation du carbone, soit les concentrations des produits qui provoquent 50% d'inhibition de l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ après 1 à 7 jours chez *Selenastrum capricornutum*

9. Dosage de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate)

La méthode d'extraction de l'ATP avec DMSO (Di-Méthyl Sulfoxide) et de son dosage ultérieur par bio-luminescence a été développée avec des bactéries (Jakubczak et Leclerc, 1980). Elle a été adaptée aux algues lors de notre étude. Après des tests préliminaires de fluorescence (voir B.7 i), on suivait les étapes suivantes:

- Incubation de *Selenastrum capricornutum* (4000 ou 20000 cellules/ml dans 100 ml selon qu'on testait un produit simple ou un effluent) pendant 1 à 14 jours avec des teneurs en triplicata du produit étudié

- Filtration d'échantillons (1, 2, 5 ou 10 ml) sur une membrane Millipore 0,45 µm
- Dissolution du filtrat et de la membrane dans 2,4 ml de DMSO (Di-Méthyle Sulfoxyde 14 M, Fischer Co.) et brève agitation au Vortex en conditions stériles
- Ajout de 3,6 ml de tampon MOPS (4-Morpholino-Propyl-Sulfonate Aldrich Chemical Co. 0,2%, NaOH 0,03% et MgSO₄ 0,006%) à pH 7,4 et brève agitation au Vortex en conditions stériles
- Conservation à -20° C jusqu'au dosage de l'ATP et centrifugation à 2500 tours/minute durant 10 minutes avant le dosage
- Mélange de 300 µl de la solution à doser avec 500 µl du complexe luciférine-luciférase de mouches à feu (Produit Sigma FLE 250) dissous à 3% dans du tampon MOPS
- Mesure en duplicata de la bioluminescence émise par ce mélange pendant 60 secondes avec un ATP-photomètre JRB Modèle 2000 et soustraction du bruit de fond


- Comparaison de cette mesure avec celles d'étalons d'ATP (0,5; 1,5; 3,0; 8,0; 20,0 et 50,0 µg ATP/l en tampon MOPS)
- Normalisation des résultats en µg ATP/ml d'échantillon
- Comparaison des concentrations en ATP des échantillons ayant diverses teneurs du produit étudié avec celles des échantillons-témoins, ce qui fournit des pourcentages d'inhibition du paramètre ATP
- Estimation, par procédé "Probit" (Stefan, 1977), des CI50 1 à 14 jours d'ATP, lesquels sont les concentrations des produits qui causent 50% d'inhibition de la synthèse des ATP après 1 à 14 jours chez *Selenastrum capricornutum*

10. Présentation des données

Celles-ci ont été notées dans plusieurs cahiers de laboratoire disponibles sur demande. Nous avons envisagé de les annexer au présent rapport mais, vu que leur nombre est très élevé, l'annexe aurait été disproportionnée vis-à-vis du rapport et l'essentiel de celui-ci aurait alors paru secondaire. Nous avons plutôt opté pour un regroupement graduel des données par mesure, échantillon et distribution d'échantillons par produit ou paramètre étudié successivement.

Au niveau des mesures faites généralement en triplicata pour chaque échantillon (seuls, le comptage à l'hématimètre et l' "ATP-photométrie" furent réalisés en duplicata

à cause de contraintes de temps), le coefficient de variation des valeurs n'excédait pas 15% de la moyenne de celles-ci. Lorsqu'un résultat de mesure différait sensiblement des autres pour le même échantillon, on effectuait une nouvelle mesure de vérification. Les variations des résultats des mesures par échantillon ont donc été minimales et, subséquemment, ne sont pas mentionnées dans ce rapport.

Au niveau des échantillons en triplicata par concentration étudiée, l'étendue de dispersion des résultats (écart entre valeur maximale et valeur minimale dans le triplicata) était généralement faible. Toutefois, dans certains cas, ces étendues de dispersion furent assez élevées. Dans ces conditions, la présentation de ces données de dispersion s'avère nécessaire dans le présent rapport; ceci a été fait dans ses diverses figures sous la forme conventionnelle prévue à cette fin, à savoir  où le point équivalait à la moyenne des résultats du triplicata.

A partir de la distribution des résultats des différents triplicata d'échantillons, on a estimé des CI50 (voir B.5 à B.9) avec leurs limites de confiance (P: 0,05 pour une distribution logarithmique). Ces CI50 sont indiquées dans des tableaux et leurs limites de confiance y sont mentionnées entre parenthèses.

Au niveau des produits ou paramètres étudiés, nous avons choisi la présentation graphique des résultats lorsque ceci était possible afin de pouvoir mieux faire ressortir les différences, ce qui explique que notre rapport contienne plus de figures que de tableaux.

Ajoutons aussi que, faute de disposer d'autres méthodes mathématiques plus adéquates, le programme "Probit" préconisé pour les bioessais avec poissons (Stefan, 1977) a été adapté à nos tests avec les algues d'autant plus que ceux-ci devaient parfois être comparés avec des tests réalisés avec la truite arc-en-ciel (voir C.3.c et d). Une méthodologie mathématique plus appropriée aux bioessais avec algues ne semble pas exister, du moins à notre connaissance, et mériterait dès lors d'être développée pour l'utilisation des algues en écotoxicologie aquatique sous-létale. Signalons toutefois qu'une approche par régression non linéaire vient d'être essayée dans ce domaine et semble prometteuse (Kooijman et al, 1982).

Un terminal "DecWriter III" relié à un ordinateur "Cyber 73 de Multiple Access" a été utilisé pour le programme "Probit" et pour les analyses statistiques conventionnelles (limites de confiance, comparaisons multiples des moyennes, etc...), lesquelles avaient été choisies dans les ouvrages de Zar (1974) et de Nie et al (1975).

C. ACTIVITES ET RESULTATS

Ceux-ci sont regroupés, présentés et discutés dans cinq programmes d'activités qui visent à répondre aux cinq préoccupations mentionnées dans l'introduction (voir A.), lesquelles seront précisées sous forme d'objectifs et de problématique pour chacun de ces programmes.

1. PROGRAMME 1 D'ACTIVITES: Evaluation de la sensibilité
des algues à des composés
toxiques de référence

a) Objectifs
.....

- . Préciser la sensibilité des algues *Selenastrum capricornutum* et *Chlamydomonas variabilis* à des produits considérés comme toxiques de référence
- . Vérifier si la sensibilité à ces produits varie avec les différentes souches de ces algues

b) Problématique
.....

De plus en plus, l'emploi de composés toxiques de référence devient nécessaire pour vérifier la sensibilité des organismes utilisés dans les bioessais. Bien que ceci ne soit pas encore exigé, on le recommande au Canada pour les tests de toxicité réalisés avec des truites (Klaverkamp et al, 1975; Pessah et al, 1975; Environnement Canada, 1977a) et, en France, pour des tests de toxicité effectués avec les daphnies (AFNOR, 1974). A notre connaissance, aucune démarche n'a encore été faite dans ce sens pour les bioessais avec algues.

Le premier programme d'activités visa dès lors à comparer la sensibilité de plusieurs souches de *Selenastrum capricornutum* et de *Chlamydomonas variabilis* à des composés recommandés comme toxiques de référence pour les bioessais.

c) Protocole expérimental
.....

On obtint 6 souches pour la première espèce et 3 souches pour la seconde: la provenance de ces souches est stipulée au tableau 1.1. Dès réception à nos laboratoires, chaque souche a été centrifugée, lavée avec 15 mg NaHCO₃/l et incubée en milieu AAP; on attendait ensuite que plusieurs générations se soient succédées avant de l'utiliser.

Comme composés toxiques de référence, on a choisi deux produits organiques recommandés par Klaverkamp et al. (1975) et par Pessah et al. (1975) oeuvrant à Environnement Canada, à savoir le phénol et le lauryl sulfate de sodium (LSS) analogue au dodécyl sulfate de sodium (DSS). Pour les produits inorganiques, on opta pour le dichromate de potassium recommandé par AFNOR (1974), l'azide de sodium préconisé par Klaverkamp et al. (1975) ainsi que le nitrate de cadmium et le sulfate de cuivre utilisés par Chiaudani et Vighi (1978).

Les différentes étapes suivies pour la réalisation des bioessais dans le programme d'activités sont schématisées à la figure 1.1. En résumé, la mesure de la toxicité a d'abord été effectuée pour chacun des 6 produits chez les 3 souches de *Chlamydomonas variabilis* selon le critère de la mobilité après 24 heures (Cabrédenc, 1979); ceci permettait de préciser le palier de concentrations auquel chaque produit devenait toxique. Ensuite, la mesure de la toxicité des 6 produits était faite chez les 6 souches de *Selenastrum capricornutum* selon le critère de la croissance après 14 jours d'incubation (EPA, 1978). Les techniques adoptées pour les deux critères précités sont décrites en détail aux sections B. 5 et 6.

d) Résultats

(i) Souches de *Selenastrum capricornutum*

Les résultats du dénombrement cellulaire moyen obtenus avec les six souches de *Selenastrum capricornutum* après 14 jours d'incubation en milieu normal de croissance sont présentés au tableau 1.2. La croissance moyenne de ces

témoins varie entre $4,91 \times 10^6$ cellules/ml pour la souche INRS et $6,29 \times 10^6$ cellules/ml pour la souche UQAM avec une moyenne globale de $5,46 \times 10^6$ cellules/ml; le coefficient de variation des croissances moyennes des souches se situe entre 8% (souche CCIW) et 25% (souche UQAM) et celui de la croissance moyenne globale équivaut à 20%.

La sensibilité des 6 souches aux 6 produits testés est illustrée aux figures 1.2 à 1.7. Les valeurs de CI50-14j de chaque produit pour chaque souche sont mentionnées sur ces figures et sont regroupées aux tableaux 1.3 et 1.4.

La CI50-14j moyenne du phénol se situe à 10,9 mg/l et le coefficient de variation de cette moyenne, lequel traduit "LA DISPERSION MOYENNE DE SENSIBILITE" des souches au phénol se chiffre à près de 46%. Pour le lauryl sulfate de sodium (LSS), la CI50-14j équivaut en moyenne à 9,4 mg/l pour les 6 souches et leur dispersion moyenne de sensibilité atteint 41%.

Afin de visualiser les différences de réponse entre les 6 souches vis-à-vis de chacun des 2 produits organiques précités, on présente la figure 1.8 qui illustre les différences entre leurs CI50-14j pour chaque souche et leur CI50-14j moyenne pour les 6 souches sous forme d'écart à la moyenne exprimés en pourcentages; ces écarts équivalent à $100 \times (\text{CI50-14j pour la souche considérée} - \text{CI50-14j moyenne pour les 6 souches})$ en valeurs absolues: CI50-14j moyenne pour les 6 souches. De tels écarts qu'on pourrait appeler "ECARTS DE VARIATION DES SOUCHES" s'étendent de 10% à 70% pour le phénol et de 5% à 60% pour le lauryl sulfate de sodium .

En ce qui concerne les produits inorganiques testés, soit l'azide de sodium (Na N_3), Cr, Cd et Cu, leurs CI50-14j moyennes par rapport aux 6 souches correspondent à 671 $\mu\text{g/l}$, 178 $\mu\text{g/l}$, 15 $\mu\text{g/l}$ et 14 $\mu\text{g/l}$ respectivement. La dispersion moyenne de sensibilité des 6 souches aux 4 produits stipulés (coefficient de variation des CI50-14j moyennes de ceux-ci) est de 23%, 71%, 71% et 38% successivement.

Les "écarts de variation des souches" vis-à-vis de chacun des 4 produits inorganiques sont représentés à la figure 1.9. Ils se situent entre 5% et 40% pour l'azide de sodium; ils sont beaucoup plus élevés pour Cr, Cd et Cu et dépassent même 80% dans trois cas (81% chez la souche INRS pour Cd, 117% chez la souche Env. Qué. pour Cd et 117% chez la souche CCIW pour Cr.

Nous avons cherché à vérifier si les divers "écarts de variation des souches" dans leur sensibilité aux 6 produits toxiques testés pouvaient s'expliquer partiellement par les différences de croissance qu'on constate entre les souches en conditions normales (voir tableau 1.2: coefficients de variation des croissances moyennes entre 8% et 25% chez les témoins). A cette fin, nous avons précisé et représenté aux figures 1.10 et 1.11 les "écarts de variation des souches en conditions - témoins", c'est-à-dire $100 \times$ (croissance 14j pour la souche considérée - croissance 14j moyenne pour les 6 souches) en valeurs absolues: croissance 14j moyenne pour les 6 souches. En comparant les figures 1.8-1.9 et 1.10-1.11, on remarque que:

- . les "écarts de variation des souches en conditions-témoins" sont globalement plus faibles que les "écarts de variation des souches" en présence des 6 produits toxiques;
- . au niveau de chaque souche, le premier type d'écart ne correspond généralement pas en proportion plus faible au second type d'écart.

Il appert dès lors que la variation de sensibilité des 6 souches de *Selenastrum capricornutum* à chacun des 6 produits toxiques testés est davantage due à d'autres causes qu'à une différence de capacité de croissance entre ces souches.

(ii) Souches de *Chlamydomonas variabilis*

Les inhibitions de mobilité provoquées en 24 heures par les 6 produits dans les trois souches de *Chlamydomonas variabilis* sont illustrées aux figures 1.12 à 1.17. Les CI50-24h. des 6 produits y sont indiquées pour les 3 souches utilisées. Les tableaux 1.5 et 1.6 les rassemblent et présentent leurs moyennes pour ces souches avec les coefficients de variation de ces moyennes; ces derniers paramètres représentent les "dispersions moyennes de sensibilité" des souches vis-à-vis des produits.

Pour le phénol, la CI50-24h. moyenne se chiffre à 270 mg/l vis-à-vis des 3 souches, lesquelles ont une "dispersion moyenne de sensibilité" qui n'atteint pas 13% à l'égard de ce produit. Le lauryl sulfate de sodium (LSS) a une CI50-24h. moyenne de 4,6 mg/l pour les 3 souches; la "dispersion moyenne de sensibilité" de ces dernières pour ce composé équivaut à 37%.

Par rapport à chacun des 2 produits organiques, les différences de sensibilité des 3 souches peuvent se visualiser à la figure 1.18 sous forme d'écart à la moyenne exprimés en pourcentages, lesquels ont été précisés de la manière suivante par produit: $100 \times (\text{CI50-24h. pour la souche considérée} - \text{CI50-24h. moyenne pour les 3 souches}) : \text{CI50-24h. moyenne pour les 3 souches}$. Ces "écarts de variation des souches" se situent entre 8% et 18% pour le phénol et entre 15% et 40% pour le lauryl sulfate de sodium.

Les 4 produits inorganiques testés ont des CI50-24h. moyennes de 6477 $\mu\text{g NaN}_3/\text{l}$, 769 $\mu\text{g Cr}/\text{l}$, 442 $\mu\text{g Cd}/\text{l}$ et 30 $\mu\text{g Cu}/\text{l}$ et la "dispersion moyenne de sensibilité" des 3 souches à ces 4 produits, laquelle peut être évaluée à partir des coefficients de variation des CI50-24h. moyennes, équivaut à respectivement 14%, 43%, 20% et 22%.

Pour illustrer les différences de sensibilité entre les 3 souches pour chacun des 4 produits inorganiques, on présente les "écarts de variation des souches" vis-à-vis de ces produits à la figure 1.19: ces écarts se situent à respectivement 2% - 12%, 30% - 50%, 8% - 30% et 8% - 25% pour NaN_3 , Cr, Cd et Cu.

(iii) *Selenastrum capricornutum* versus *Chlamydomonas variabilis*

Si l'on met en parallèle les CI50 moyennes des 6 produits testés pour les deux espèces d'algues et les coefficients de variation de ces moyennes, lesquels

traduisent les "dispersions moyennes de sensibilité" des souches utilisées, on peut faire ressortir certaines différences entre les 2 espèces au point de vue toxicologique.

	<i>Selenastrum capricornutum</i> CI50-14j C.V.* moyenne		<i>Chlamydomonas variabilis</i> CI50-24h. C.V.* moyenne	
<u>Produits organiques</u>				
Phénol	10,9 mg/l	46%	270 mg/l	13%
LSS**	9,4 mg/l	41%	4,6 mg/l	37%
<u>Produits inorganiques</u>				
NaN ₃	671 µg/l	23%	6477 µg/l	14%
Cr	178 µg/l	71%	769 µg/l	43%
Cd	15 µg/l	71%	442 µg/l	20%
Cu	14 µg/l	38%	30 µg/l	22%
		48%		25%
		en		en
		moyenne		moyenne
		globale		globale

* C.V. : Coefficient de variation de la CI50 moyenne

** LSS : Lauryl sulfate de sodium

La synopsis de ces valeurs explicite que:

- . les CI50-14j. de croissance de *Selenastrum capricornutum* sont nettement inférieures aux CI50-24h. de mobilité de *Chlamydomonas variabilis*, excepté dans le cas du LSS; les tests de croissance durant 14 jours avec la première espèce s'avèrent plus sensibles aux composés toxiques que les tests de mobilité pendant 24 heures avec la seconde;
- . les dispersions moyennes de sensibilité des souches aux différents composés toxiques se révèlent plus élevées pour *Selenastrum capricornutum* après 14 jours de test que pour *Chlamydomonas variabilis* après 24 heures de test.

e) Interprétation
.....

On constate généralement une relation inverse entre la durée d'action et la concentration d'un produit toxique dans les phénomènes de toxicité aquatique (Sprague, 1971; Warren, 1971). Ceci explique que les tests sous létaux avec *Selenastrum capricornutum* durant 14 jours aient fourni, dans la plupart des cas, des CI50 plus faibles que les CI50 obtenues avec des tests sous létaux effectués avec *Chlamydomonas variabilis* pendant 24 heures. Les premières CI50 sont également inférieures, dans la majorité des cas, aux CL50 (concentrations létales pour 50% des individus) qu'on précise après 96 heures de test pour des truites juvéniles *Salmo gairdneri* tandis que les secondes CI50 se révèlent généralement supérieures à ces CL50, tel qu'indiqué ci-après:

	CI50 - 14 j. <i>Selenastrum capricornutum</i>	CL50 - 96h. <i>Salmo Gairdneri</i>	CI50 - 24h. <i>Chlamydomonas variabilis</i>
Cd	15 µg/l	20 µg/l*	442 µg/l
Cu	14 µg/l	25 µg/l**	30 µg/l
Cr	178 µg/l	280 µg/l**	769 µg/l
NaN ₃	671 µg/l	2750 µg/l***	6477 µg/l
LSS	9,4 mg/l	4,3 mg/l****	4,6 mg/l
Phénol	10,9 mg/l	7,7 mg/l***	270,0 mg/l

* Voir Ball (1967)

** Voir EPA (1973)

*** Voir Klaverkamp et al (1975)

**** Voir Pessah et al (1975) pour DSS analogue à LSS.

Le décalage entre les trois paliers de valeurs de toxicité est non seulement relié à des durées inégales de test mais aussi à des paramètres et organismes différents. En effet, mentionnons par exemple qu'après 24 heures de traitement toxique, la CI50 de Cu pour la croissance de *Selenastrum capricornutum* équivaut à 7 µg/l (voir tableau 2.1 plus loin) tandis que la CI50 de Cu pour la mobilité de *Chlamydomonas variabilis* se chiffre à 30 µg/l; après 24 heures également, la CI50 du phénol pour ce dernier paramètre équivaut à 270 mg/l alors que la CL50 de ce composé pour la survie de *Salmo gairdneri* se situe à 10,2 mg/l (Klaverkamp et al, 1975).

Par ailleurs, dans certains cas, une diminution de sensibilité peut survenir avec l'allongement de la durée lors des tests. Signalons ici par exemple que la CI50 de Cu pour la croissance de *Selenastrum capricornutum* change de 7 µg/l pour 1 jour à 9 µg/l après 7 jours et à, en moyenne, 14 µg/l après 14 jours (voir plus haut et tableau 2.1 plus loin). Ceci pourrait être dû à deux facteurs. En premier lieu, en présence d'un excès de cuivre, les algues excrètent progressivement des ligands polypeptidiques complexant ce métal, ce qui le rend moins biodisponible et moins toxique (Vandenberg et al, 1979; Rai et al, 1981). En second lieu, aux pH de la photosynthèse (pH >8,0), la spéciation du cuivre change graduellement durant l'expérimentation avec *Selenastrum capricornutum*; il y aurait alors moins de Cu^{++} très toxique et davantage d'autres formes moins toxiques telles que Cu CO_3 (Guy et Ross Kean, 1980). Il n'est pas impossible que le LSS et le phénol soient également inactivés progressivement durant les tests suite à des sécrétions par les algues ou d'autres phénomènes tels qu'un métabolisme particulier des bactéries associées aux algues. On pourrait ainsi expliquer partiellement que la CI50 du LSS pour la mobilité de *Chlamydomonas variabilis* soit égale à 4,6 mg/l après 24 heures tandis que la CI50 de ce produit pour la croissance de *Selenastrum capricornutum* s'élève à 9,4 mg/l après 14 jours. Parallèlement, alors que la CL50 du phénol pour la survie de *Salmo gairdneri* équivaut à 7,7 mg/l après 96 heures, sa CI50 pour la croissance de *Selenastrum capricornutum* se chiffre à 10,9 mg/l après 14 jours. Notons enfin dans ce contexte que

Joubert (1981) montre une réduction de la sensibilité des tests de toxicité au niveau de la croissance de *Selenastrum capricornutum* entre 7 et 14 jours pour 36 produits différents, laquelle sensibilité reste toutefois supérieure à celle des tests de survie de *Salmo gairdneri* durant 96 heures et ensuite à celle des tests d'immobilisation de *Daphnia magna* ou de *Chlamydomonas variabilis* pendant respectivement 48 et 24 heures.

La dispersion de sensibilité entre diverses souches intraspécifiques pour un composé toxique s'accroît aussi avec la durée des tests chez les algues. De fait, vis-à-vis du phénol, LSS, NaN_3 , Cr, Cd et Cu, cette dispersion de sensibilité correspond à respectivement 13%, 37%, 14%, 43%, 20% et 22% après 24 heures pour la mobilité de 3 souches de *Chlamydomonas variabilis* tandis qu'elle atteint respectivement 46%, 41%, 23%, 71%, 71% et 38% après 14 jours pour la croissance de 6 souches de *Selenastrum capricornutum*; le premier palier de pourcentages s'avère 2 fois plus faible que le second, soit 25% et 48% en moyennes globales. Cet écart est vraisemblablement aussi occasionné par d'autres facteurs que la durée expérimentale, notamment deux paramètres différents, deux espèces dissemblables et un nombre différent de souches/espèce.

Pour expliquer les dispersions de sensibilité pré-décrites entre les souches intraspécifiques d'algues pour des produits toxiques, il faut aussi tenir compte des variations inter-souches en conditions normales. En ce qui concerne la croissance de *Selenastrum capricornutum* après 14 jours,

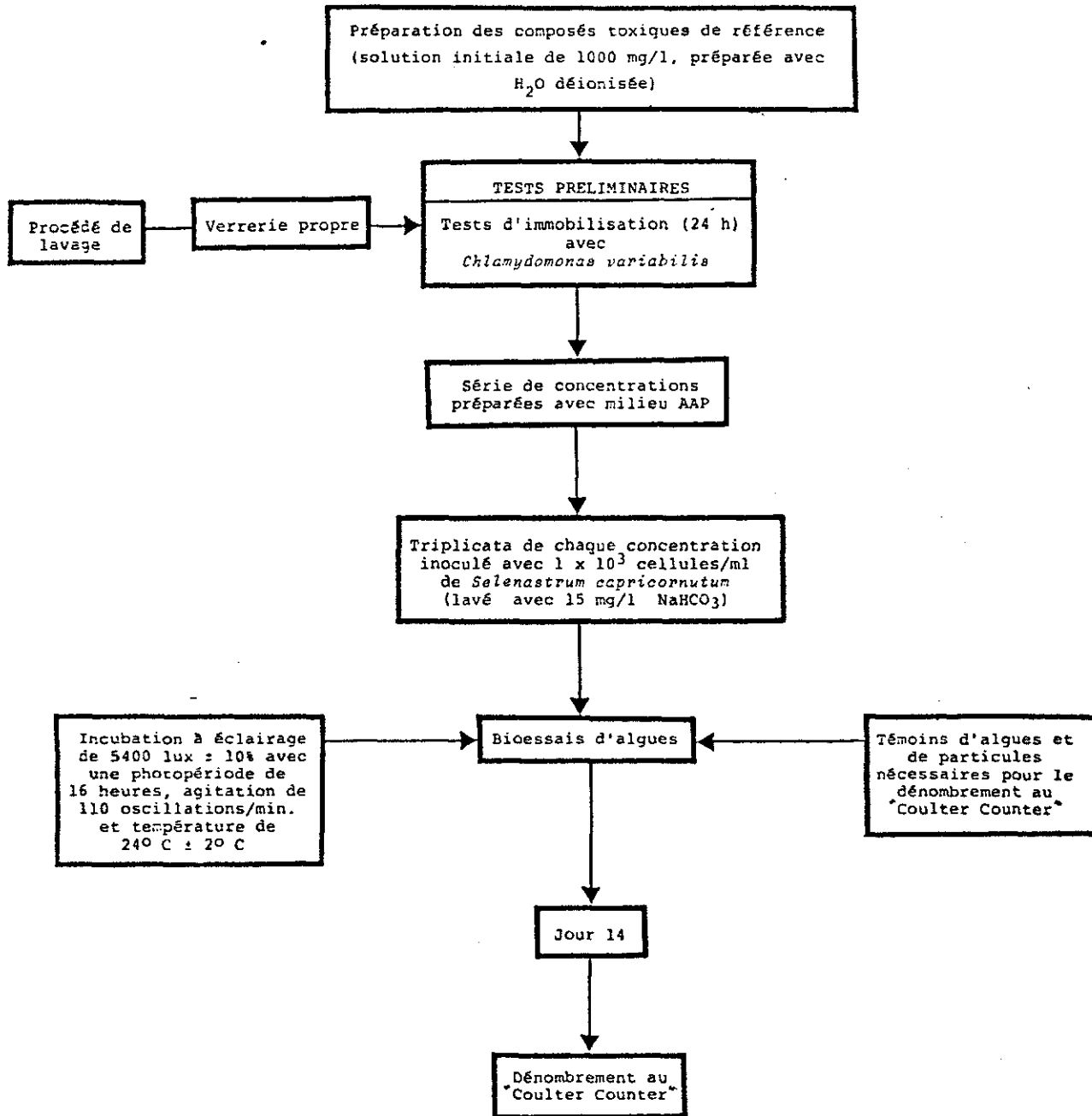
ces variations représentent 20% de dispersion moyenne globale entre les 6 souches chez les témoins (voir tableau 1.2). Pour la mobilité de *Chlamydomonas variabilis*, la différence entre les 3 souches-témoins n'a pu être précisée, vu que le protocole expérimental adopté lors des tests était comparatif par souche (voir B.5) conformément aux directives à ce sujet (Cabridenc, 1979). A un plan plus général, on constate qu'il y a une variabilité de 20 à 25% dans le comportement des algues unicellulaires en conditions normales (Weiss et Helms, 1971; Shiroyama et al, 1976; SIL, 1978).

Compte tenu de cette variabilité de 20 à 25% chez les témoins, il reste une dispersion de sensibilité d'environ 25% entre les 6 souches de *Selenastrum capricornutum* après 14 jours pour la croissance vis-à-vis des 6 composés toxiques étudiés. Une telle dispersion s'observe aussi entre des souches différentes de *Salmo gairdneri* au niveau létal, par exemple après 96 heures de traitement avec le DSS (Dodecyl Sodium Sulfate) (Pessah et al, 1975). Elle traduit une différence de comportement des souches d'une espèce pour les produits toxiques. Certaines souches de *Selenastrum capricornutum* pourraient-elles inactiver davantage certains composés toxiques? C'est une hypothèse à vérifier ultérieurement.

Quoiqu'il en soit, il faut retenir que la croissance de *Selenastrum capricornutum*, tout en se révélant un paramètre biologique plus sensible que d'autres pour la toxicologie aquatique, présente une assez large dispersion de sensibilité entre ses souches pour les produits toxiques.

FIGURE 1.1

SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE LORS DE LA REALISATION DU PROGRAMME NO 1



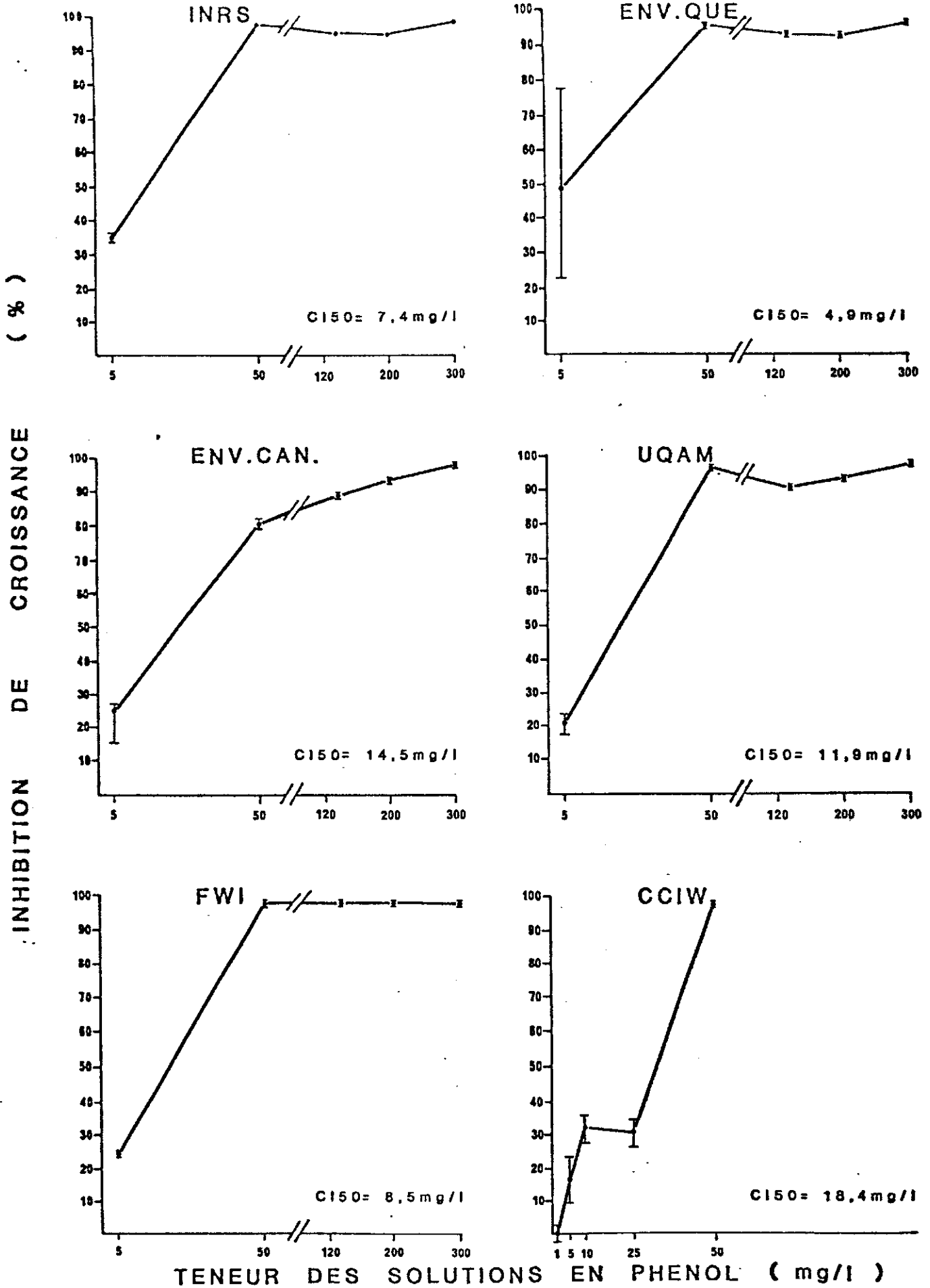
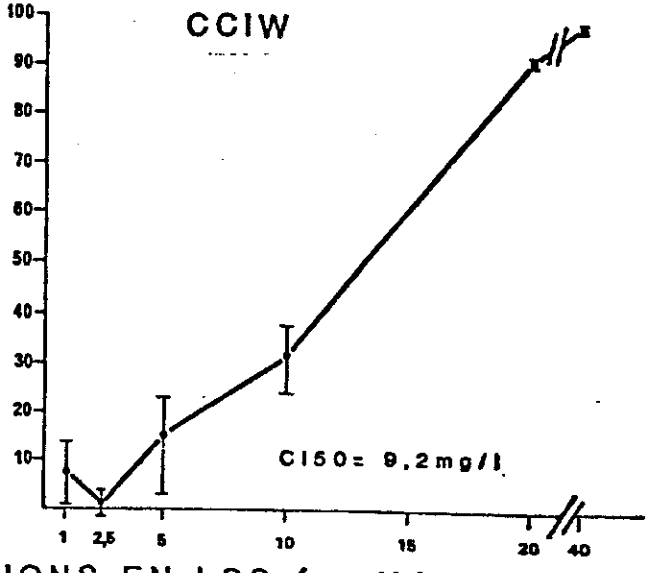
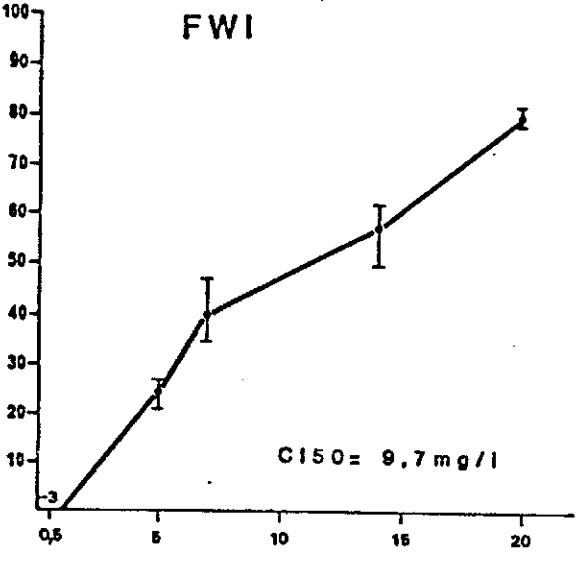
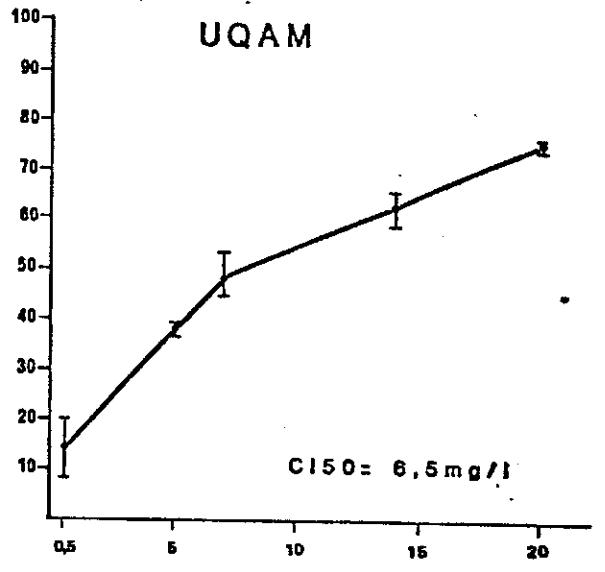
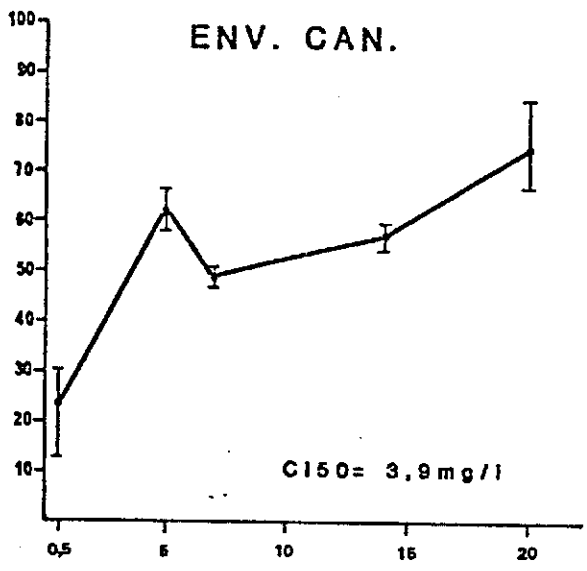
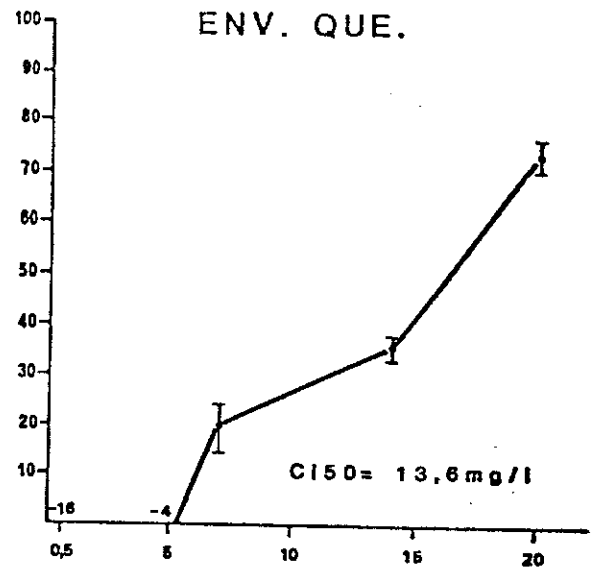
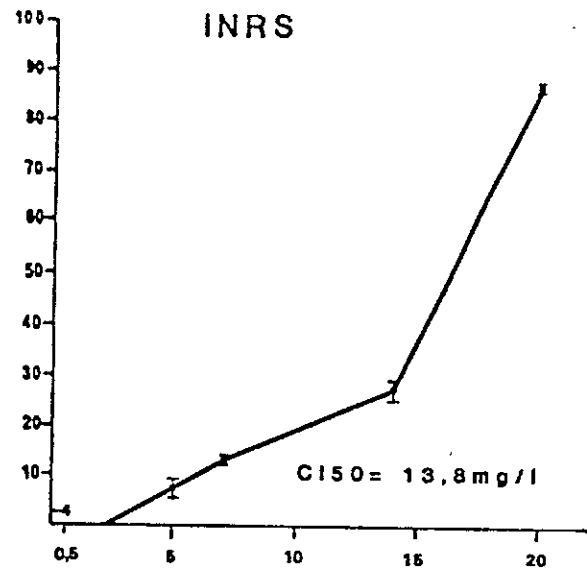


FIGURE 1.2 - INHIBITION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* EXPOSEES AU PHENOL

INHIBITION DE CROISSANCE (%)



TENEUR DES SOLUTIONS EN LSS (mg/l)

FIGURE 1.3 - INHIBITION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* EXPOSEES AU LAURYL SULFATE DE SODIUM

(%)

INHIBITION DE CROISSANCE

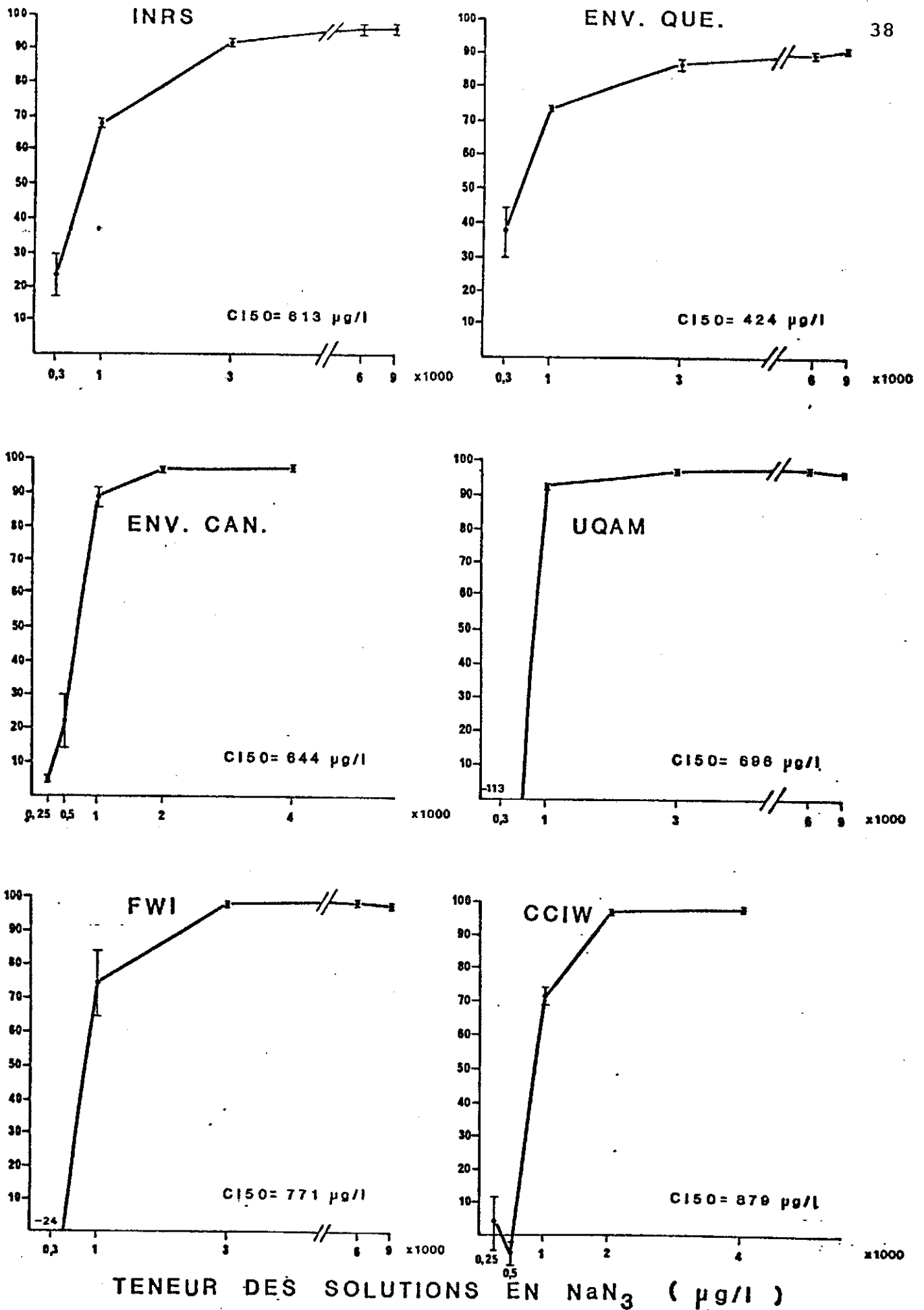
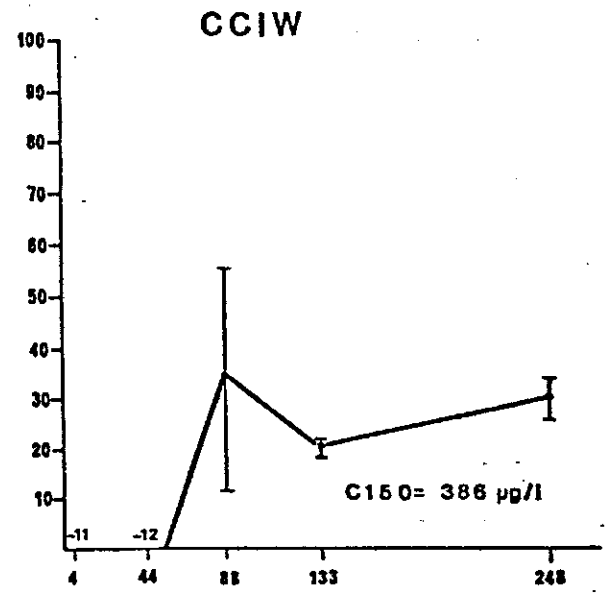
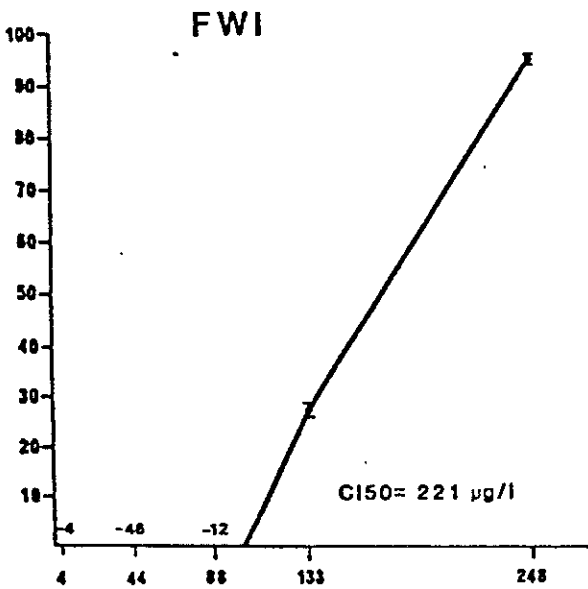
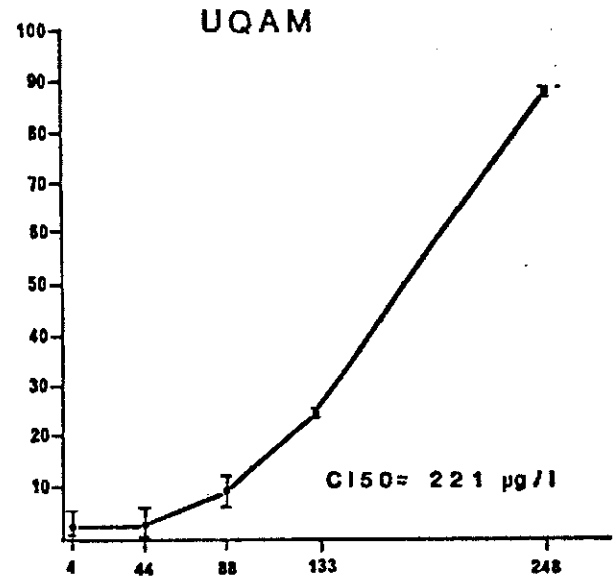
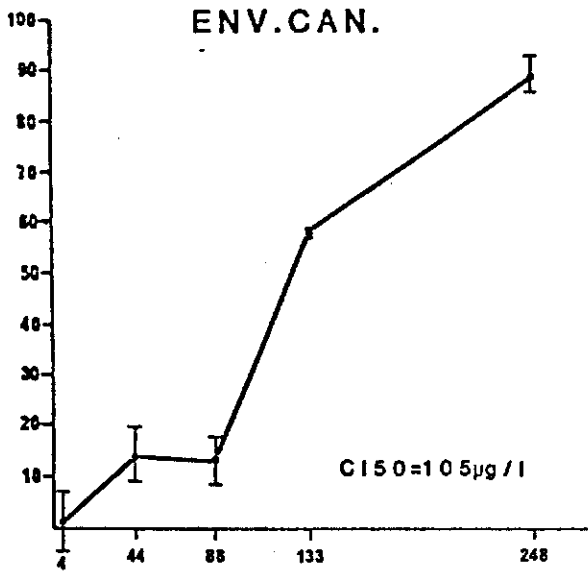
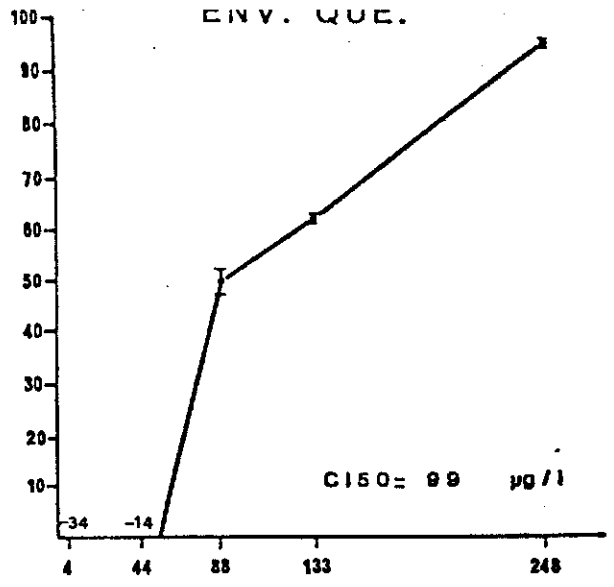
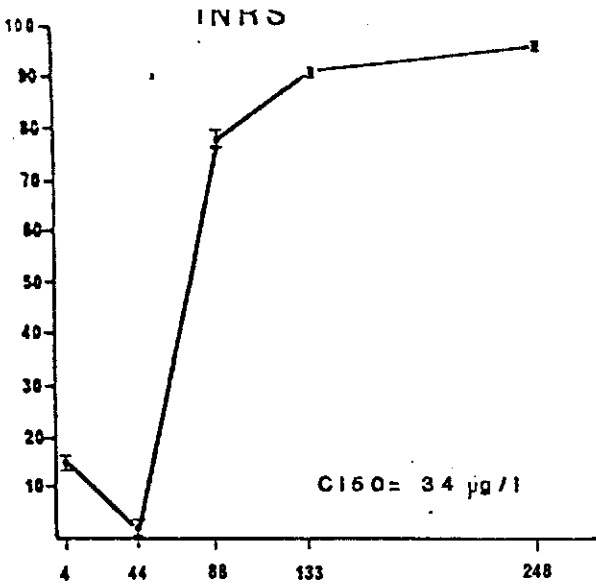


FIGURE 1.4 - INHIBITION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* EXPOSEES A L'AZIDE DE SODIUM

(%)

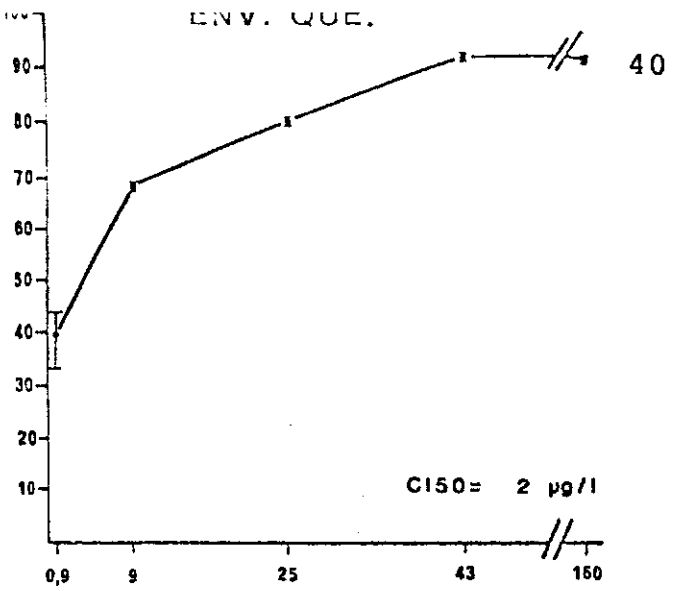
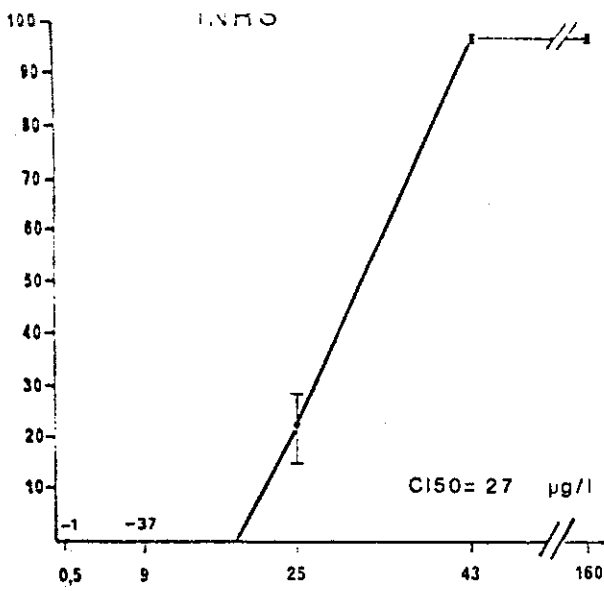
INHIBITION DE CROISSANCE



TENEUR DES SOLUTIONS EN Cr (µg/l)

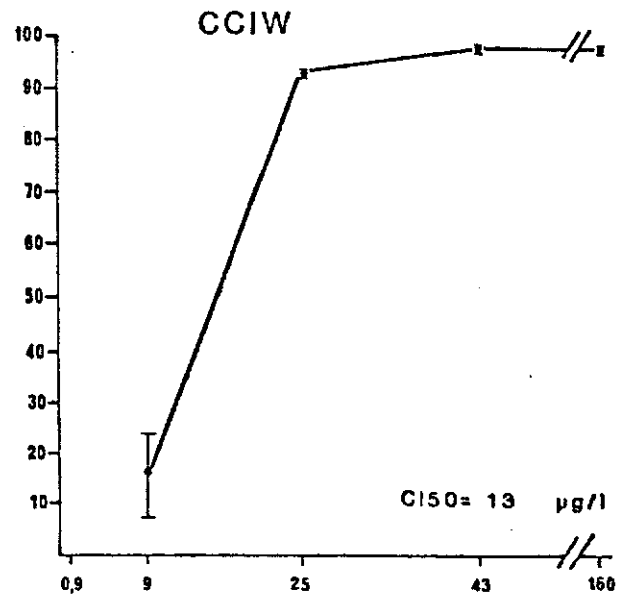
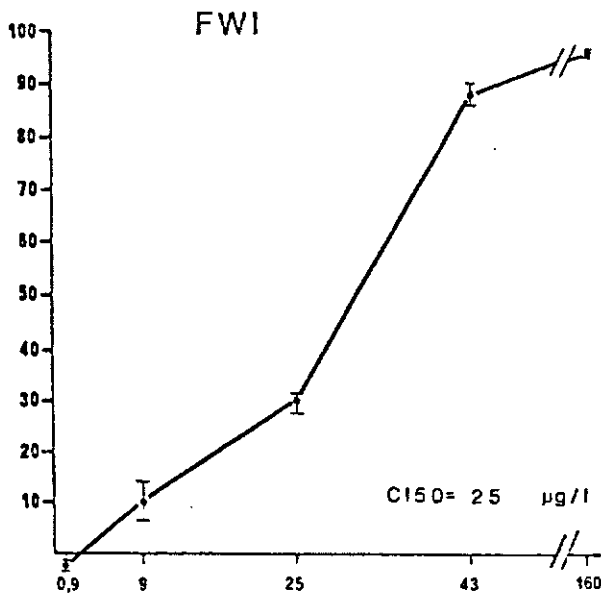
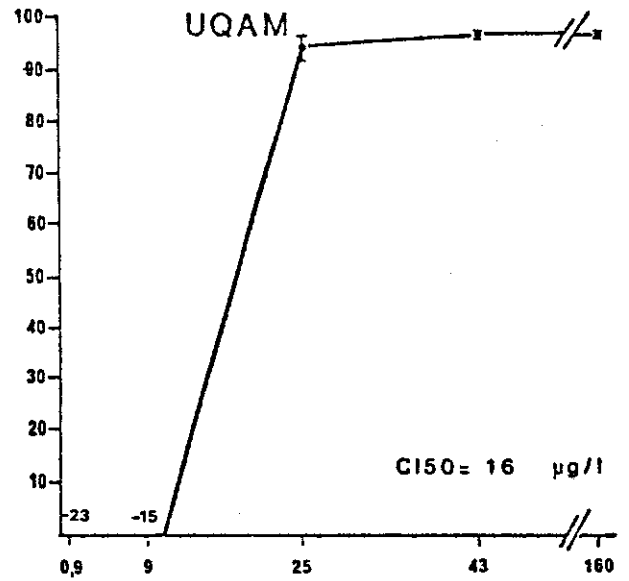
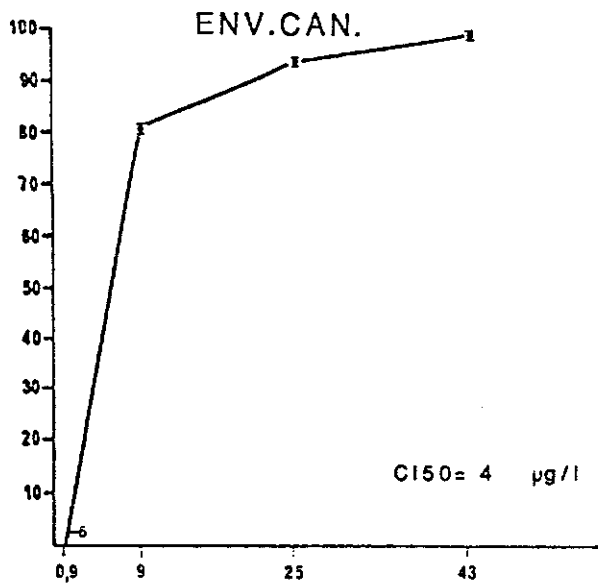
FIGURE 1.5 - INHIBITION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* EXPOSEES AU DICHROMATE DE POTASSIUM

(%)



40

INHIBITION DE CROISSANCE



TENEUR DES SOLUTIONS EN Cd (µg/l)

FIGURE 1.6 - INHIBITION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE *SELENASTION PARVICORNUTUM* EXPOSEES AU NITRATE DE CADMIUM

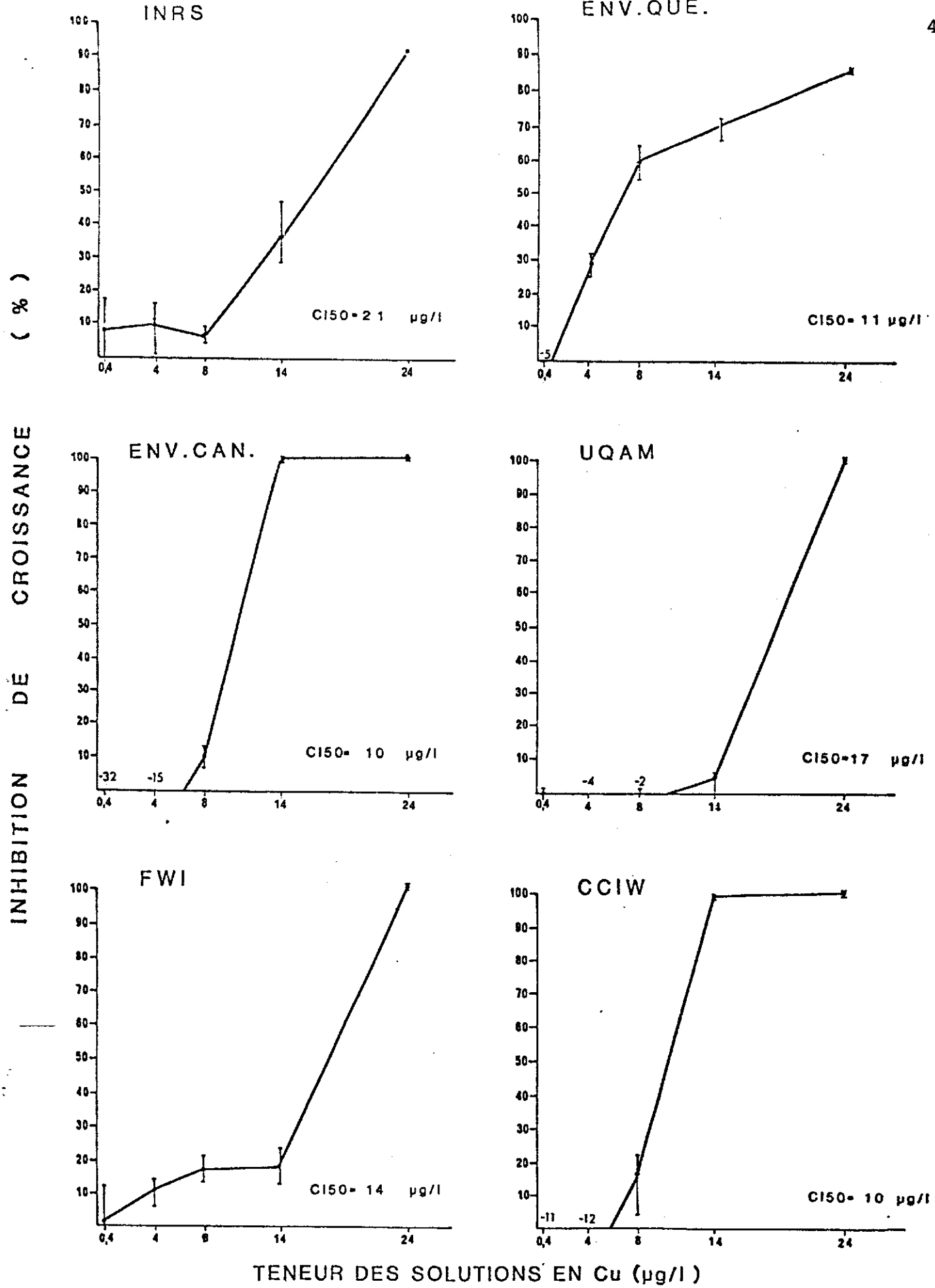


FIGURE 1.7 - INHIBITION DE LA CROISSANCE DES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* EXPOSEES AU SULFATE DE CUIVRE

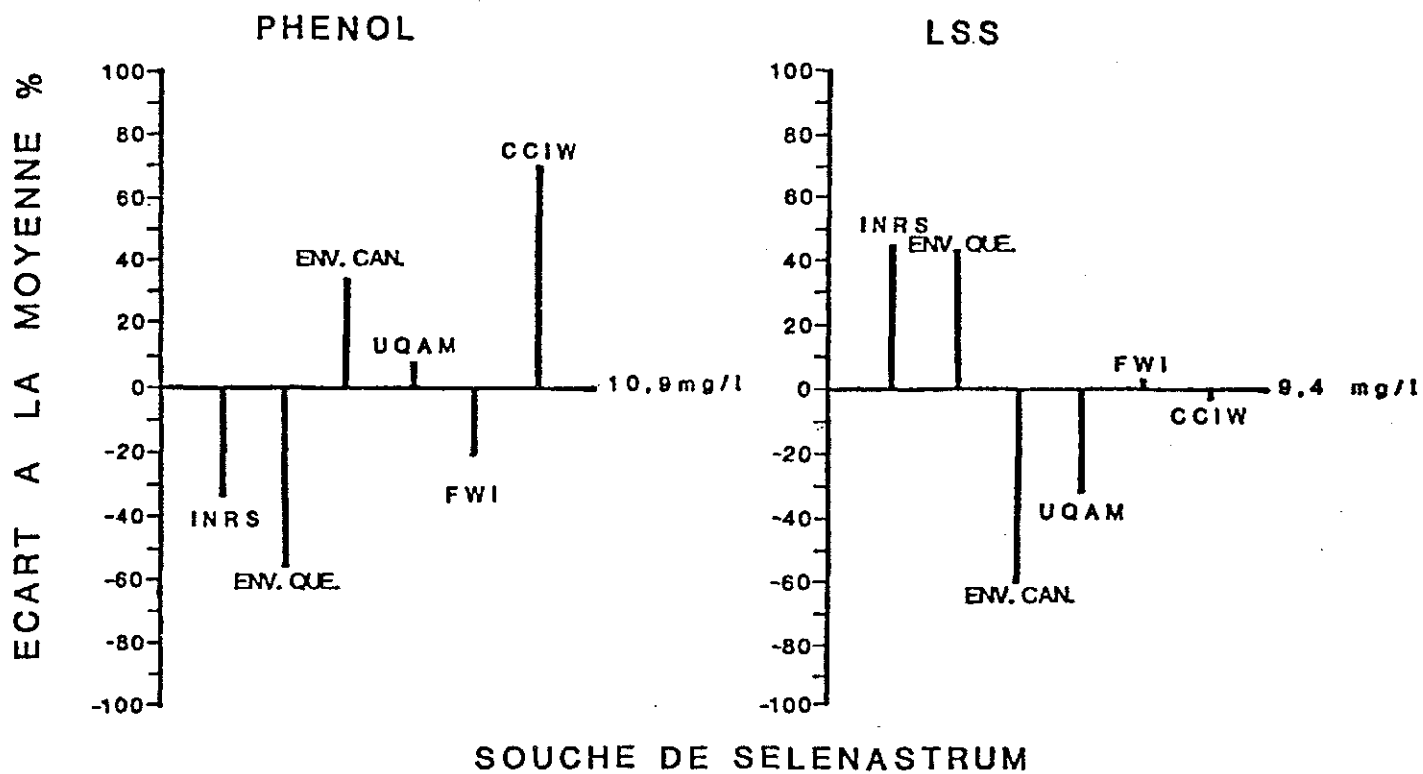


FIGURE 1.8 - VARIATIONS DES CI50 -14 J PAR RAPPORT A LEUR MOYENNE POUR
DES COMPOSES ORGANIQUES EN FONCTION DES SOUCHES DE
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM

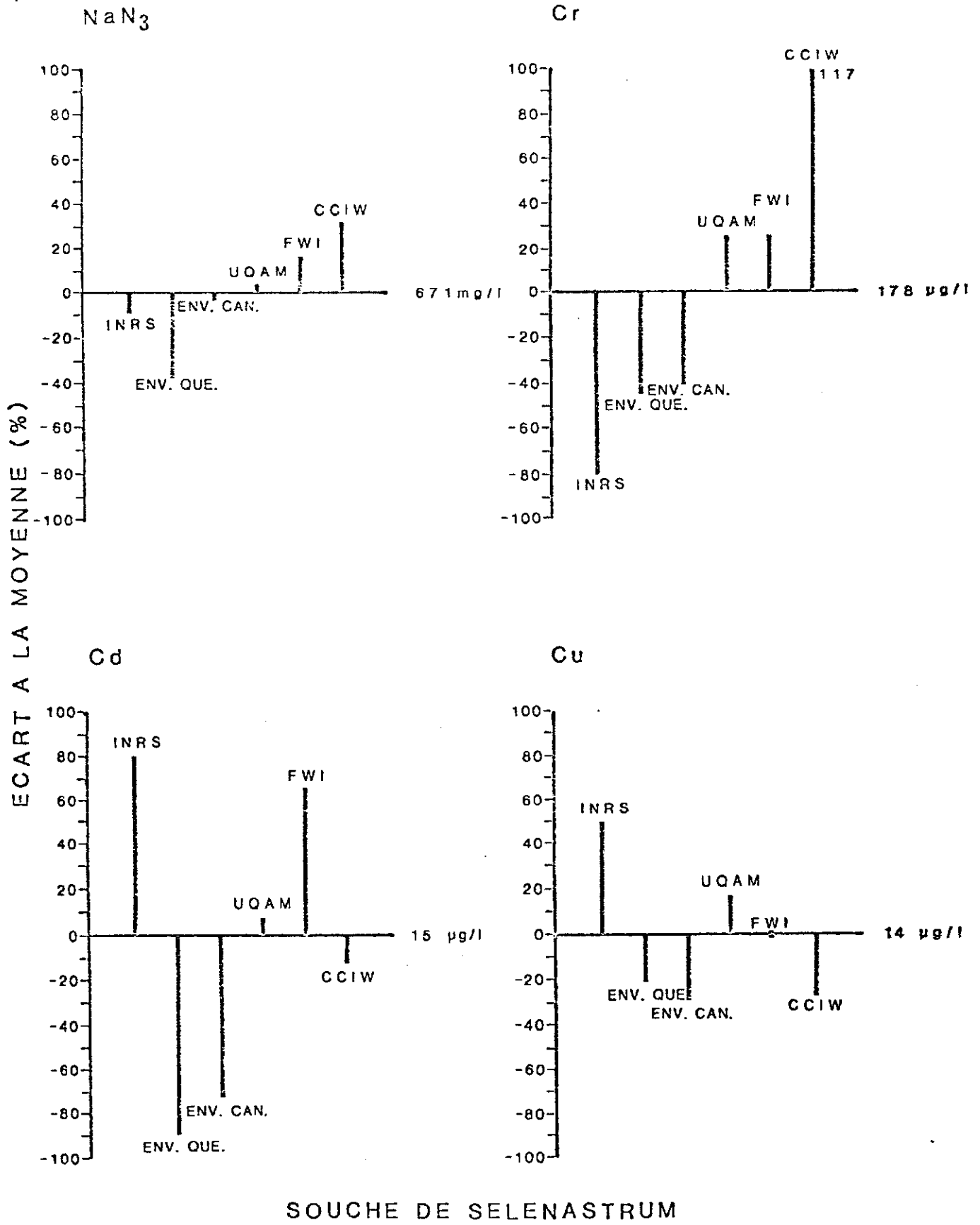


FIGURE 1.9 - VARIATIONS DES C150-14 J PAR RAPPORT A LEUR MOYENNE POUR DES COMPOSES INORGANIQUES EN FONCTION DES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

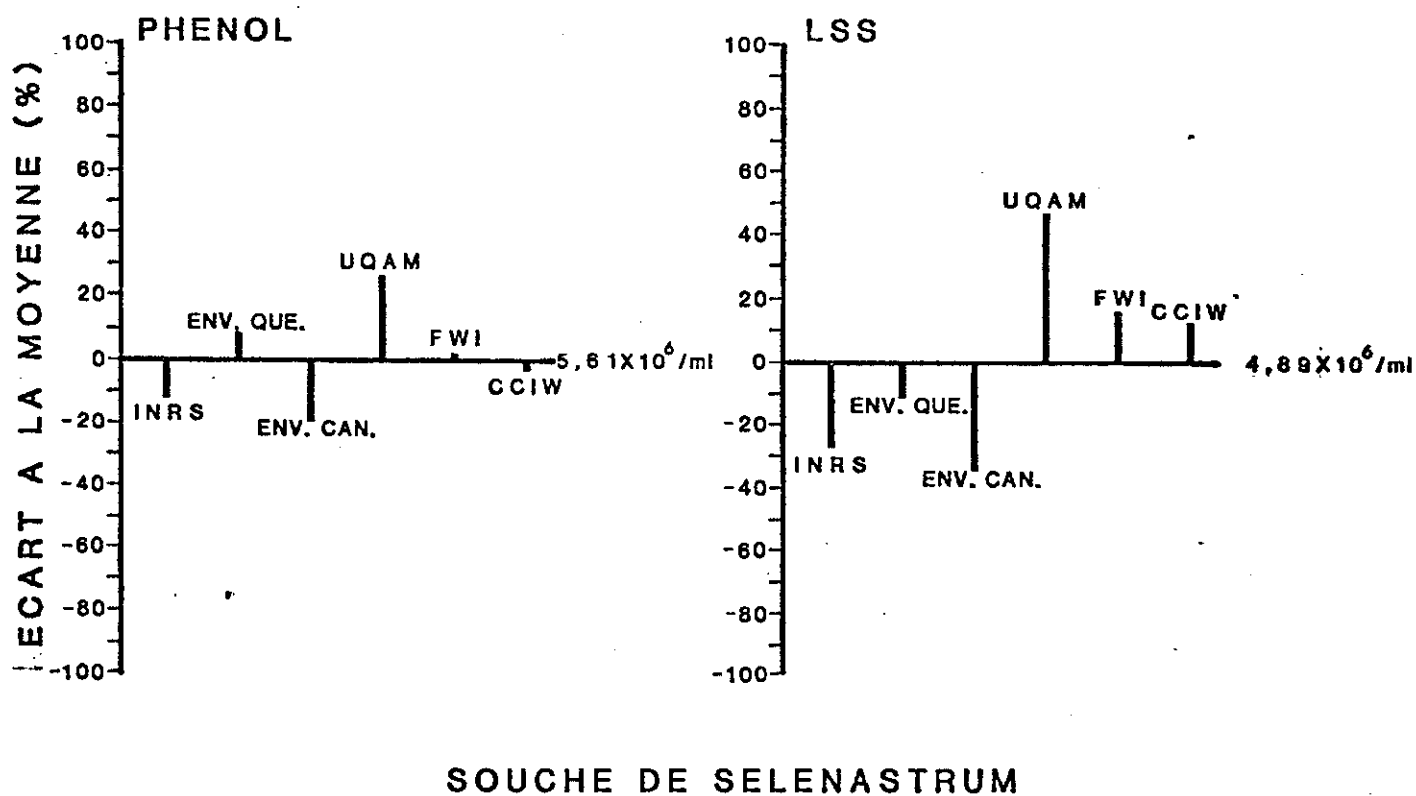


FIGURE 1.10 - VARIATIONS DES CROISSANCES DES TEMOINS PAR RAPPORT A LEUR MOYENNE EN FONCTION DE LA SOUCHE DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* UTILISEE

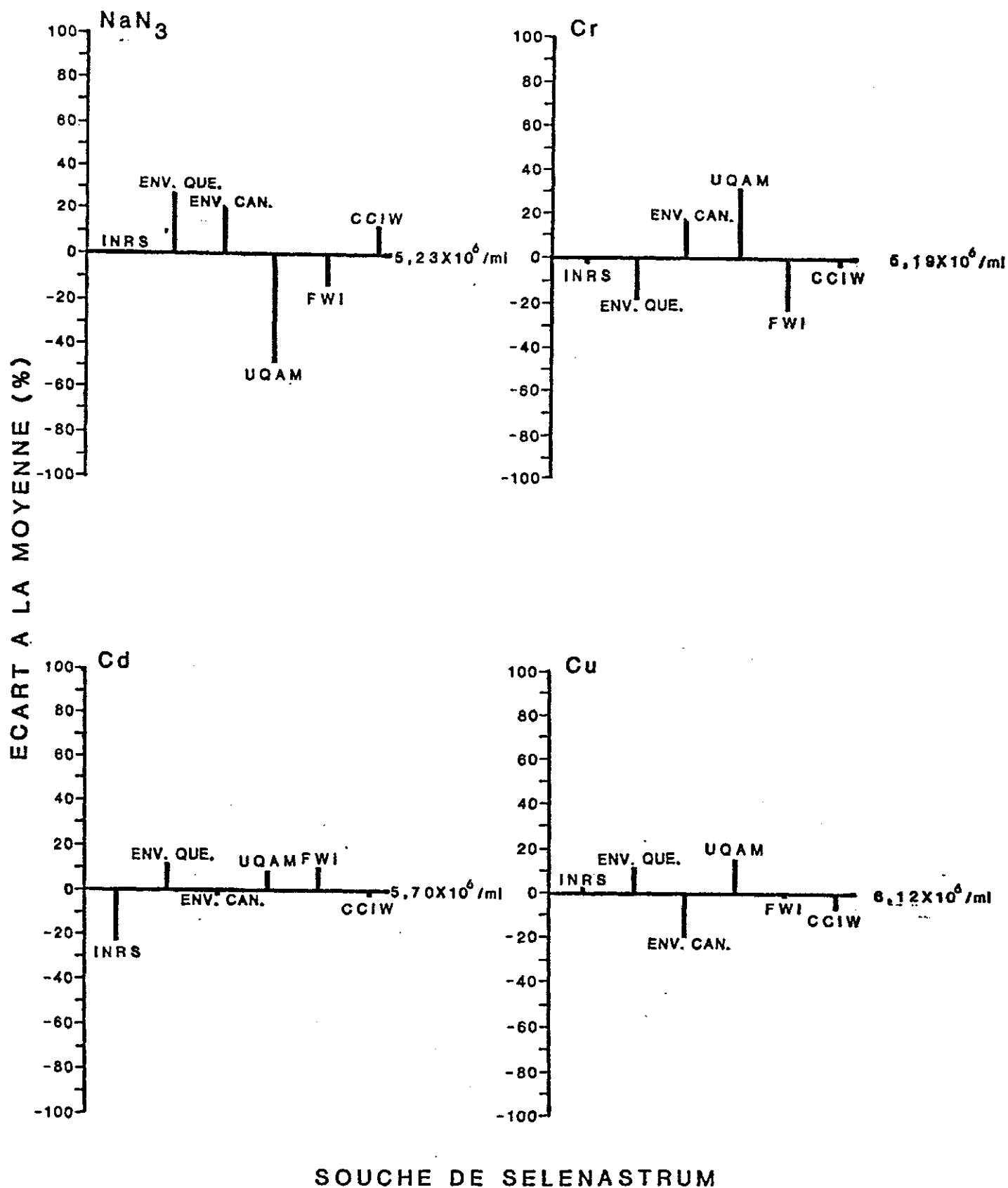
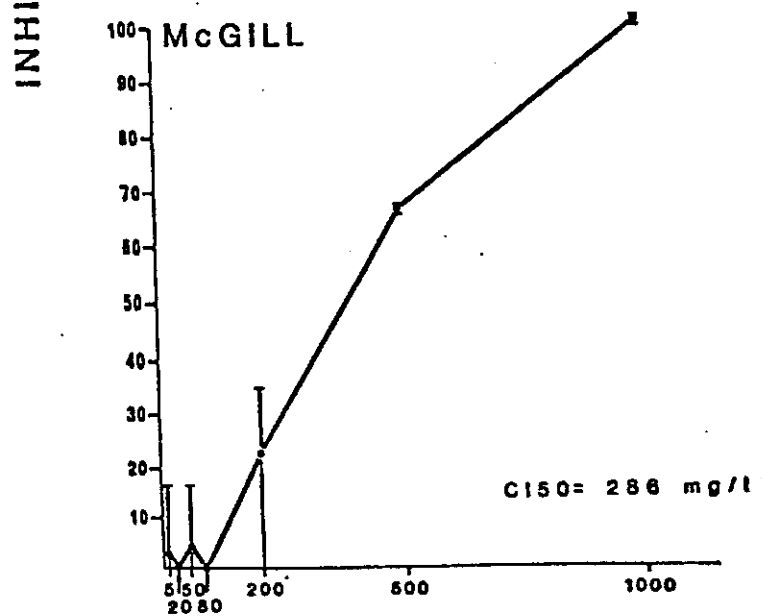
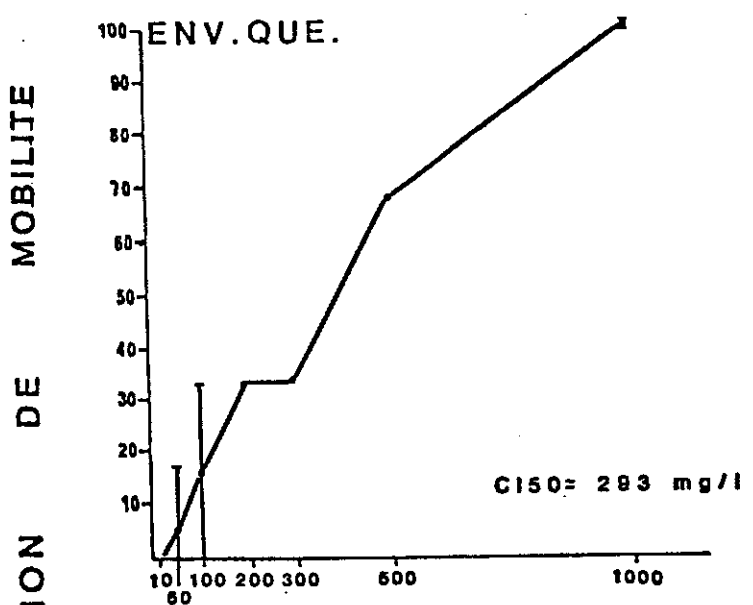
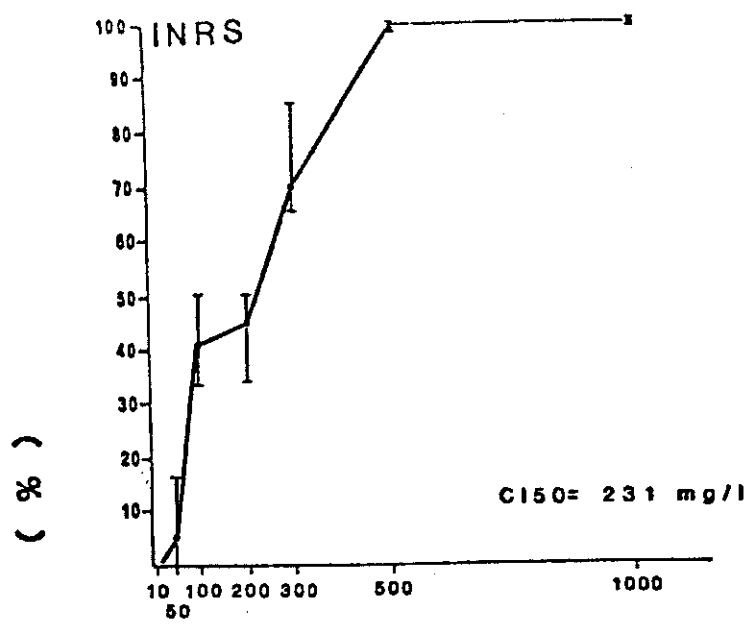


FIGURE 1.11 - VARIATIONS DES CROISSANCES DES TEMOINS PAR RAPPORT A LEUR MOYENNE EN FONCTION DE LA SOUCHE DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* UTILISEE (SUITE)



TENEUR DES SOLUTIONS EN PHENOL (mg/l)

FIGURE 1.12 - INHIBITION DE LA MOBILITE DES SOUCHES DE *CHLAMYDOMONAS VARIABLEIS* EXPOSEES AU PHENOL

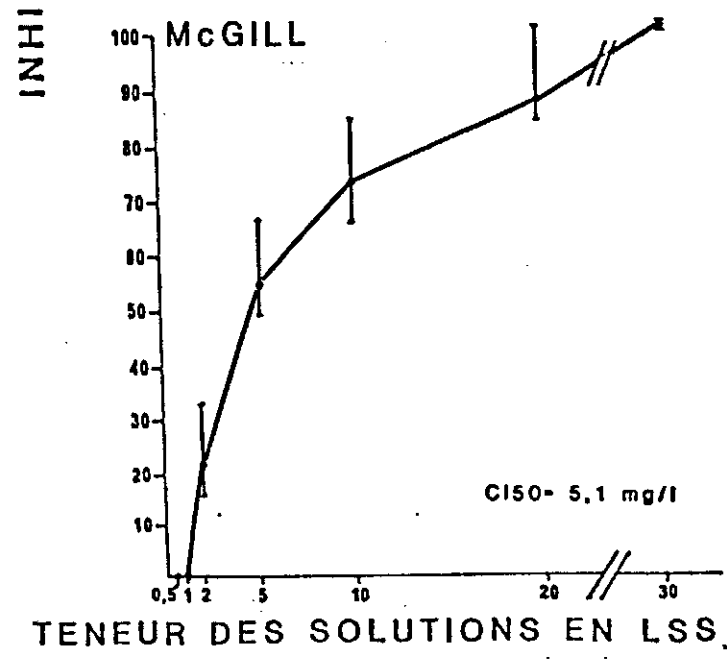
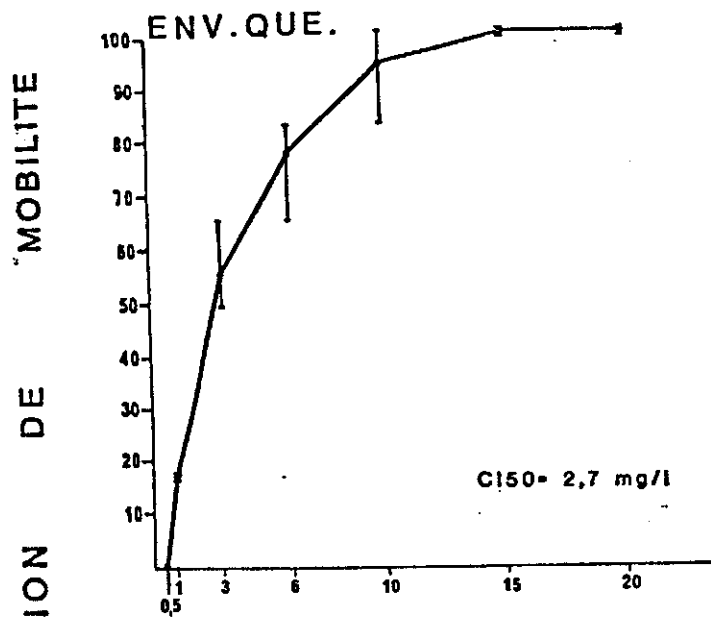
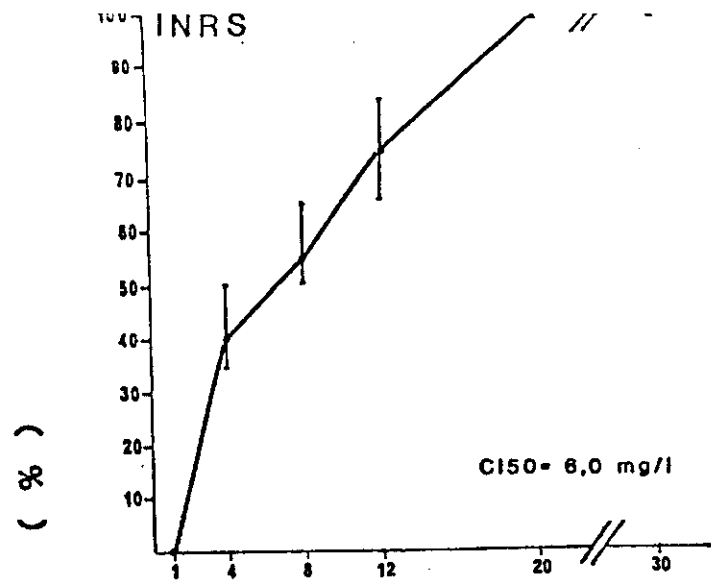


FIGURE 1.13 - INHIBITION DE LA MOBILITE DES SOUCHES *CHLAMYDOMORAS VARIABILIS* EXPOSEES AU LAURYL DE SODIUM

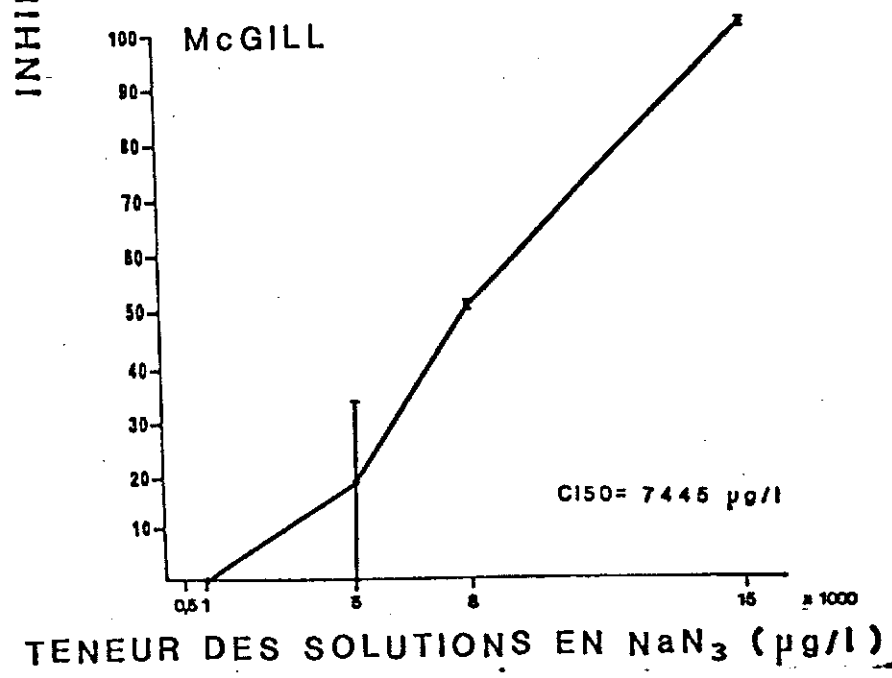
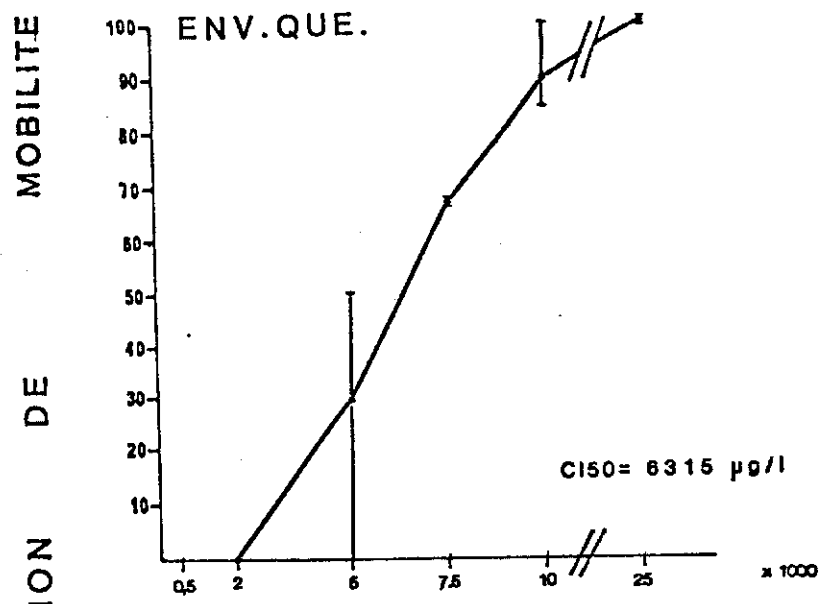
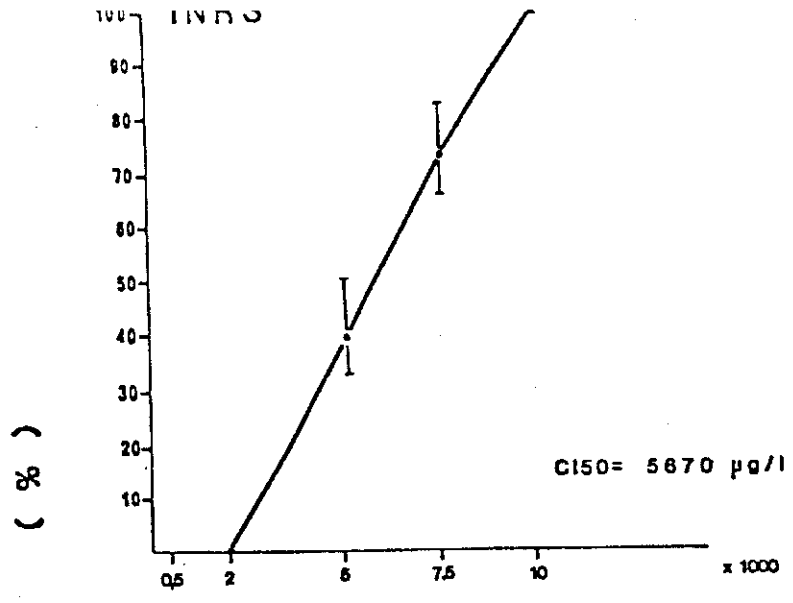
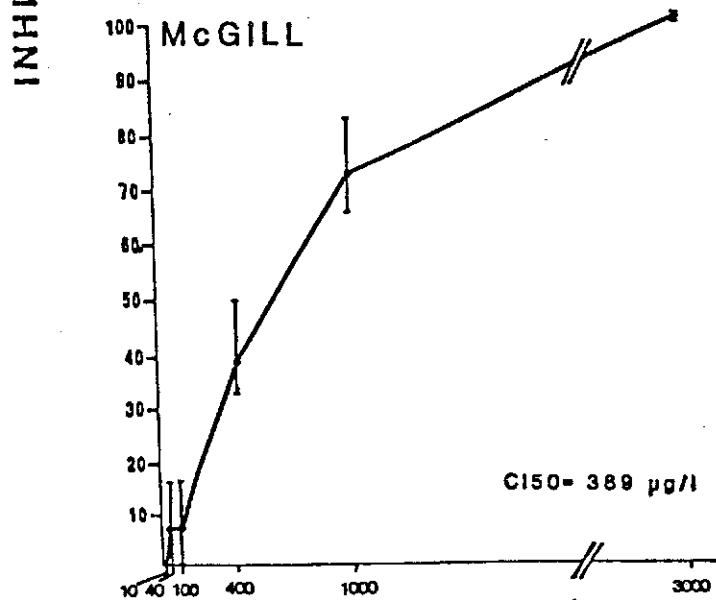
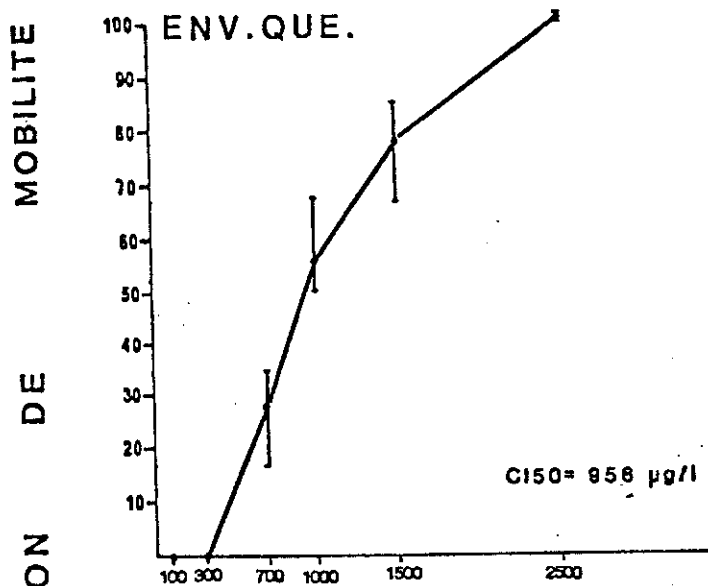
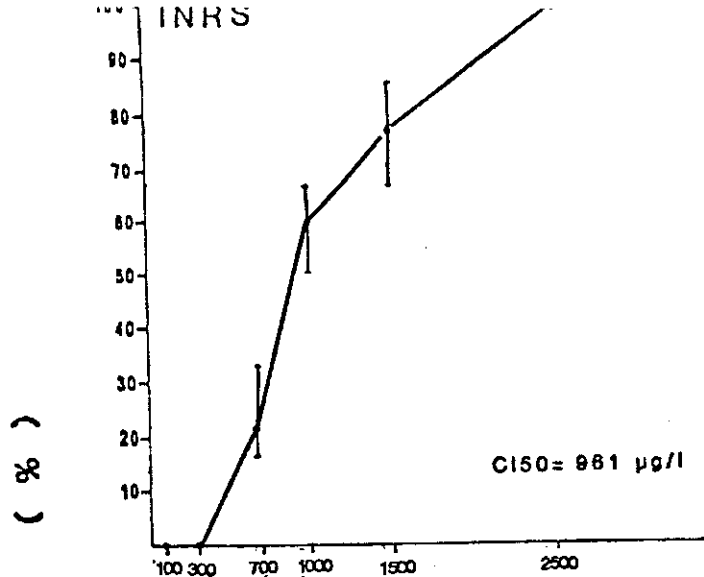
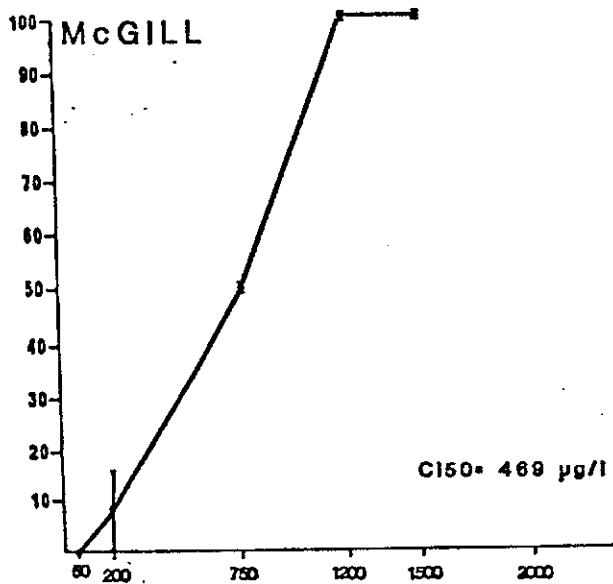
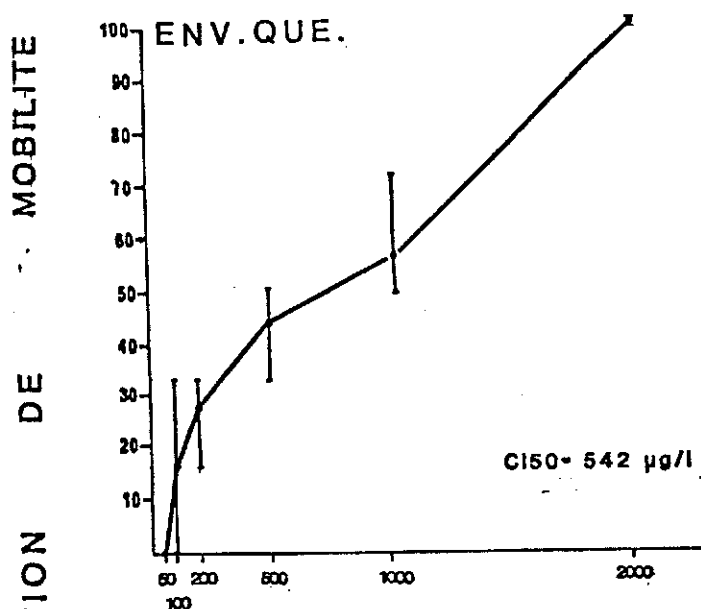
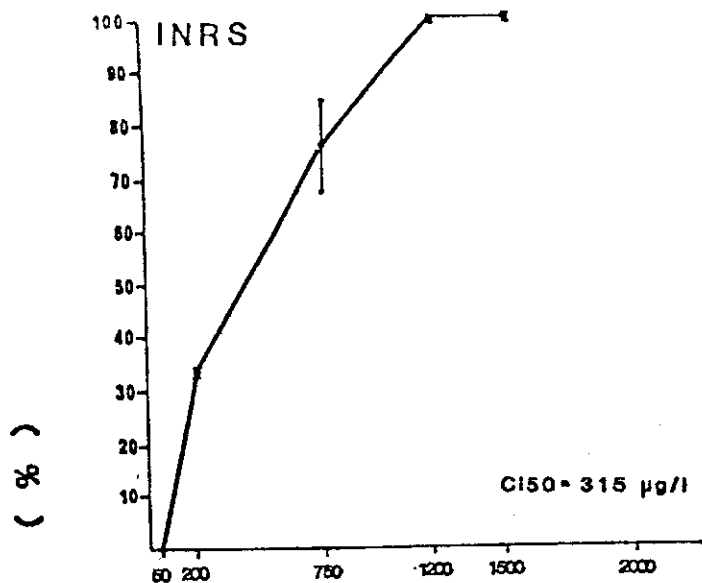


FIGURE 1.14 - INHIBITION DE LA MOBILITE DES SOUCHES DE *CELANIDORONAS VARIABILIS* EXPOSEES A L'AZIDE DE SODIUM



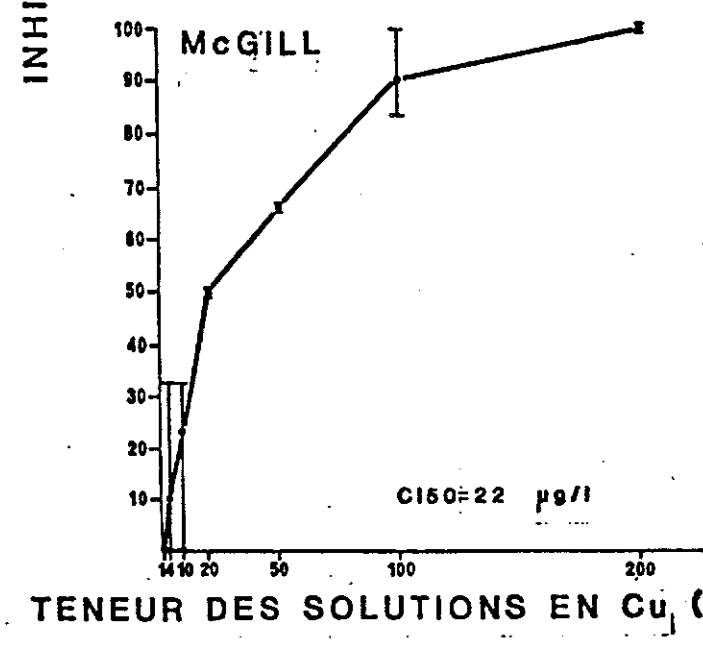
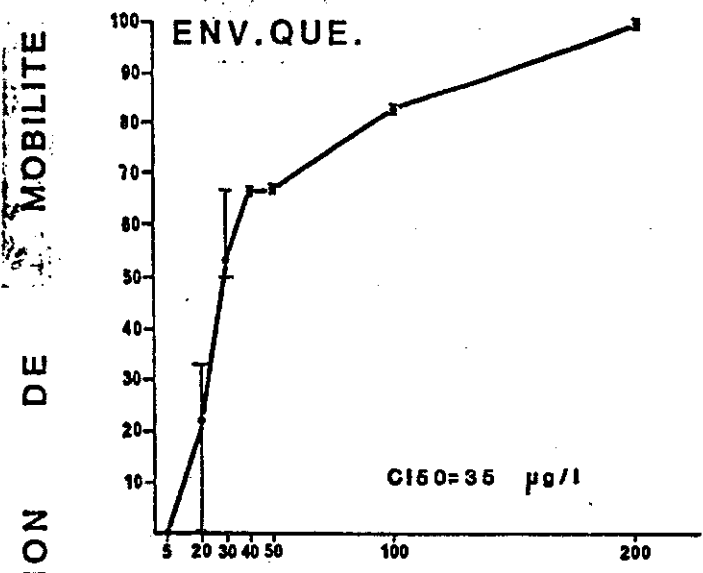
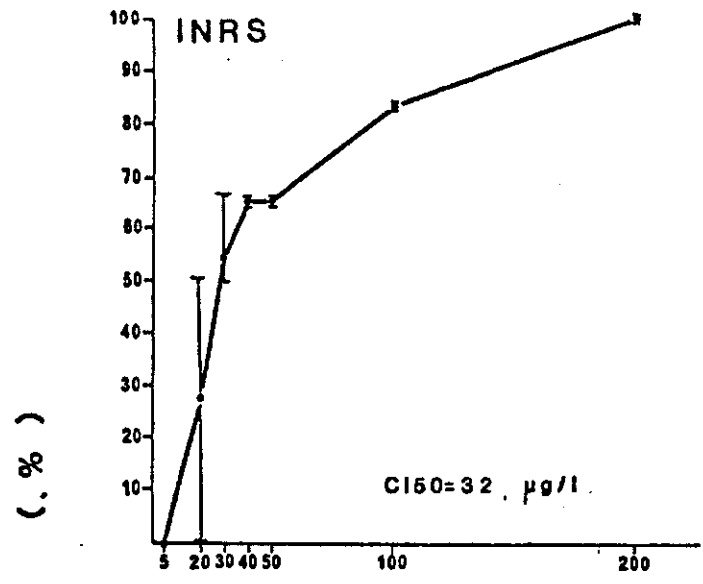
TENEUR DES SOLUTIONS EN Cr (µg/l)

FIGURE 1.15 - INHIBITION DE LA MOBILITE DES SOUCHES DE *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* EXPOSEES AU DICHROMATE DE POTASSIUM



TENEUR DES SOLUTIONS EN Cd (µg/l)

FIGURE 1.16 - INHIBITION DE LA MOBILITE DES SOUCHES DE *CELAMYDONAS VARIABILIS* EXPOSEES AU NITRATE DE CADMIUM



TENEUR DES SOLUTIONS EN Cu₁ (µg/l)

FIGURE 1.17 - INHIBITION DE LA MOBILITE DES SOUCHES DE *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* EXPOSEES A UN MILIEU DE CUIVRE

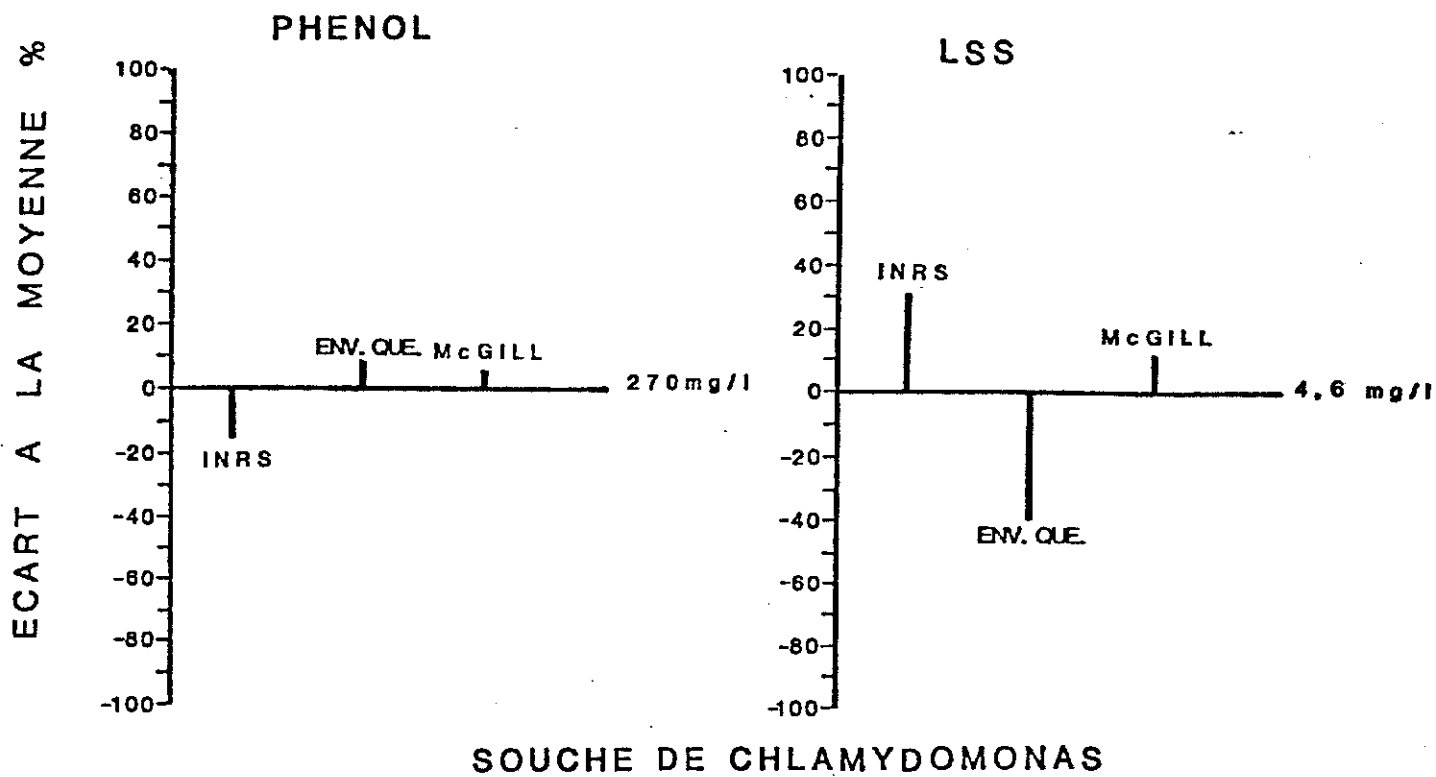


FIGURE 1.18 - VARIATIONS DES CI50-24 H PAR RAPPORT A LEUR MOYENNE POUR
DES COMPOSES ORGANIQUES EN FONCTION DES SOUCHES DE
CHLAMYDOMONAS VARIABILIS

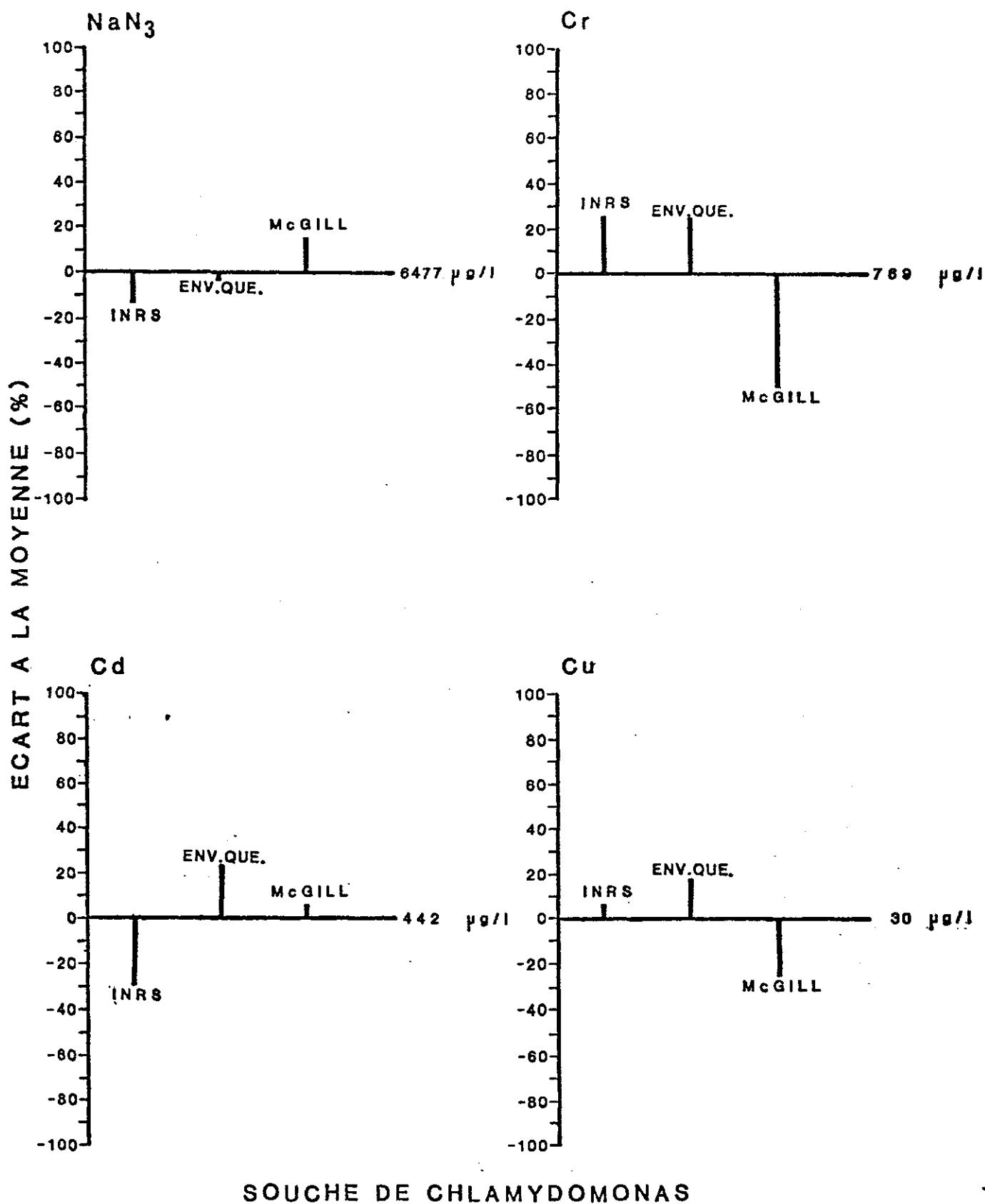


FIGURE 1.19 - VARIATIONS DES CISO-24 H PAR RAPPORT A LEUR MOYENNE POUR DES COMPOSES INORGANQUES EN FONCTION DE LA SOUCHE DE *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* UTILISEE

TABLEAU 1.1

PROVENANCE DES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*
ET *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* UTILISEES POUR LES EXPERIENCES

SELENASTRUM CAPRICORNUTUM

- 1) Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Ste-Foy.
- 2) Ministère de l'Environnement du Québec (ENV. QUE.)
Ste-Foy.
- 3) Ministère de l'Environnement du Canada (ENV. CAN.)
Longueuil.
- 4) Université du Québec à Montréal (UQAM), Montréal.
- 5) Freshwater Institute (FWI), Winnipeg.
- 6) Canada Centre for Inland Waters (CCIW), Burlington.

CHLAMYDOMONAS VARIABILIS

- 1) Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Ste-Foy.
- 2) Ministère de l'Environnement du Québec (ENV. QUE.)
Ste-Foy.
- 3) Université McGill (McGILL), Montréal.

TABLEAU 1.2

CROISSANCES MOYENNES DES DIFFERENTES SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

FACTEUR	INRS	ENV. QUE.	ENV. CAN.	UQAM	FWI	CCIW	MOYENNE GLOBALE***
CROISSANCE* (X10 ⁶ cellu- les/ml)	4,91	5,68	5,23	6,29	5,56	5,50	5,46
C.V. **	19 %	22 %	21 %	25 %	18 %	8 %	20 %

* Croissance moyenne durant 14 jours

** Coefficient de variation

*** Moyenne globale = moyenne de toutes les valeurs de dénombrement avec son coefficient de variation; elle diffère quelque peu de la moyenne des moyennes.

TABLEAU 1.3

EVALUATION DES CI50-14 J DES COMPOSES ORGANIQUES AVEC LES DIFFERENTES
SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

PRODUIT	INRS	ENV. QUE.	ENV. CAN.	UQAM	FWI	CCIW	MOYENNE {C.V.}*
Phénol (mg/l)	7,4 (3,7-11,9)**	4,9 (1,5-9,5)	14,5 (12,0-17,7)	11,9 (7,6-17,1)	8,5 (6,1-21,4)	18,4 (11,6-33,8)	10,9 { 46 %}
LSS*** (mg/l)	13,8 (12,0-16,1)	13,6 (11,8-16,0)	3,9 (2,1- 6,6)	6,5 (5,1- 8,4)	9,7 (8,8-10,8)	9,2 (5,3-17,1)	9,4 { 41 %}

* C.V.: coefficients de variation

** Limites de confiance (pour une distribution logarithmique; P: 0,05) indiquées entre parenthèses

*** LSS : Lauryl Sulfate de Sodium

TABLEAU 1.4

EVALUATION DES CI50-14 J DES COMPOSES INORGANIQUES AVEC LES DIFFERENTES
SOUCHES DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

PRODUIT	INRS	ENV. QUE.	ENV. CAN.	UQAM	FWI	CCIW	MOYENNE {C.V.}*
NaN ₃ (µg/l)	613 (506-723)**	424 (295-563)	644 (406-983)	696 --	771 --	879 (580-1502)	671 { 23 %}
Chrome (µg/l)	34 (9-72)	99 (89-109)	105 (39-310)	221 --	221 --	386 --	178 { 71 %}
Cadmium (µg/l)	27 --	2 (1 - 3)	4 (3 - 6)	16 (9 -25)	25 (20-31)	13 --	15 { 71 %}
Cuivre (µg/l)	21 --	11 (6 - 8)	10 --	17 --	14 --	10 --	14 { 38 %}

* C.V. : Coefficients de variation

** Limites de confiance (pour une distribution logarithmique; P: 0,05) indiquées entre parenthèses

** N.B.: Pour certaines CI50, les limites de confiance ne purent être déterminées avec une précision suffisante: on préféra alors indiquer --.

TABLEAU 1.5

EVALUATION DES CI50-24 H DES COMPOSES ORGANIQUES AVEC LES DIFFERENTES
SOUCHES DE *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS*

PRODUIT	INRS	ENV. QUE.	McGILL	MOYENNE {C.V.}*
Phéno1 (mg/l)	231 (193-286)**	293 (198-433)	286 —	270 { 13 %}
LSS*** (mg/l)	6,0 (3,5-8,4)	2,7 (1,7-3,9)	5,1 (3,2-7,7)	4,6 { 37 %}

* C.V. : Coefficients de variation

** Limites de confiance (pour une distribution logarithmique; P: 0,05) indiquées
entre parenthèses

*** LSS : Lauryl Sulfate de Sodium

TABLEAU 1.6

EVALUATION DES CI50-24 H DES COMPOSES INORGANIQUES AVEC LES DIFFERENTES
SOUCHES DE *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS*

PRODUIT	INRS	ENV. QUE.	McGILL	MOYENNE {C.V.}*
NaN ₃ (µg/l)	5670 (3805-6862)**	6315 (4414-7870)	7445 (5716-9924)	6477 { 14 %}
Chrome (µg/l)	961 (719-1220)	956 (709-1223)	389 (205-708)	769 { 43 %}
Cadmium (µg/l)	315 (138-519)	542 (233-791)	469 (286-761)	442 { 26 %}
Cuivre (µg/l)	32 (20-44)	35 (24-48)	22 (13-37)	30 { 22 %}

* C.V. : Coefficients de variation

** Limites de confiance (pour une distribution logarithmique;
P: 0,05) indiquées entre parenthèses

2. PROGRAMME 2 D'ACTIVITES: Evaluation rapide de la toxicité
avec des algues

a) Objectifs

- . Préciser la sensibilité des algues *Selenastrum capricornutum* à des toxiques simples à différents niveaux physiologiques après 1 à 4 jours de test et la comparer avec celle qu'on obtient après 7 à 14 jours de test
- . Vérifier si la toxicité des effluents peut être évaluée avec ces algues après 1 à 4 jours d'expérimentation

b) Problématique

Les tests de toxicité avec les algues *Selenastrum capricornutum* durent souvent 14 ou 21 jours, tel que recommandé par Greene et al. (1976), EPA (1978) et APHA et al. (1980); ces durées ont été préconisées afin de pouvoir nettement différencier les réponses au niveau de la croissance des cultures entre les algues traitées avec différentes concentrations du produit toxique étudié. Un délai de réponse de 14 ou 21 jours s'avère toutefois long et représente incontestablement un désavantage pour les tests de toxicité effectués avec *Selenastrum capricornutum* par rapport à ceux faits avec *Salmo gairdneri*, *Daphnia magna* et *Photobacterium phosphoreum* en 4 jours, 48 heures et 10 minutes respectivement bien que ces trois derniers tests soient moins sensibles (Joubert, 1981). Ce délai peut-il être raccourci? Vraisemblablement oui. De fait, en le réduisant de 14 à 7 jours, il a été récemment montré que la sensibilité des bioessais de toxicité avec *Selenastrum capricornutum* était accrue pour 36 effluents (Joubert, 1981). En deça de 7 jours, la réponse des algues à des produits toxiques a été peu expérimentée dans des tests de toxicité comme tels. Elle a plutôt été étudiée à des fins de connaissances fondamentales; par exemple, divers auteurs se

sont intéressés aux effets des métaux lourds sur la photosynthèse des algues après des brefs traitements (voir revue faite par Rai et al, 1981). Les informations fournies par de telles études indiquent que les composés toxiques agissent de façon manifeste en moins de 4 jours sur plusieurs paramètres biochimiques des algues, tels que la fluorescence, l'assimilation du carbone et l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). En adoptant ces trois derniers paramètres, des bioessais de toxicité de 4 jours et moins devraient alors être possibles avec *Selenastrum capricornutum*

Le second programme d'activités a expérimenté cette possibilité avec deux composés toxiques simples d'abord et ensuite avec deux effluents.

c) Protocole expérimental
.....

Parmi les souches de *Selenastrum capricornutum* (voir tableau 1.1), on a utilisé celle de l'INRS ou celle de l'UQAM selon les séries d'opérations. Les composés toxiques simples ont été choisis parmi ceux qui avaient été expérimentés au programme précédent (voir C.l.c.); on opta pour CuSO_4 et NaN_3 . Le premier effluent provenait d'une industrie de chimie organique (source confidentielle) et le second, qui servit également pour une étude de toxicité fractionnée (voir plus loin: 4), fut pris à une usine de placage de métaux (identité confidentielle): l'un et l'autre furent testés moins de 2 heures après leur échantillonnage.

Les opérations furent effectuées selon la démarche schématisée à la figure 2.1. Au moyen de tests préliminaires de fluorescence avec DCMU, on estimait d'abord le palier de concentrations où le produit étudié devenait toxique. On déterminait ensuite les effets de celui-ci à différentes concentrations sur la croissance en culture, la fluorescence, l'assimilation du carbone et/ou l'ATP après 1, 3, 4, 7 et/ou 14 jours d'incubation (voir B.6 à B.10 pour les techniques).

d) Résultats

(i) Composés toxiques simples

L'expérimentation avec CuSO_4 donna plus de 360 résultats. Afin d'éviter une présentation fastidieuse et enchevêtrée de ceux-ci dans des tableaux et afin de pouvoir visualiser les principales différences entre eux, on les a regroupés à la figure 2.2; ils y paraissent sous forme d'histogrammes de pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de Cu pour les 4 paramètres étudiés après 4 durées différentes de traitement. Les CI50 calculées à partir de ces pourcentages d'inhibition sont indiqués au tableau 2.1.

En examinant la figure 2.2 et le tableau 2.1, on constate que:

- . après 1 jour de test, il y avait une très nette inhibition des 4 paramètres physiologiques, laquelle devenait évidente à partir de $2 \mu\text{g Cu/l}$ et augmentait ensuite avec la concentration de Cu; de plus, pour une même teneur en Cu, les pourcentages d'inhibition se révélaient plus faibles au niveau de la croissance qu'aux niveaux de l'ATP, de la fluorescence et de l'assimilation du carbone, ce qui entraîne une CI50 de Cu quelque peu plus élevée pour la croissance que pour les 3 autres paramètres;
- . après 7 jours de test, les inhibitions dues aux teneurs inférieures de Cu ($<16 \mu\text{g/l}$) avaient considérablement diminué, voire disparu, sauf celles précisées au niveau de la fluorescence; subséquemment, hormis la CI50 déterminée pour ce dernier paramètre, les CI50 de Cu s'étaient accrues, ce qui traduit une réduction de la toxicité;
- . après 14 jours de test, les seules inhibitions évidentes n'étaient occasionnées que par les concentrations supérieures de Cu ($>16 \mu\text{g/l}$) et les CI50 avaient encore augmenté.

Il appert donc que la toxicité de Cu pour *Selenastrum capricornutum* diminuait avec la durée du test de 14 jours. Ceci ne devenait toutefois manifeste qu'au delà de 4 jours; en effet, entre 1 et 4 jours, la toxicité de Cu avait plutôt tendance à s'amplifier comme l'indiquent les différences entre les inhibitions survenues pendant 1 et 4 jours à des concentrations de 8 à 32 μg Cu/l.

Les résultats acquis avec NaN_3 pourraient être présentés de la même façon que ceux obtenus pour CuSO_4 mais ceci amènerait une redondance de présentation entre les deux séries de données. On a dès lors préféré résumer l'exposé des résultats de l'expérimentation avec NaN_3 en se limitant aux CI50 d'intérêt:

	Jour 1 (CI50 NaN_3)	Jour 4 (CI50 NaN_3)
Croissance	44,2 mg/l	0,6 mg/l
Assimilation du carbone	16,8 mg/l	0,3 mg/l
Fluorescence avec DCMU	12,0 mg/l	0,3 mg/l
ATP (Adénosine Tri Phosphate)	6,5 mg/l	0,4 mg/l

Les CI50 précisées au jour 7 et au jour 14 restaient assez proches de celles déterminées au jour 4.

Les valeurs précitées montrent que:

- . la toxicité de NaN_3 était nettement décelable après 1 jour de test;
- . elle s'avérait alors plus prononcée aux niveaux de l'ATP, de la fluorescence et de l'assimilation du carbone qu'au niveau de la croissance;
- . après 4 jours de test, NaN_3 était devenu beaucoup plus toxique et le restait ensuite.

En somme, les tests faits avec NaN_3 et CuSO_4 apportent des données qui soutiennent que la toxicité d'un composé chimique se décèle après 1 jour d'incubation chez *Selenastrum capricornutum* au niveau des paramètres biochimiques qui fournissent une réponse plus sensible que la croissance. Il ressort aussi que la toxicité du composé devient plus manifeste après 4 jours d'incubation et qu'au delà de cette durée, elle peut diminuer.

(ii) Effluents

Compte tenu des indications obtenues lors des tests avec les composés toxiques simples et étant donné que la fluorescence s'analyse plus facilement que les deux autres paramètres biochimiques utilisés (voir B.7 à B.9), l'expérimentation du premier effluent étudié a été restreinte à des durées de 1 à 4 jours d'incubation et au paramètre de la fluorescence en parallèle avec celui de la croissance chez *Selenastrum capricornutum*. De plus, afin d'éliminer l'influence des micro-organismes et des particules en suspension dans cet effluent, une stérilisation et une filtration préalables ont été effectuées.

Les données provenant de l'expérimentation du premier effluent sont regroupées à la figure 2.3. De manière générale, elles révèlent que:

- . après 1 jour d'incubation, l'effluent avait eu un effet stimulateur à basses concentrations (<10%) et un effet inhibiteur à hautes teneurs (>50%); à première vue, la toxicité due à ces dernières apparaissait plus prononcée au niveau de la croissance qu'au niveau de la fluorescence; cette différence surprenante provenait toutefois en partie d'un "artefact" expérimental, à savoir une agglutination des algues dans l'effluent, ce qui entraînait un "sous-dénombrement" des cellules par le compteur de particules malgré des essais de dispersion avec un détergent "Tween 80"; dans ces conditions, il est préférable de ne pas tenir compte des valeurs acquises pour le dénombrement de la croissance lors de cette expérimentation;
- . après 4 jours d'incubation, la stimulation causée par l'effluent à basses concentrations (<10%) était quelque peu réduite au niveau de la fluorescence; ses hautes teneurs ne provoquaient plus une inhibition mais plutôt une activation pour ce paramètre.

Le premier effluent étudié apparaissait peu toxique. En effet, après stérilisation et filtration, il n'occasionnait qu'environ 40% d'inhibition de la fluorescence chez *Selenastrum capricornutum*. Bien que peu prononcée, sa toxicité était toutefois décelable après 1 jour de test; elle semblait alors reliée à des composés azotés organiques et ammoniacaux, seuls composés en teneurs

élevées dans sa composition après stérilisation et filtration (tableau 2.2). Après 4 jours de test, elle était devenue quasiment nulle, ce qui montre l'importance de préciser le plus rapidement possible le potentiel toxique d'un effluent dans certains cas.

La toxicité du second effluent testé se révélait nettement plus forte et stable. De fait, sa CI50 - 3 jours se situait à respectivement 0,06% et 0,07% pour l'assimilation du carbone et la fluorescence chez *Selenastrum capricornutum* (voir figure 4.2 plus loin) et elle changeait seulement de 0,09% après 3 jours à 0,07% après 14 jours pour la croissance de cette algue. Sa haute toxicité résultait de 4 métaux lourds, soit Ni, Cr, Cu et Zn, lesquels étaient les seuls éléments en concentrations supérieures aux normes dans sa composition originale (voir tableau 4.1 plus loin). Le fait que cette toxicité restait stable soutient que ces 4 métaux lourds y persistaient sous leurs formes nocives et que son activité microbiologique et sa fraction particulaire, non éliminées par une stérilisation et filtration préalables, n'y occasionnaient pas de changement toxique décelable.

Bien que les deux effluents considérés aient été expérimentés différemment en ce qui concerne leur stérilisation et filtration et aient manifesté des degrés et des stabilités de toxicité très différents, les résultats acquis ont montré qu'il était possible et recommandé de préciser leur toxicité en 1 à 3 jours de test et qu'à cette fin, la fluorescence s'avérait un paramètre plus approprié que la croissance.

e) Interprétation

La relation inverse entre la durée d'action et la concentration d'un produit toxique (Warren, 1971) est limitée pour les algues *Selenastrum capricornutum*. Ceci s'est vérifié lors des quatre expériences de ce second programme d'activités, tel que stipulé ci-après.

- . La toxicité de CuSO_4 s'amplifiait certes durant 1 à 4 jours mais régressait par la suite. Cette diminution résulterait de deux mécanismes. D'une part, les algues secrèteraient des polypeptides qui complexeraient le cuivre et le rendraient ainsi graduellement moins biodisponible et moins toxique (Vandenberg et al, 1979). D'autre part, la spéciation de ce métal se transformerait progressivement à pH 8,5 de la photosynthèse et il y aurait alors une diminution des ions Cu^{++} très toxiques au profit d'autres formes moins toxiques (Guy et Ross Kean, 1980).
- . Le composé NaN_3 avait une toxicité qui augmentait pendant 1 à 4 jours et changeait peu ensuite pendant 14 jours.
- . L'expérimentation faite avec le premier effluent testé a montré que celui-ci occasionnait une faible toxicité qui se détectait au niveau de la fluorescence des algues après 1 jour mais point après 4 jours. En examinant sa composition, on peut penser que cette toxicité était due à des concentrations élevées en ammoniac et en composés azotés organiques. A pH 8,5 de la photosynthèse et à 25°C , l'ammoniac se répartit sous ses deux formes selon les proportions suivantes: 15% en NH_3 et 85% en NH_4^+ (APHA et al, 1980). Les ions NH_4^+ , étant des nutriments pour les algues (Greene et al., 1976; SIL, 1978), sont captés et métabolisés par celles-ci

et leur teneur diminue subséquemment avec la durée du test; concomitamment, par maintien d'équilibre chimique, la concentration de NH_3 régresse aussi proportionnellement. Ceci explique, au moins partiellement, que la toxicité de l'effluent se soit estompée en 4 jours dans les cultures de *Selenastrum capricornutum*. Il n'est pas impossible qu'un mécanisme analogue soit survenu pour ses composés azotés organiques. Le phénomène prédécrit ne peut être imputé à une activité microbologique de l'effluent car celui-ci avait été préalablement stérilisé et filtré. Les considérations énoncées ci-dessus permettent aussi de comprendre l'effet stimulateur que les basses teneurs d'effluent exerçaient sur les algues au premier jour du test. En effet, ses dilutions avaient considérablement abaissé sa concentration de NH_3 et conséquemment sa toxicité tandis que sa concentration de NH_4^+ , quoiqu'également très amoindrie, restait bénéfique aux algues. Ensuite, avec l'allongement du test entre 1 et 4 jours, les basses teneurs d'effluent devenaient moins stimulantes car leurs ions NH_4^+ étaient métabolisés et donc moins présents tandis que les teneurs plus élevées d'effluent devenaient stimulantes car elles s'avéraient riches en ions NH_4^+ tout en ayant perdu leur toxicité.

- Le haut degré de toxicité constaté après 3 jours pour le second effluent étudié restait quasiment inchangé après 14 jours.

Ces 4 séries de constatation peuvent être schématisées comme suit:

EVOLUTION DE LA TOXICITE DURANT LES TESTS AVEC
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM

	1 JOUR	3-4 JOURS	7 JOURS	14 JOURS
CuSO ₄	A C C R O I S S E M E N T		R E G R E S S I O N	
NaN ₃	A C C R O I S S E M E N T		M A I N T I E N	
Effluent #1	D I M I N U T I O N		--	
Effluent #2	--	TOXICITE FORTE	M A I N T I E N	

Cette synopsis montre qu'au delà d'une durée de 3 à 4 jours, la toxicité vis-à-vis de *Selenastrum capricornutum* ne change guère pour les produits stables et regresse pour d'autres produits et que, dans certains cas, elle ne peut être décelée qu'en deça de cette durée.

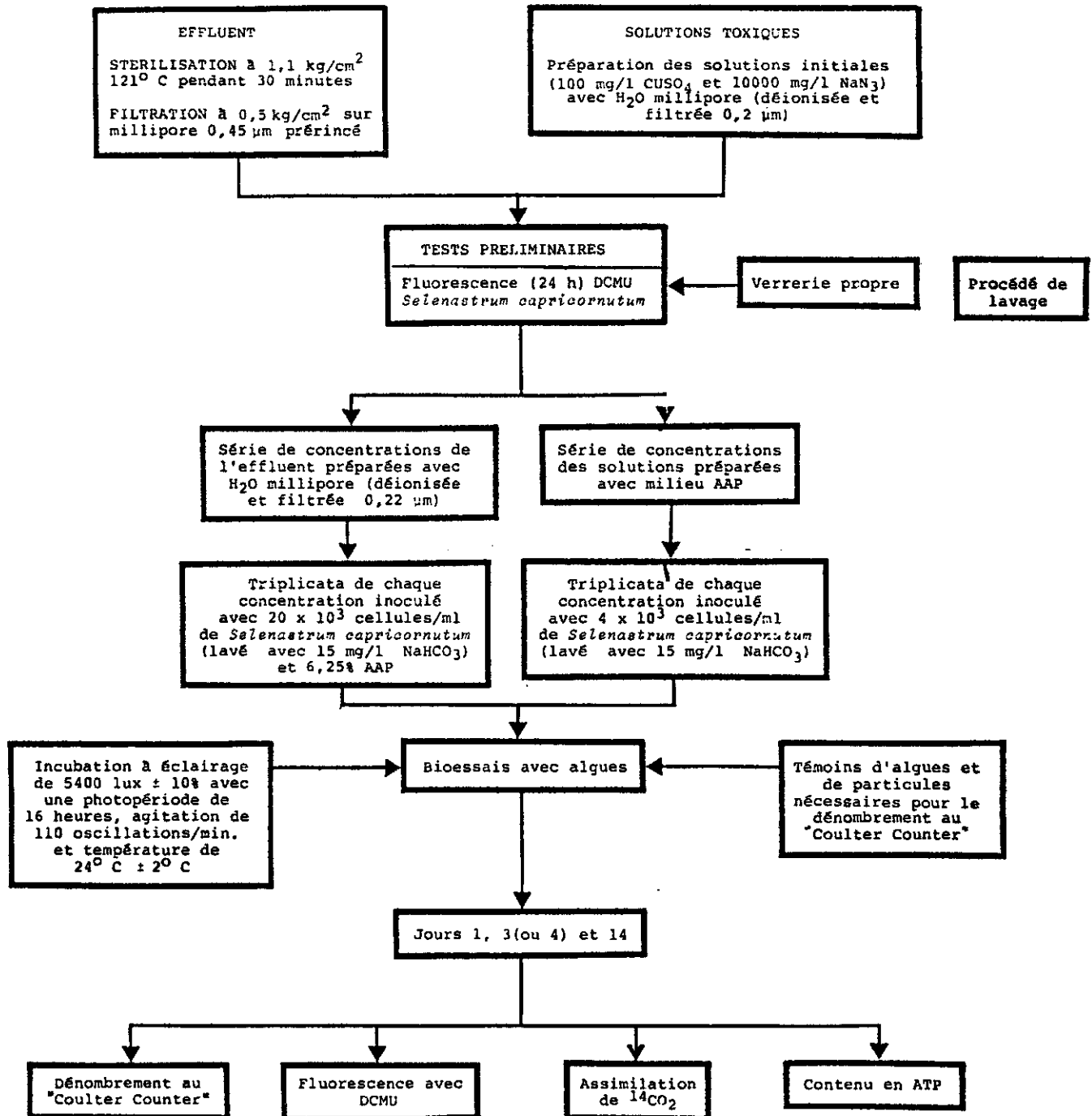
Les paramètres biochimiques s'avèrent plus sensibles que la croissance pour les tests de toxicité de 1 à 3-4 jours avec *Selenastrum capricornutum* comme l'indiquent plusieurs résultats de ce second programme d'activités. La croissance est en effet une résultante de plusieurs phénomènes biochimiques et, avant qu'une inhibition ne devienne manifeste à son niveau, elle

est précédée d'inhibitions de ces phénomènes (Lehninger, 1975). Il s'ensuit qu'un effet toxique se décèle plus vite et/ou plus intensément à court terme chez les algues en choisissant des paramètres tels que l'assimilation photosynthétique de carbone, la fluorescence inhérente à la photosynthèse, l'élaboration d'ATP ou l'anabolisme des protéines ou des acides nucléiques (Van Coillie et al, 1981 a et b). Parmi ces paramètres, la fluorescence est celui qui s'analyse le plus facilement et le plus rapidement; il y a donc lieu de le recommander.

Bref, la toxicité d'un composé ou d'un effluent peut être déterminée en 3-4 jours de test avec *Selenastrum capricornutum* et ceci se fait avec plus de sensibilité au niveau de la fluorescence ou d'un autre paramètre biochimique qu'au niveau de la croissance chez cette algue.

FIGURE 2.1

SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE LORS DE LA REALISATION DU PROGRAMME NO 2



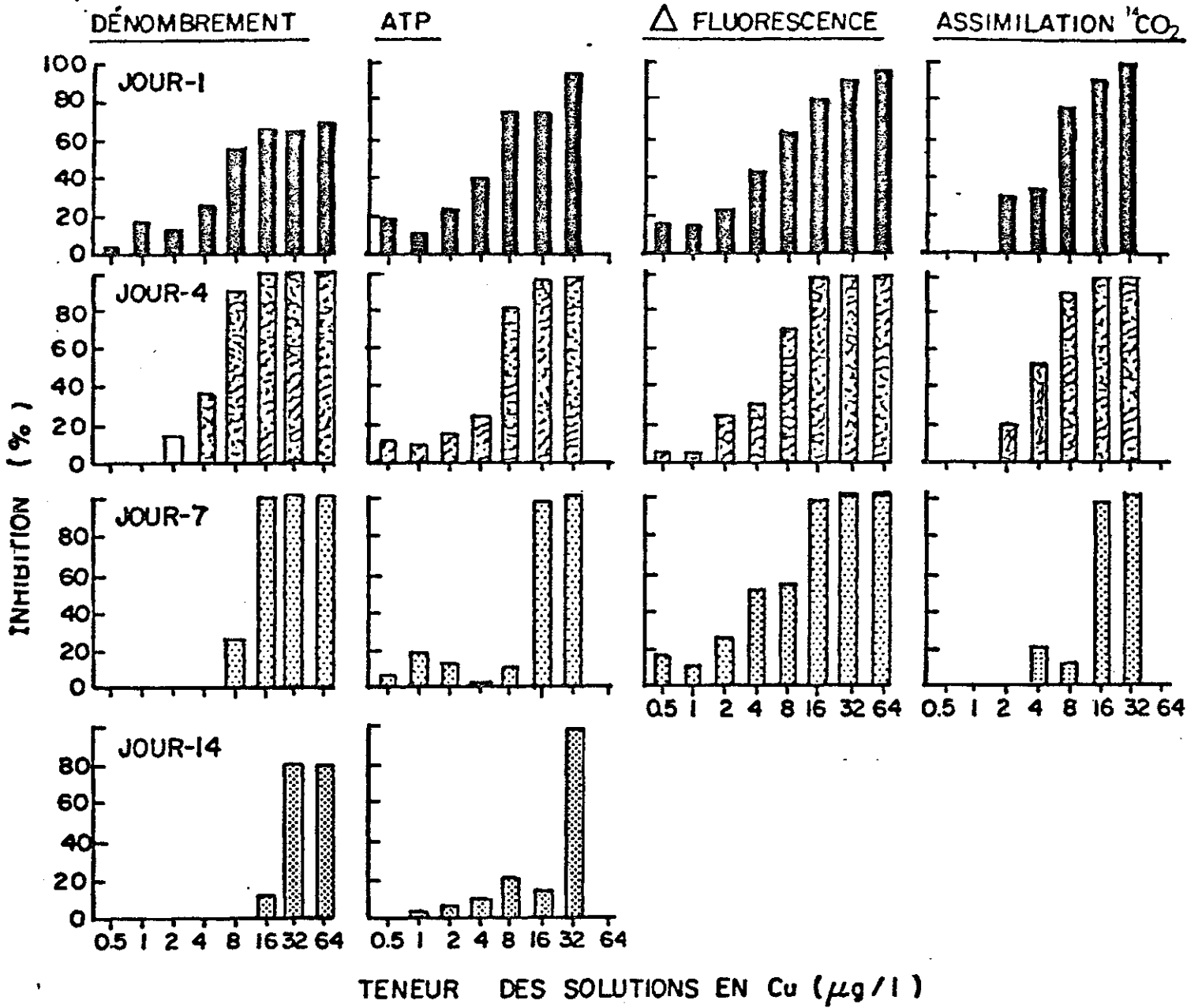
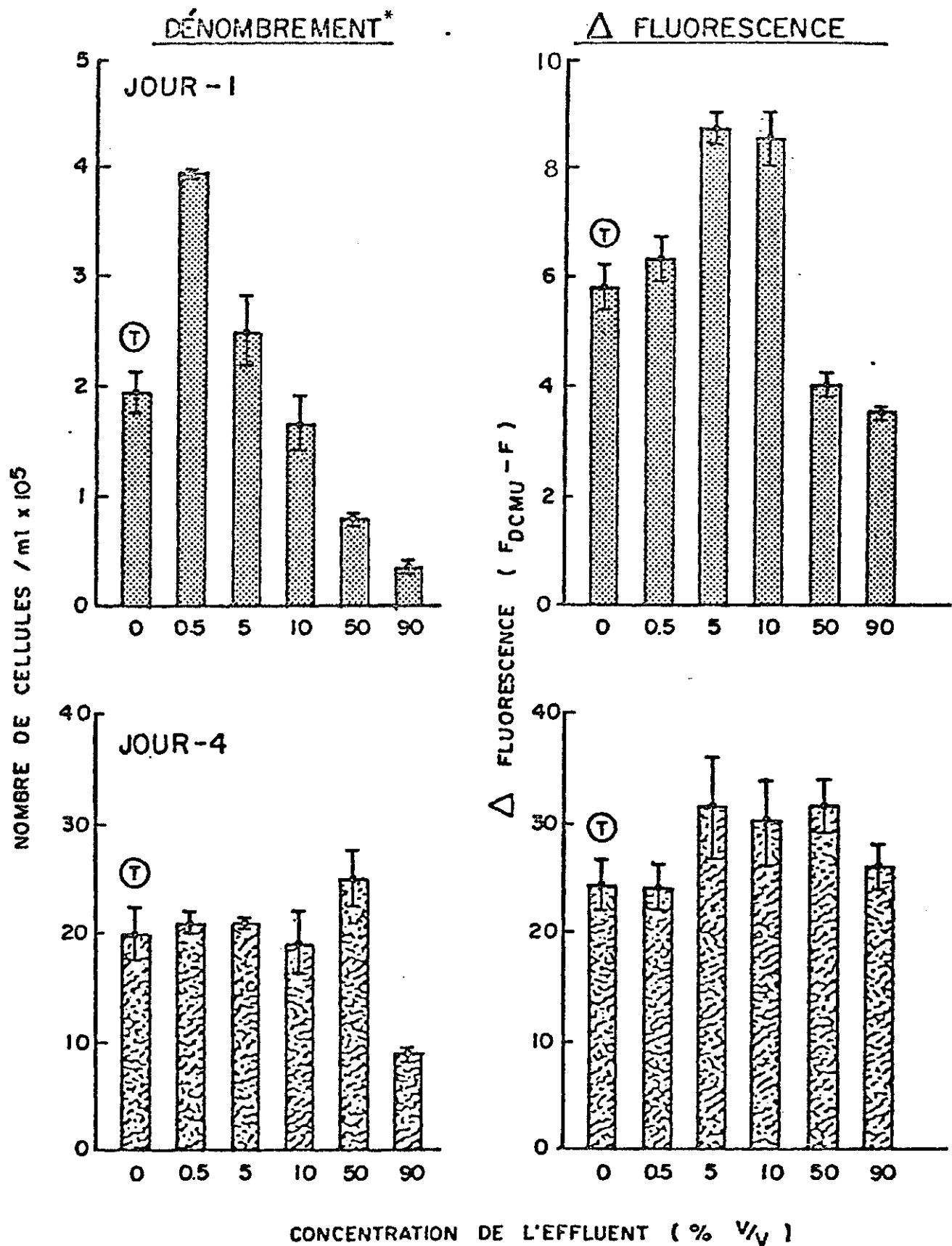


FIGURE 2.2 - EFFET INHIBITEUR DU SULFATE DE CUIVRE SUR LA CROISSANCE (DENOMBREMENT), L'ATP (ADENOSINE TRI-PHOSPHATE), LA FLUORESCENCE (F_{DCMU-F}) ET L'ASSIMILATION DE ¹⁴CO₂ CHEZ *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*



Ⓣ = TÉMOIN (AAP)

* Sous-évalué dans l'effluent car agglutination des algues.

FIGURE 2.3 - DETECTION DE LA TOXICITE D'UN EFFLUENT APRES 1 et 4 JOURS D'INCUBATION CHEZ *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* A L'AIDE DU DENOMBREMENT DE CROISSANCE ET DE LA FLUORESCENCE

TABLEAU 2.1

CI50 DU SULFATE DE CUIVRE POUR LA CROISSANCE (DENOMBREMENT),
L'ASSIMILATION DE $^{14}\text{CO}_2$, L'ATP ET LA FLUORESCENCE
CHEZ *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

DUREE	DENOMBREMENT CI50 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	ASSIMILATION DE $^{14}\text{CO}_2$ CI50 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	ATP (Adénosine Tri-Phosphate) CI50 ($\mu\text{g}/\text{l}$)	FLUORESCENCE ($^3\text{HDCMU-F}$) CI50 ($\mu\text{g}/\text{l}$)
JOUR 1	7 (5-8)	5 (3-8)**	5 (4-8)	5 (4-8)
JOUR 4	6 (3-8)	4 (3-6)	5 (4-8)	5 (4-8)
JOUR 7	9 (8-16)	9 (6-16)	12 (8-16)	4 (3-5)
JOUR 14	17 (16-32)	*	13 (8-32)	*

* Données inadéquates pour préciser une CI50

** Limites de confiance (pour une distribution logarithmique; P: 0,05) indiquées entre parenthèses

TABLEAU 2.2

CARACTERISATION CHIMIQUE D'UN EFFLUENT INDUSTRIEL
APRES STERILISATION* ET FILTRATION**

SUBSTANCE	CONCENTRATION ANALYSEE (mg/l)
N - total	278,0
N - NH ₃	15,40
N - NO ₂	0,04
N - NO ₃	3,52
Phosphates totaux	0,27
Ortho-phosphates	0,088
Phénols	0,008

* Stérilisation à 121°C et 1,1 kg/cm² durant 30 minutes

** Filtration Millipore 0,45 µm

N.B.: Analyses faites selon des techniques courantes (APHA et al,1980)

3. PROGRAMME 3 D'ACTIVITES: Evaluation de la toxicité originale des effluents et de ses changements ultérieurs avec des algues.

a) Objectifs

- . Préciser la toxicité des effluents bruts et frais pour les algues *Selenastrum capricornutum* et *Chlamydomonas variabilis*
- . Vérifier si la toxicité de ces effluents pour les deux algues change lorsqu'il y a un délai de quelques jours, une stérilisation et/ou une filtration
- . Comparer les résultats obtenus avec les algues avec ceux acquis en conditions analogues pour des truites *Salmo gairdneri*

b) Problématique

Très souvent, la toxicité d'un effluent est testée après des délais de transport et d'entreposage variant de 1 à 4 et parfois 7 jours. Elle peut se modifier durant de telles périodes. Cette possibilité est atténuée à 4°C et une telle température est recommandée pour le transport et l'entreposage des effluents; dans plusieurs cas, ceci n'est toutefois guère possible et se réalise à température courante de 24°C.

Généralement, quand on étudie la toxicité d'un effluent avec des algues, celui-ci est préalablement stérilisé par autoclavage afin d'en éliminer ses micro-organismes et ses algues éventuelles et il peut ensuite être filtré afin d'en enlever les particules en suspension (EPA, 1978). Ces opérations sont toutefois susceptibles de modifier la toxicité de l'effluent (Greene et al, 1976).

Vu ce qui précède, il y a lieu de favoriser la détection de la toxicité originale des effluents. Dans cette perspective, le troisième programme d'activités veut expliciter les changements de toxicité qui peuvent survenir dans un effluent durant 1 à 7 jours à 4°C et à 24°C ou lors d'une stérilisation et/ou filtration. Ils seront examinés vis-à-vis des algues *Selenastrum capricornutum* et *Chlamydomonas variabilis* et, à des fins de comparaison conventionnelle, vis-à-vis des poissons *Salmo gairdneri*.

c) Protocole expérimental
.....

Deux effluents d'industrie chimique ont été prélevés à des usines dénommées 1 et 2 par obligation confidentielle. Leur échantillonnage et leur transport dura moins de 90 minutes. A leur arrivée au laboratoire, un mélange était effectué dans chaque effluent et celui-ci était ensuite subdivisé en deux parts égales, l'une conservée à 4°C et l'autre placée à 24°C. Par la suite, la démarche représentée à la figure 3.1 fut appliquée. En bref, les opérations suivantes étaient faites après 0, 24, 96 et 168 heures de délai à 4°C et 24°C: analyses chimiques de l'effluent (techniques d'APHA et al, 1980), tests de croissance de 14 jours avec *Selenastrum capricornutum* (souche INRS) d'une part et *Chlamydomonas variabilis* (souche INRS) d'autre part (voir B.6) et bioessais statiques de survie avec *Salmo gairdneri* (Sprague, 1971; Environnement Canada, 1977 b). Parallèlement, on effectua les mêmes analyses, tests et bioessais après stérilisation (30 minutes à 121°C et 1,1 kg/cm²), filtration (Millipore 0,22 µm à 0,5 kg/cm²) ou stérilisation suivie par une filtration.

d) Résultats
.....

(i) Effluent No. 1
.....

La toxicité originale de cet effluent était très prononcée pour *Selenastrum capricornutum* (CI50-14 jours : 2%) et relativement faible pour *Chlamydomonas variabilis* (CI50-14 jours : 81%) (figure 3.2 et tableau 3.1).

Pendant 24 à 168 heures de délai à 4°C et 24°C, sa toxicité restait stable vis-à-vis de *Selenastrum capricornutum*; par contre, vis-à-vis de *Chlamydomonas variabilis*, elle augmentait durant les 24 premières heures à 4°C et surtout 24°C et regressait par la suite (figure 3.2).

La stérilisation changeait peu sa toxicité pour les deux algues tandis que la filtration la diminuait sensiblement; les deux opérations faites successivement la rendaient non décelable (figure 3.3 et tableau 3.1).

L'effluent se révélait peu létal pour *Salmo gairdneri* aussi bien à l'état original qu'après un délai de 24 à 168 heures à 4°C et 24°C, une stérilisation et/ou une filtration (moins de 20% de mortalité en 96 heures dans tous les cas, ce qui ne permit aucune détermination de LC50-96 heures).

(ii) Effluent No. 2
.....

Originellement, celui-ci s'avérait nettement toxique envers *Chlamydomonas variabilis* (CI50-14 jours : 12%) et non envers *Selenastrum capricornutum* (CI50-14 jours > 90%) (figure 3.4 et tableau 3.2).

Sa toxicité régressait durant 24 à 96 heures à 4° et surtout 24°C pour *Chlamydomonas variabilis*; après 96 heures, elle redevenait plus prononcée pour cette espèce et commençait à exercer des effets inhibiteurs chez *Selenastrum capricornutum* (figure 3.4).

Après stérilisation, elle était diminuée vis-à-vis de *Chlamydomonas variabilis* et était devenue évidente pour *Selenastrum capricornutum*. Après filtration, elle s'avérait encore plus atténuée envers la première espèce tandis qu'elle n'influençait apparemment point la seconde (figure 3.5). La succession des deux opérations entraînait respectivement une baisse et une manifestation de la toxicité pour l'une et l'autre (tableau 3.2).

La CL50-96 heures de l'effluent à l'état original pour *Salmo gairdneri* équivalait à 27%, ce qui traduit une évidente nocivité. Cette toxicité avait tendance à devenir quelque peu faible durant 24 à 168 heures à 4° et 24°C et lors d'une stérilisation et/ou filtration (figures 3.6 et 3.7).

(iii) Comparaison

A l'état original, l'effluent No. 1 se révélait nettement plus toxique envers *Selenastrum capricornutum* qu'envers *Chlamydomonas variabilis* tandis que c'était la situation inverse avec l'effluent No. 2. Vis-à-vis de *Salmo gairdneri*, le premier apparaissait peu létal contrairement au second. Leur composition chimique indiquait que le premier renfermait davantage d'ammoniac et moins de matière organique que le second (soit respectivement 23,2 > 15,4 mg/l en N-NH₃ et 59 < 162 mg/l

en DCO; notons ici que ces teneurs étaient les seules qui pouvaient être considérées comme excessives dans les deux effluents) (tableaux 3.1 et 3.2).

Après leur échantillonnage, leur toxicité changeait; ceci était beaucoup plus manifeste pour *Chlamydomonas variabilis* que pour *Selenastrum capricornutum* et *Salmo gairdneri*. La toxicité pour la première espèce s'amplifia pendant un jour et régressa ensuite dans l'effluent No. 1 tandis qu'elle diminuait durant 4 jours et réaugmenta par la suite dans l'effluent No. 2. Ces changements s'avéraient plus prononcés à 24°C qu'à 4°C. Par rapport à ceux-ci, aucune modification importante ne fut détectée dans la composition chimique des deux effluents.

La stérilisation et/ou la filtration des effluents pouvaient également influencer leur toxicité; les changements de celle-ci variaient alors avec les opérations et les effluents et se manifestaient différemment avec les espèces testées, tel qu'indiqué ci-après:

Espèces testées	Toxicité de l'effluent No. 1	Toxicité de l'effluent No. 2
-----------------	------------------------------	------------------------------

APRES STERILISATION

<i>Selenastrum capricornutum</i>	inchangée	augmentée
<i>Chlamydomonas variabilis</i>	inchangée	augmentée
<i>Salmo gairdneri</i>	inchangée	atténuée

Espèces testées	Toxicité de l'effluent No. 1	Toxicité de l'effluent No. 2
--------------------	---------------------------------------	---------------------------------------

APRES FILTRATION

<i>Selenastrum capricornutum</i>	diminuée	inchangée
<i>Chlamydomonas variabilis</i>	diminuée	diminuée
<i>Salmo gairdneri</i>	inchangée	atténuée

APRES STERILISATION ET FILTRATION

<i>Selenastrum capricornutum</i>	diminuée	augmentée
<i>Chlamydomonas variabilis</i>	diminuée	diminuée
<i>Salmo gairdneri</i>	inchangée	atténuée

La composition physico-chimique des deux effluents était modifiée par ces opérations: en effet, après celles-ci, ils renfermaient moins d'ammoniac, de matière organique et/ou de solides en suspension (tableaux 3.1 et 3.2).

e) Interprétation

Les tests de croissance avec les algues *Selenastrum capricornutum* et *Chlamydomonas variabilis* se sont révélés plus sensibles que les bioessais de survie avec les truites *Salmo gairdneri* pour déterminer la toxicité originale des deux effluents étudiés et pour expliciter ses variations ultérieures durant 7 jours à 4° et 24°C ou ses modifications après leur stérilisation et/ou filtration. De fait, lorsqu'elles pouvaient être calculées, les CI50-14 jours des deux effluents bruts et frais pour les algues s'avéraient inférieures à leurs CL50-96 heures pour les truites et les changements des CI50-14 jours étaient plus évidents que ceux des CL50-96 heures après 1 à 7 jours de délai à 4° ou 24°C ou après une stérilisation et/ou filtration (comparer notamment les figures 3.4 et 3.5 aux figures 3.6 et 3.7). Cette plus grande sensibilité des algues à la toxicité des effluents et à ses changements peut s'expliquer comme suit: leur inhibition de croissance est un phénomène sous-létal plus vulnérable et se différencie mieux après 14 jours de test que la létalité des poissons après 4 jours. Ces observations et d'autres analogues décrites par Joubert (1981) pour 36 effluents industriels soutiennent que des tests d'inhibition de croissance avec des algues peuvent être plus recommandables que des bioessais de létalité avec des poissons pour préciser la toxicité des effluents.

Cette dernière peut toutefois se manifester nettement pour une espèce et peu ou quasiment point pour une autre chez les algues et cette sensibilité spécifique varie avec les produits testés. En effet, la croissance de *Selenastrum capricornutum* était très inhibée par l'effluent No. 1 à

l'état original contrairement à celle de *Chlamydomonas variabilis* et la situation inverse prévalait avec l'effluent No. 2 (comparer les figures 3.2 et 3.4). Des sensibilités spécifiques analogues en fonction des produits testés ont également été constatées vis-à-vis des métaux lourds chez les algues (Rai et al, 1981) et vis-à-vis de divers composés toxiques chez les poissons (Warren, 1971). Compte tenu de ce facteur spécifique, il est préférable d'expérimenter plusieurs espèces pour déterminer la toxicité d'un effluent avec des algues.

En outre, celle-ci doit être testée le plus rapidement possible car elle peut se modifier durant des délais assez courts surtout à température courante (20-24°C). Ce fut le cas pour l'effluent No. 1 dont la toxicité envers *Chlamydomonas variabilis* augmenta pendant un jour et régressa par la suite ainsi que pour l'effluent No. 2 dont la toxicité envers cette espèce diminua durant 4 jours et se réamplifia ensuite, lesquels phénomènes étaient plus prononcés à 24°C qu'à 4°C (comparer les figures 3.2 et 3.4). Les facteurs impliqués dans ces changements sont les suivants (APHA et al, 1980) :

Facteurs influençant la transformation et/ou la biodisponibilité de certains composés toxiques	Augmentation de la toxicité	Diminution de la toxicité
Métabolisme des micro-organismes de l'effluent	X	X
Transformations photochimiques	X	X
Adsorption aux particules en suspension et/ou aux parois	--	X
Volatilisation	--	X

Lorsqu'on stérilise et/ou filtre les effluents avant les tests de croissance avec des algues, leur toxicité peut changer en fonction des opérations faites et des effluents testés; de plus, la sensibilité spécifique des algues devient alors différente (comparer les figures 3.3 et 3.5). Ces changements sont associés aux facteurs ci-après (Greene et al, 1976; EPA, 1978; APHA et al, 1980):

Facteurs influençant la transformation et/ou la biodisponibilité de certains composé toxiques	Augmentation de la toxicité	Diminution de la toxicité
--	-----------------------------------	---------------------------------

STERILISATION *

Suppression du métabolisme des micro-organismes de l'effluent	X	X
Oxydations	X	X
Précipitation	-	X
Volatilisation	-	X

* Joubert (1981) a constaté qu'après autoclavage, la somme des unités toxiques de 36 effluents industriels était significativement abaissée: ceci suggère que la stérilisation peut plus souvent et/ou plus intensément réduire la toxicité des effluents que l'augmenter.

Facteurs influencant
la transformation et/ou
la biodisponibilité de
certains composés toxiques

Augmentation
de la
toxicité

Diminution
de la
toxicité

FILTRATION

Réduction des particu-
les en suspension et
de leurs toxiques

-

X

Diminution des
micro-organismes de
l'effluent

X

X

Possibilité amoindrie
d'adsorption particulaire
des toxiques

X

-

STERILISATION

ET

FILTRATION

Infra ou supra-addi-
tivité des effets des
deux opérations

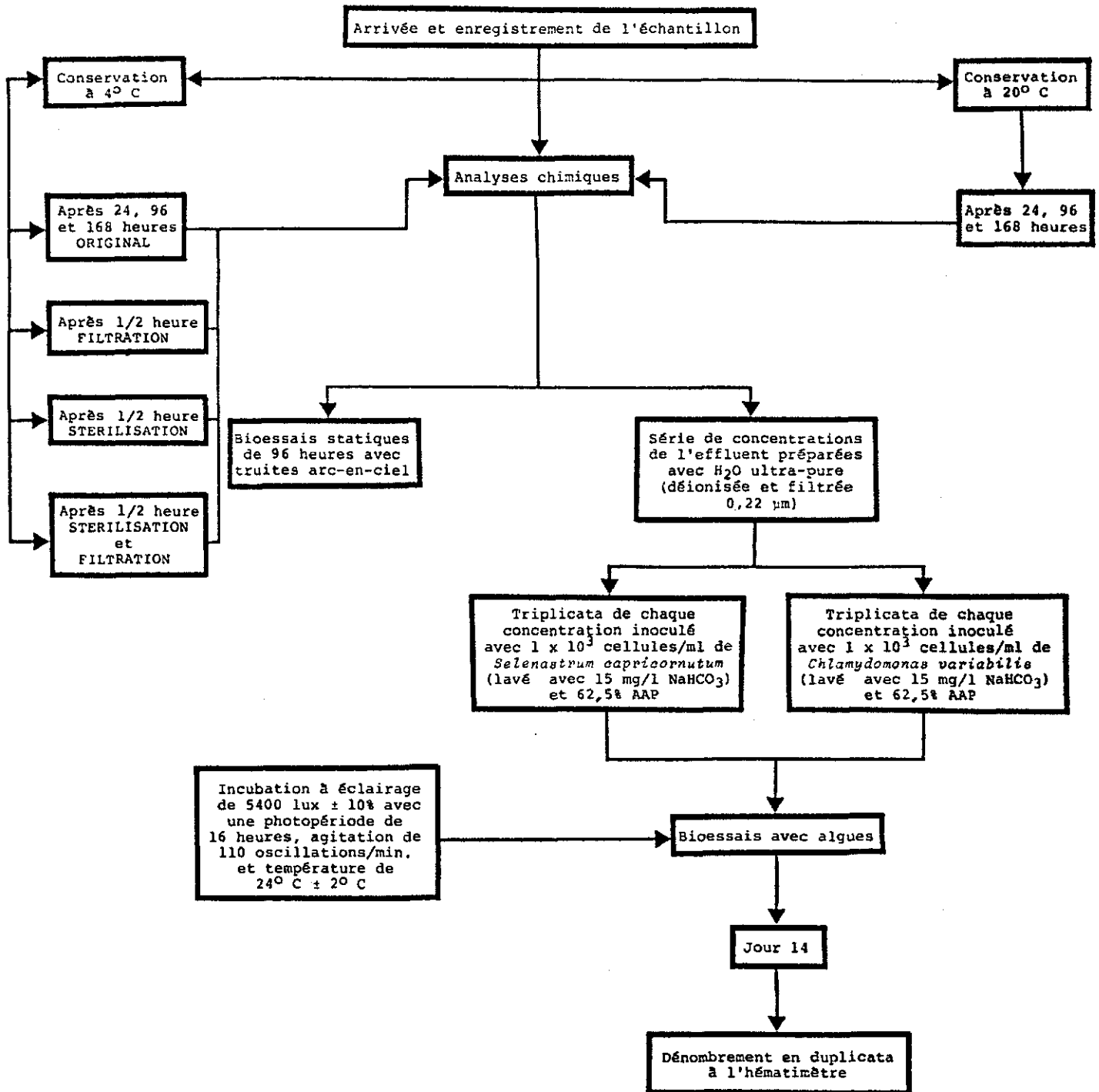
X

X

Il appert donc que, pour déterminer leur toxicité réelle avec des algues, les effluents doivent être expérimentés sans stérilisation et/ou filtration; il faut en outre qu'ils soient testés immédiatement après leur échantillonnage avec plusieurs espèces en parallèle. Vu que les tests de croissance d'algues n'exigent que des petits volumes d'effluent, ils peuvent être débutés *in situ* dans une installation mobile assez simple ou au laboratoire après seulement quelques heures, le transport de petites quantités d'effluent s'effectuant assez rapidement. Ceci avantage les tests avec algues par rapport aux bioessais avec poissons qui nécessitent des grands volumes d'effluent; de plus, les premiers se révèlent nettement plus sensibles que les seconds.

FIGURE 3.1

SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE LORS DE LA REALISATION DU PROGRAMME NO 3



CI50-14 JOURS (%)

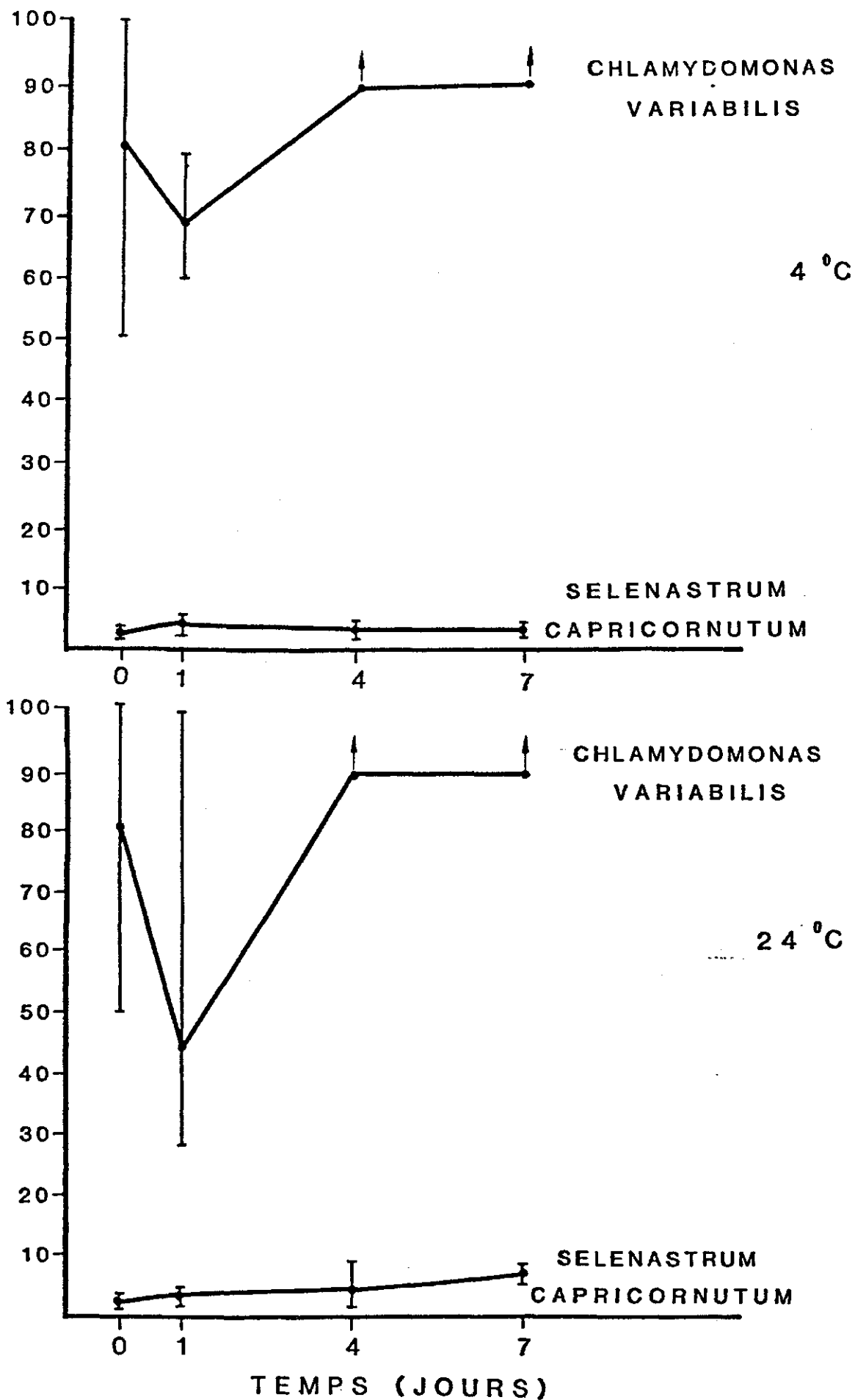


FIGURE 3.2 - VALEURS DES CI50-14 J DE L'EFFLUENT DE L'USINE 1 EN FONCTION DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS POUR *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* ET *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

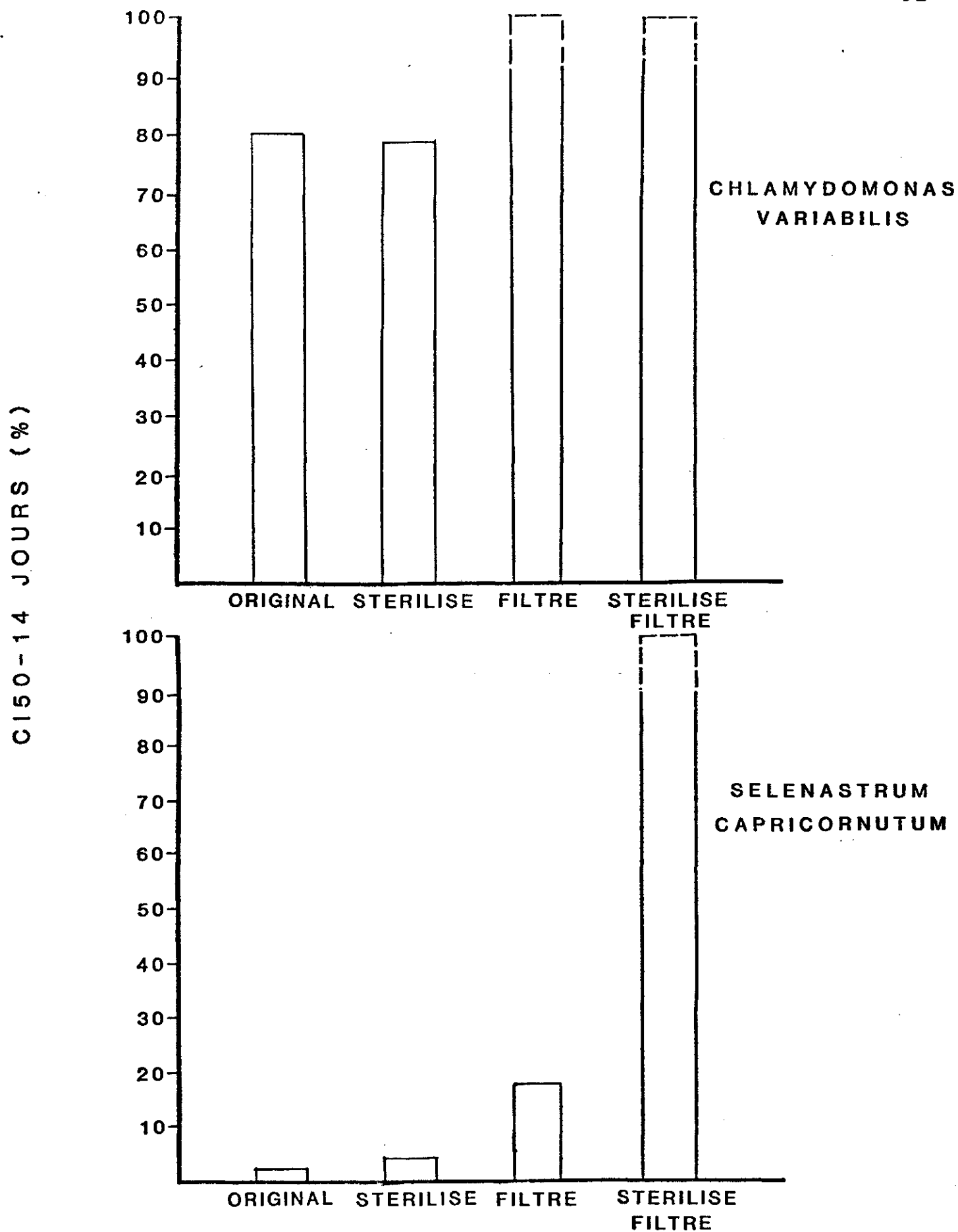


FIGURE 3.3 - VALEURS DES CI50-14 J DE L'EFFLUENT DE L'USINE 1 EN FONCTION DU TRAITEMENT DES ECHANTILLONS POUR *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* ET *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

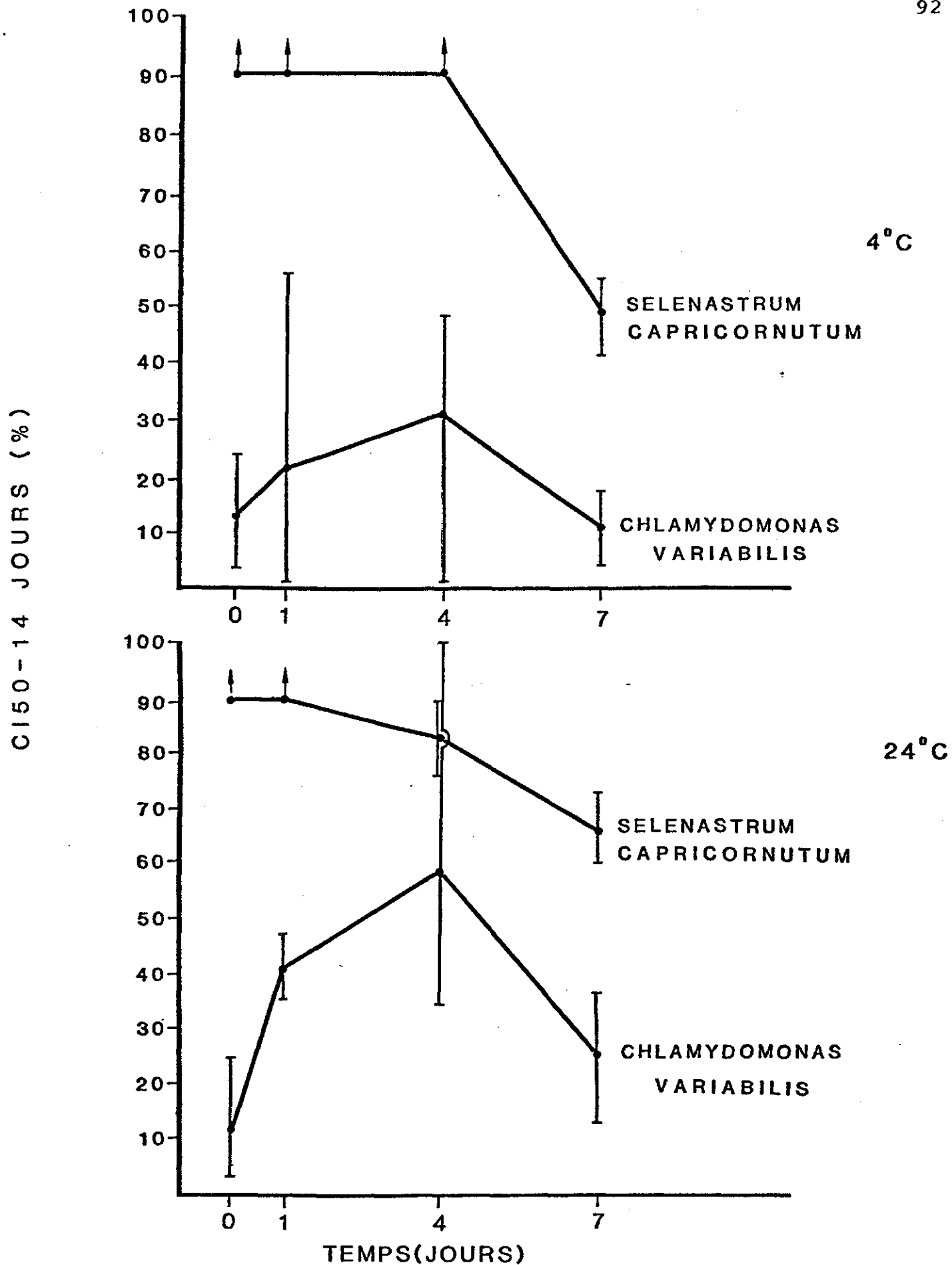


FIGURE 3.4 - VALEURS DES CI50-14 J DE L'EFFLUENT DE L'USINE 2 EN FONCTION DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS POUR *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* ET *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

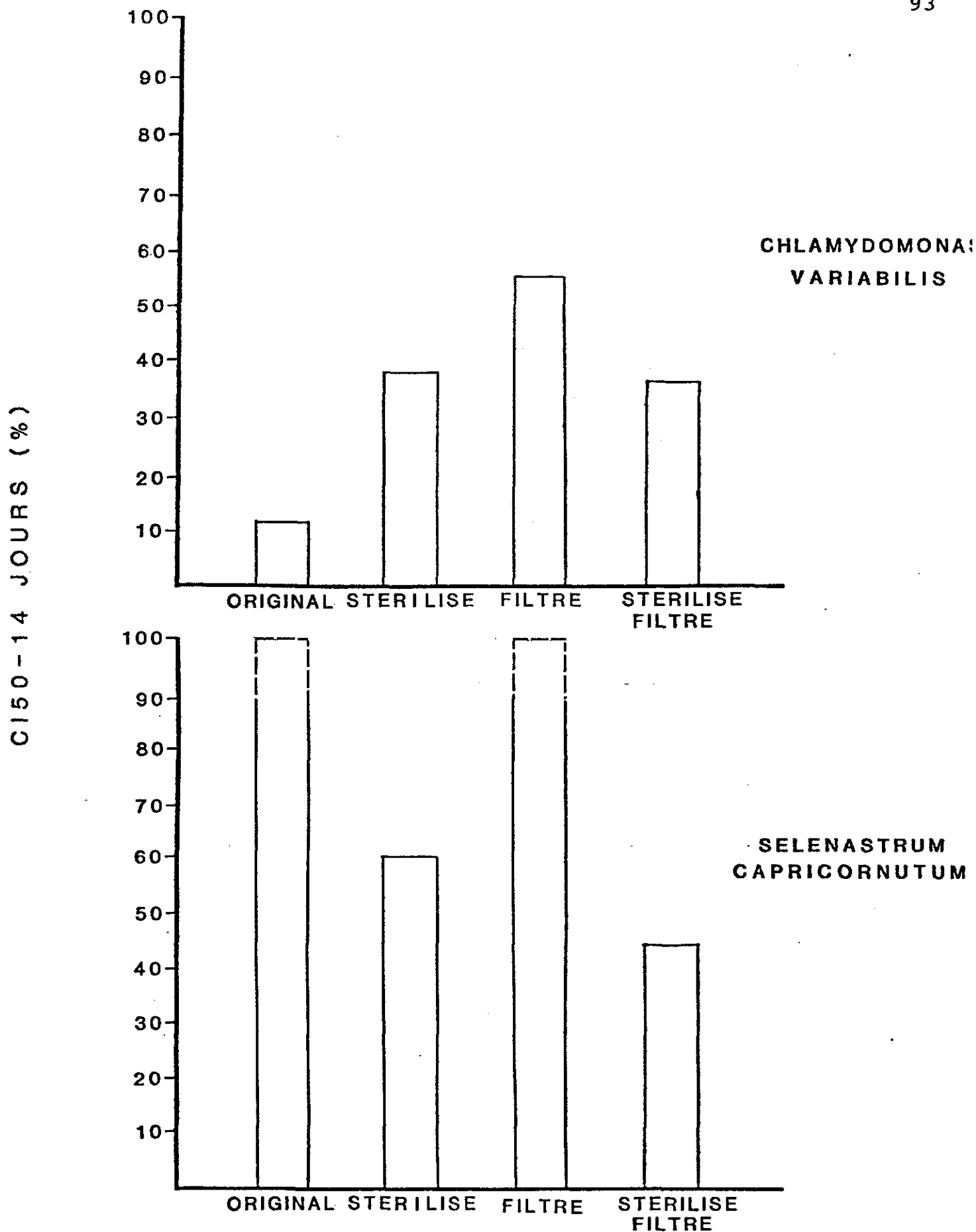


FIGURE 3.5 - VALEURS DES CI50-14 J DE L'EFFLUENT DE L'USINE 2 EN FONCTION DU TRAITEMENT DES ECHANTILLONS POUR *CHLAMYDOMONAS VARIABILIS* ET *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*

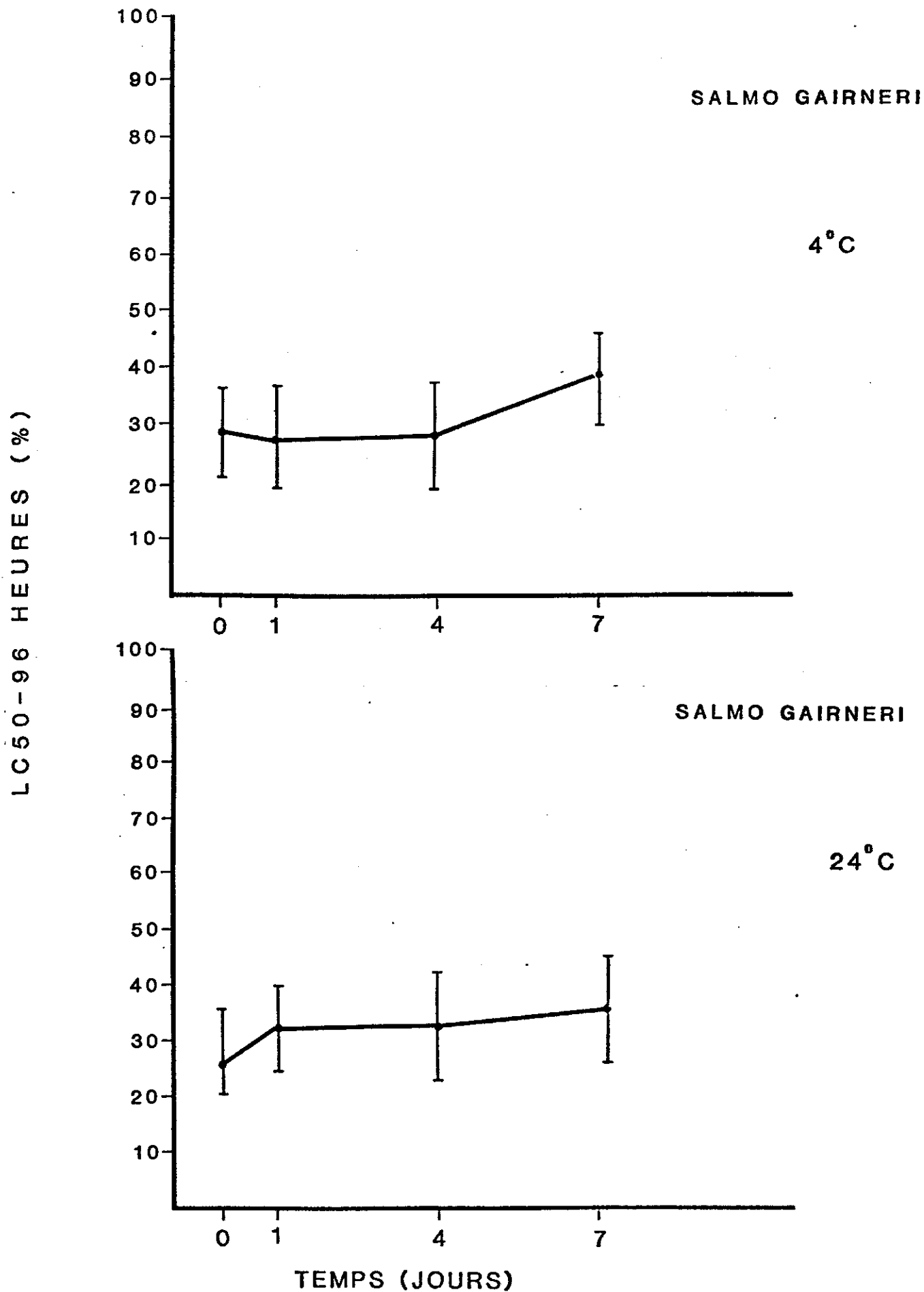


FIGURE 3.6 - VALEURS DES LC50-96 H DE L'EFFLUENT DE L'USINE 2 EN FONCTION DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE DE CONSERVATION DES ECHANTILLONS POUR LA TRUITE ARC-EN-CIEL.

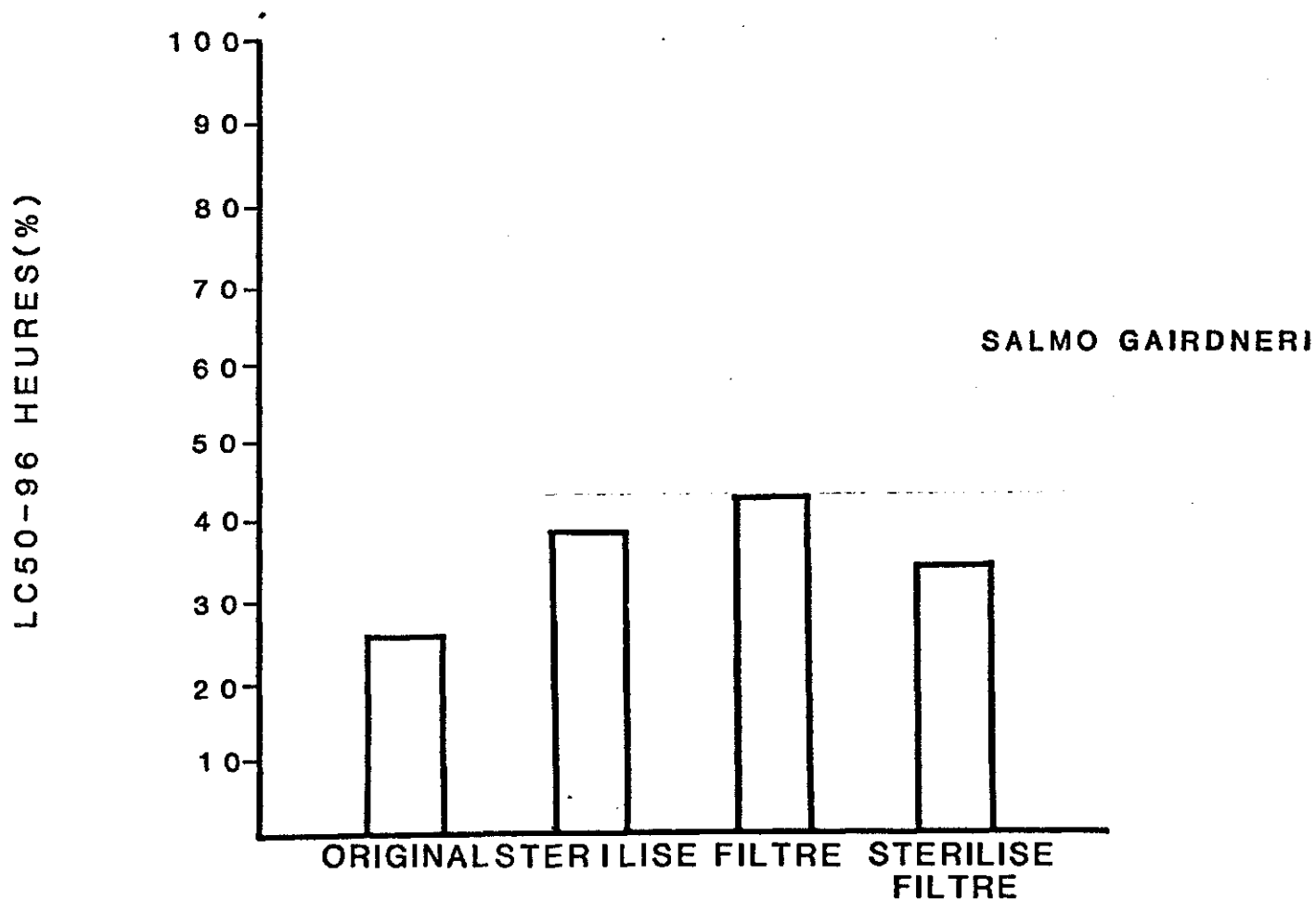


FIGURE 3.7 - VALEURS DES LC50-96 H DE L'EFFLUENT DE L'USINE 2 EN FONCTION DU TRAITEMENT DES ECHANTILLONS POUR LA TRUITE ARC-EN-CIEL

TABLEAU 3.1

RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO-CHEMIQUES ET DES BIOESSAIS DE L'EFFLUENT DE L'USINE 1
EN FONCTION DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE D'ENTREPOSAGE DES ECHANTILLONS
ET EN FONCTION DU TRAITEMENT DE CEUX-CI

ANALYSE (mg/l)	ORIG. 0h.	ORIG. 24h. 4°C	ORIG. 24h. 24°C	STERILISE	FILTRE	S+F	ORIG. 96h. 4°C	ORIG. 96h. 24°C
TNT (Trinitrotoluène)	1,3	1,2	1,4	--	--	--	--	--
Phénols	0,005	0,008	0,008	0,008	0,013	0,011	0,002	<0,002
N-NH ₃	23,2	20,2	18,5	11,2	23,2	16,7	19,3	17,6
Nitrates	38,6	26,7	25,5	26,7	24,3	25,5	32,1	30,6
Phosphates totaux	0,38	0,26	0,29	0,06	0,33	0,08	0,28	0,29
Sulfates	9,1	9,1	8,3	8,0	8,7	8,3	8,3	8,3
COT	16	16	17	13	14	11	15	15
DCO	59	57	51	56	37	41	40	40
Solides dissous	994	997	976	--	1094	1073	841	882
en suspension	38	29	28	--	14	8	33	24
totaux	1032	1026	1004	--	1108	1081	874	906
LC50-96h. (%) (Truites):	seulement 20% mortalité après 96 heures							
C150-14J. (%) (SELENASTRUM)	2	4	4	4	18	>90	3	5
C150-14J (%) (CHLAMYDOMONAS)	81	67	46	78	>90	>90	>90	>90

N.B.: ORIG. = Effluent original
COT = Carbone Organique Total
DCO = Demande Chimique en Oxygène
S+F = Stérilisation + Filtration

Analyses faites selon des techniques courantes (APHA et al., 1980)

TABLEAU 3.2

RESULTATS DES ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES ET DES BIOESSAIS DE L'EFFLUENT DE L'USINE 2
 EN FONCTION DE LA DUREE ET DE LA TEMPERATURE D'ENTREPOSAGE DES ECHANTILLONS
 ET EN FONCTION DU TRAITEMENT DE CEUX-CI

ANALYSE (mg/l)	ORIG. 0h.	ORIG. 24h. 4°C	ORIG. 24h. 24°C	STERILISE	FILTRE	S+F	ORIG. 96h. 4°C	ORIG. 96h. 24°C
N-NH ₃	15,4	14,0	14,0	8,1	13,4	6,1	10,6	13,4
Nitrites	0,16	0,16	0,18	0,17	0,17	0,22	0,20	0,58
Nitrates	0,39	0,39	0,64	0,77	0,39	0,97	0,22	0,24
Ortho-phosphates	0,10	0,06	0,09	0,11	<0,01	0,02	0,07	0,22
Phosphates totaux	0,58	0,51	0,51	0,64	0,07	0,07	0,61	0,63
COT	127	94	182	122	63	104	178	198
DCO	162	169	211	169	84	92	190	208
Solides dissous	1465	1466	1497	1537	1428	1552	1523	1414
en suspension	93	87	118	96	25	23	116	116
totaux	1558	1553	1615	1633	1453	1575	1639	1530
LC50-96h. (%) (Truites)	27	26	32	38	42	34	28	33
CI50-14J. (%) (SELENASTRUM)	>90	>90	>90	60	>90	44	> 90	83
CI50-14J. (%) (CHLAMYDOMONAS)	12	21	40	38	55	37	31	58

N.B.: ORIG. = Effluent Original
 COT = Carbone Organique Total
 DCO = Demande Chimique en Oxygène
 S+F = Stérilisation + Filtration

Analyses faites selon des techniques courantes (APHA et al, 1980)

4. PROGRAMME 4 D'ACTIVITES: Evaluation de la toxicité
d'un effluent et de ses com-
posantes principales avec
des algues

a) Objectifs
.....

- . Préciser quelles sont les fractions chimiques toxiques pour des algues dans un effluent
- . Vérifier si les toxicités de ces fractions sont antagonistes ou synergiques

b) Problématique
.....

Lorsque la toxicité d'un effluent est déterminée, on désire souvent savoir quels sont les agents les plus néfastes dans celui-ci. A cette fin, il faut d'abord analyser l'effluent pour en identifier les principales fractions chimiques. Ensuite, la toxicité de celles-ci peut être testée en utilisant des fractions synthétiques équivalentes. Une-telle étude de toxicité dite "fractionnée" est parfois faite avec des truites; à notre connaissance, elle n'a jamais été tentée avec des algues.

Le quatrième programme d'activités a précisé la toxicité fractionnée d'un effluent pour *Selenastrum capricornutum* au niveau de trois paramètres, soit la croissance, la fluorescence et l'assimilation du carbone.

c) Protocole expérimental
.....

Un effluent industriel fut pompé à une usine de placage de métaux, intitulée usine 3 (source confidentielle). Moins de 2 heures après son échantillonnage, il fut analysé selon des méthodes courantes (APHA et al, 1980) et testé pour sa toxicité originale. Celle-ci et, par la suite, sa toxicité fractionnée furent déterminées en suivant la démarche résumée à la figure 4.1. Essentiellement,

cette démarche consista à préciser les CI50 de l'effluent original et synthétique d'abord, de ses principales fractions ensuite et des regroupements binaires de celles-ci finalement envers l'algue *Selenastrum capricornutum* (souche UQAM), plus précisément pour sa fluorescence et son assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ après 3 jours de test et pour sa croissance après 14 jours de test.

Le traitement des données exigea un développement particulier. Pour chaque produit testé, les moyennes respectives des résultats obtenus pour la croissance, la fluorescence et l'assimilation du $^{14}\text{CO}_2$ ont été comparées par analyse de variance. Le nombre de données par échantillon étant restreint à 3 valeurs, une analyse de variance non paramétrique, à savoir le test de Kruskal Wallis (Zar, 1974), a été adoptée : elle consistait à assigner des rangs aux diverses données et à comparer ensuite ceux-là plutôt que celles-ci. On décelait ainsi s'il y avait égalité ou inégalité significative ($P:0,95$) entre trois moyennes. Dans le cas d'une inégalité, trois possibilités existaient, soit:

$$\mu_1 = \mu_2 \neq \mu_3$$

$$\mu_1 \neq \mu_2 = \mu_3$$

$$\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Ces possibilités étaient vérifiées et regroupées à l'aide des tests dits de "comparaisons multiples des moyennes", notamment celui de Duncan (Nie et al, 1975)

d) Résultats
.....

L'effluent original était très toxique. De fait, ses CI50-3 jours étaient voisines de 0,06% et 0,07% pour la fluorescence et l'assimilation du carbone chez *Selenastrum capricornutum* et sa CI50-14 jours pour la croissance de cette espèce se situait au même palier à 0,07% (figure 4.2).

Sa composition chimique renfermait quatre métaux lourds en concentrations excessives, soit par ordre décroissant de teneurs Ni (68,0 mg/l), Cr (21,4 mg/l), Cu (7,6 mg/l) et Zn (2,1 mg/l) (tableau 4.1).

Pour vérifier si cette combinaison des quatre métaux lourds s'avérait seule responsable de la toxicité de l'effluent, on la testa avec *Selenastrum capricornutum* en respectant les concentrations respectives de chaque élément. On obtint alors pour cet effluent synthétique des CI50 très voisines de celles déterminées pour l'effluent original, ce qui indique qu'il était représentatif de celui-ci pour la toxicité envers l'algue (figure 4.2).

Par la suite, compte tenu du fait que les CI50 de l'effluent original ou synthétique se trouvaient à très basses concentrations (0,04 à 0,07%), il fut décidé d'expérimenter à 0,3% la toxicité de cet effluent et celle de ses quatre fractions toxiques, lesquelles correspondaient alors à 204, 64, 23 et 6 µg/l pour Ni, Cr, Cu et Zn. Les résultats de cette expérimentation sont rassemblés à la figure 4.3 .

Ils montrent que:

- . les fractions de Ni et Cu se révélèrent très néfastes tandis que celles de Cr et Zn exerçaient peu d'effet (excepté la teneur de Cr qui occasionnait une réduction partielle de l'assimilation du carbone);
- . les pourcentages d'inhibition induits par les quatre fractions et leurs regroupements binaires étaient beaucoup plus départagés pour la croissance de *Selenastrum capricornutum* après 14 jours de test que pour la fluorescence et surtout l'assimilation du carbone chez cette espèce après 3 jours de test.

Les analyses de variance et les tests de comparaisons multiples des moyennes ont fait ressortir les indications suivantes à partir des résultats (figure 4.4):

- . les fractions Ni et Cu seules, additionnées ou combinées avec celles de Cr et Zn exerçaient des inhibitions statistiquement équivalentes (P:0,95) à celles de l'effluent original ou synthétique pour la croissance et l'incorporation du $^{14}\text{CO}_2$ chez *Selenastrum capricornutum*;
- . elles se différenciaient significativement (P:0,95) des fractions Cr, Zn et Cr + Zn par leur toxicité pour les deux paramètres précités;
- . vis-à-vis de la fluorescence de l'algue, il y avait la décroissance toxique ci-après entre les fractions:

Ni + Cu > Ni + Cr > Ni + Zn > Ni, Cu > Cu + Zn, Cu + Cr > Cr + Zn, Zn > Cr

e) Interprétation
.....

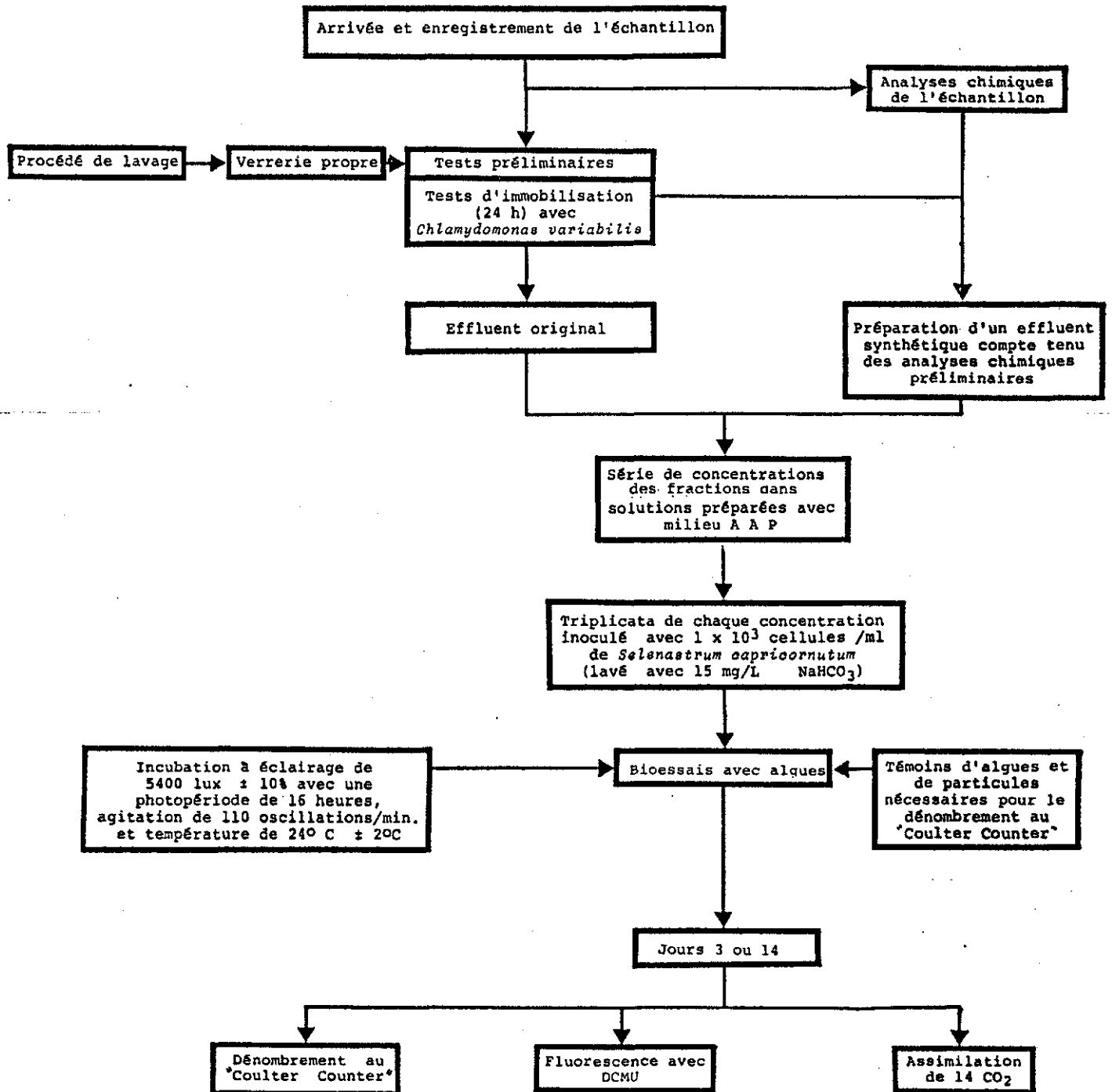
Dans l'effluent dilué à 0,3%, la toxicité était due aux fractions de Ni et Cu vu que celles de Cr et Zn influençaient peu *Selenastrum capricornutum*. Ceci peut s'expliquer par les différences entre les concentrations de ces quatre métaux lourds. En effet, Ni et Cu s'y trouvaient à des teneurs respectives de 204 et 23 µg/l qui s'avéraient largement supérieures à leurs valeurs considérées comme toxiques envers les algues, soit 25 µg/l pour Ni (Rai et al, 1981) et 7 à 14 µg/l pour Cu (voir plus haut C.1.d et C.2.d). Par contre, les teneurs de Cr et Zn correspondant respectivement à 63 et 6 µg/l y étaient nettement plus basses que les valeurs toxiques de ces deux éléments envers les algues, à savoir 178 µg/l pour Cr (voir plus haut C.1.d) et 2 mg/l pour Zn (Rai et al, 1981).

Les fractions Ni et Cu causaient une toxicité statistiquement égale. Par ailleurs, le regroupement de la fraction Ni avec celle de Cr ou Zn occasionnait une toxicité plus prononcée pour la fluorescence de *Selenastrum capricornutum* que le regroupement de la fraction Cu avec celle de Cr ou Zn: ceci soutient qu'un synergisme supra-additif d'action existait entre Ni et les deux autres métaux tandis qu'un antagonisme infra-additif d'action semblait être présent entre Cu et ceux-ci.

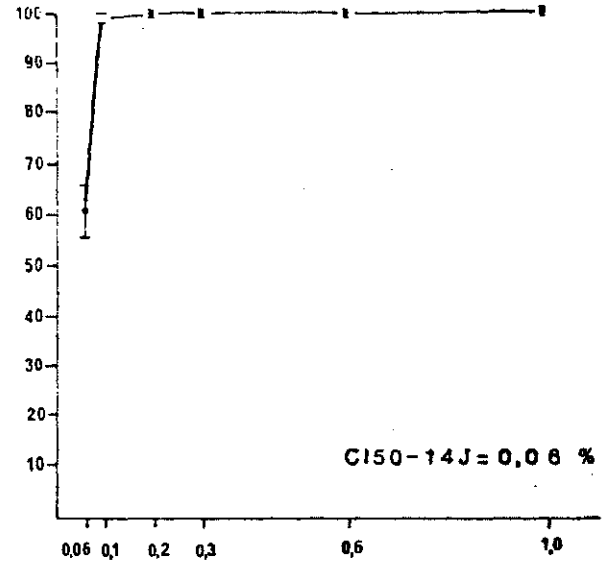
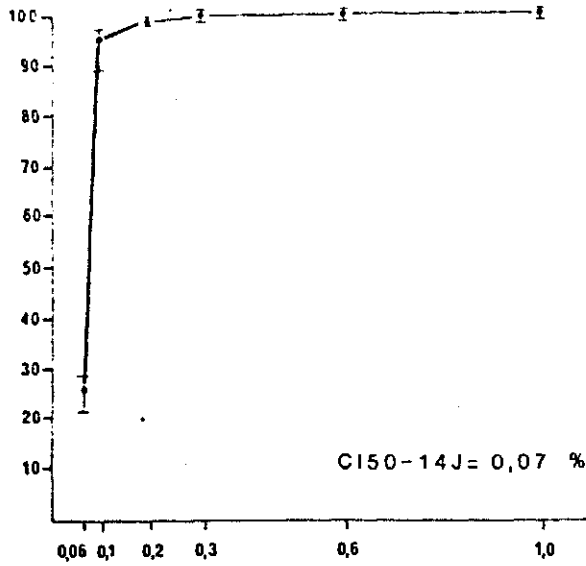
L'expérimentation faite démontre que la toxicité fractionnée d'un effluent peut être précisée avec des algues *Selenastrum capricornutum* et qu'à cette fin, l'inhibition de la fluorescence après 3 jours de test s'avère plus révélatrice que celle de la croissance après 14 jours de test. Notre étude indique également que, dans le cas d'un effluent très toxique, il faut tester des échantillons très dilués pour mieux différencier les toxicités de ses fractions et leurs additivités.

FIGURE 4.1

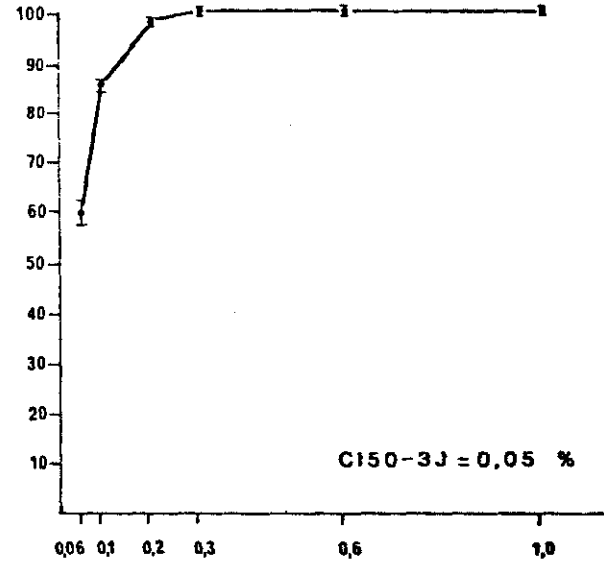
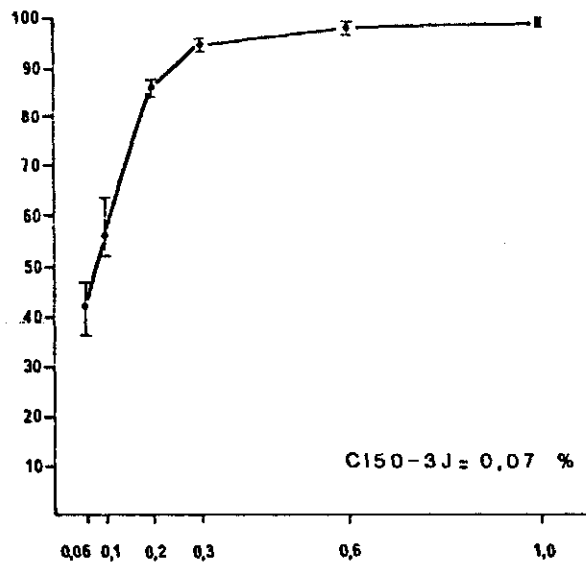
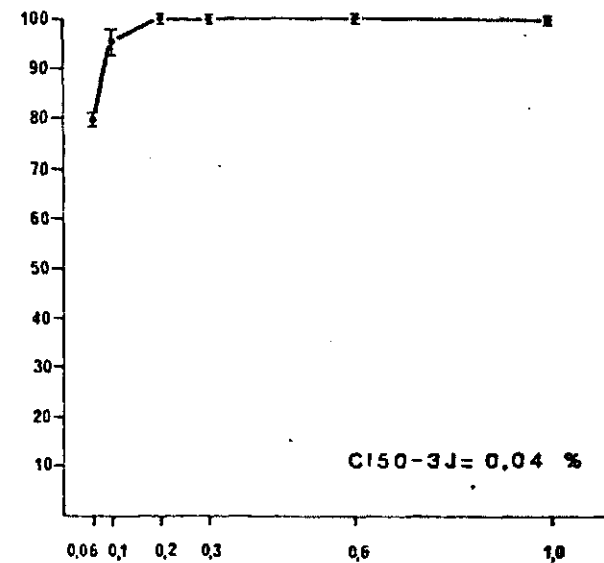
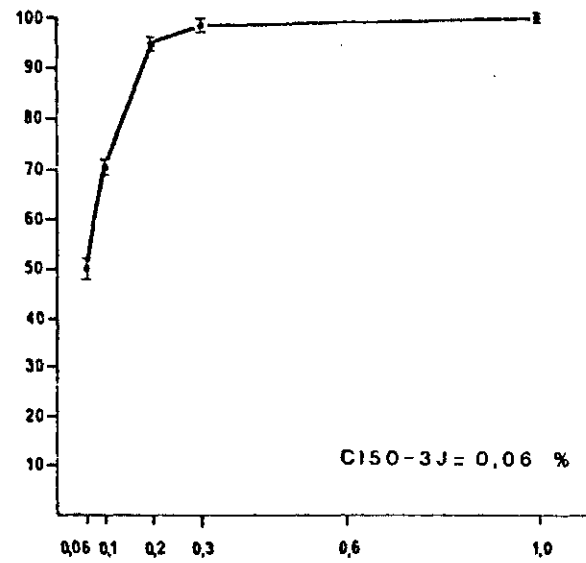
SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE LORS DE LA REALISATION DU PROGRAMME NO 4



DENOMBREMENT

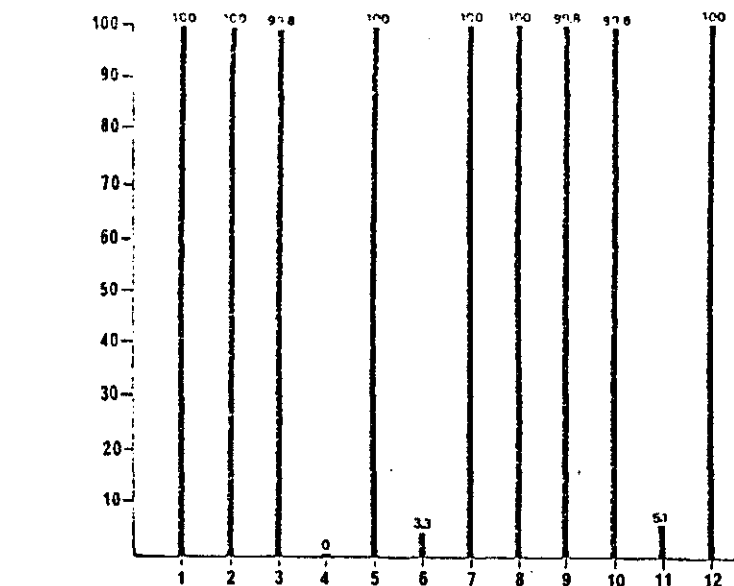
 Δ FLUORESCENCE

INHIBITION (%)

ASSIMILATION $^{14}\text{CO}_2$ 

CONCENTRATION DE L'EFFLUENT (%)

FIGURE 4.2 - INHIBITION DE LA CROISSANCE, FLUORESCENCE ET ASSIMILATION DE $^{14}\text{CO}_2$ CHEZ *DESIGNACORUM CAPNICORNUTUM* (L.) EXPOSE A L'EFFLUENT ORIGINAL ET SYNTHETIQUE DE L'USINE-3



1- ORIGINAL* 0,3%

2- SYNTHETIQUE 0,3%

3- Ni, 204µg/l

4- Cr, 64 µg/l

5- Cu, 23 µg/l

6- Zn, 6 µg/l

7- Ni, 204µg/l + Cr,64 µg/l

8- Ni, 204µg/l + Cu, 23 µg/l

9- Ni, 204µg/l + Zn, 6 µg/l

10- Cr, 64 µg/l + Cu, 23 µg

11- Cr, 64 µg/l + Zn, 6 µg/l

12- Cu, 23 µg/l + Zn, 6 µg/l

* effluent usine 3

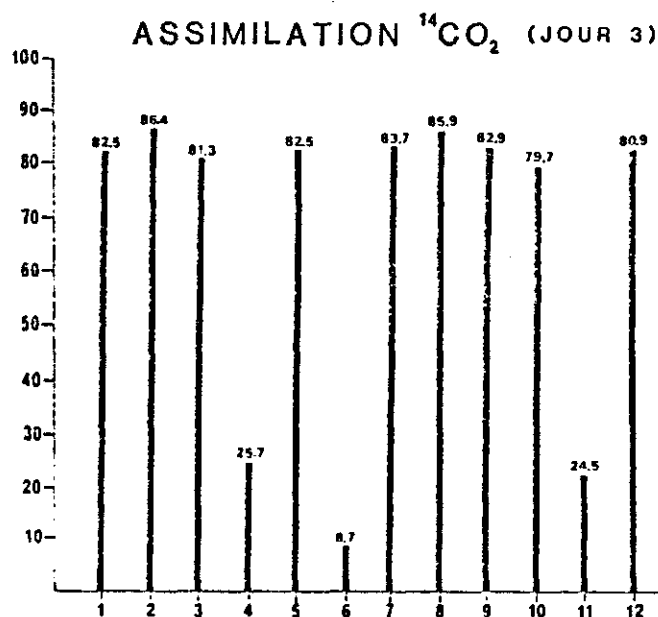
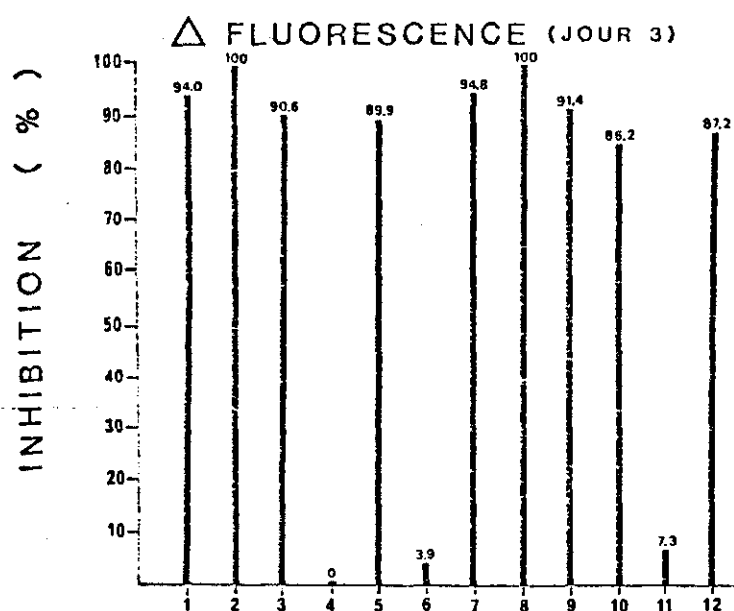
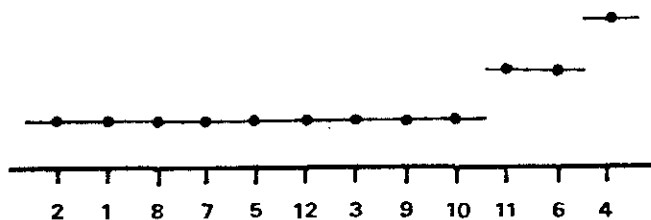
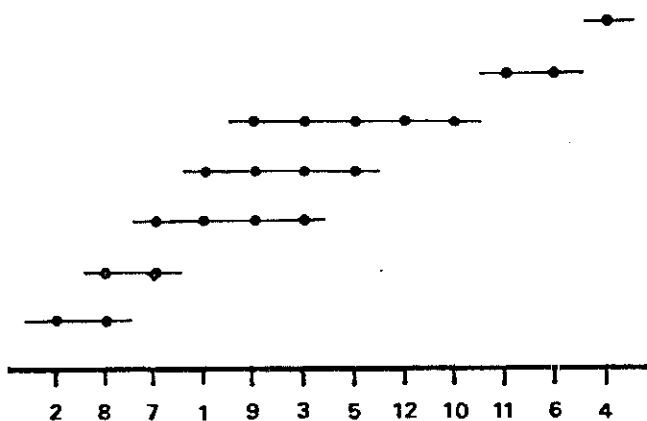


FIGURE 4,3 - INHIBITION DE LA CROISSANCE, DE LA FLUORESCENCE ET DE L'ASSIMILATION DU ^{14}CO CHEZ *SEBENACTRUM CARPICORANTUM* EXPOSE A DES FRACTIONS DE L'EFFLUENT DE L'USINE 3.

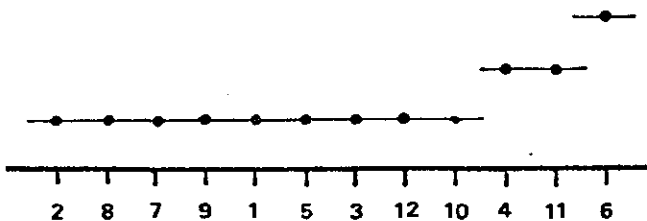
FRACTIONS REGROUPEES A PARTIR DU TEST DE DUNCAN (P = 0,05)



△ FLUORESCENCE (jour 3)



ASSIMILATION CO₂ (jour 3)



- 1- ORIGINAL* 0,3%
- 2- SYNTHETIQUE 0,3%
- 3- Ni, 204µg/l
- 4- Cr, 64 µg/l
- 5- Cu, 23 µg/l
- 6- Zn, 6 µg/l
- 7- Ni, 204µg/l + Cr, 64 µg/l
- 8- Ni, 204µg/l + Cu, 23 µg/l
- 9- Ni, 204µg/l + Zn, 6 µg/l
- 10- Cr, 64 µg/l + Cu, 23 µg/l
- 11- Cr, 64 µg/l + Zn, 6 µg/l
- 12- Cu, 23 µg/l + Zn, 6 µg/l
- * effluent usine 3

ORDRE DE REGROUPEMENT DES FRACTIONS

FIGURE 4.4 - REGROUPEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS OBTENUS CHEZ *SELENASTRUM CADNICOPNUTUM* EXPOSE A DES FRACTIONS DE L'EFFLUENT DE L'USINE 3 (TEST DE COMPARAISONS MULTIPLES DES MOYENNES)

TABLEAU 4.1

CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE L'EFFLUENT ORIGINAL DE
L'USINE 3

SUBSTANCE	CONCENTRATION ANALYSEE (mg/l)	CONCENTRATION TOTALE TOLEREE* (mg/l)
Matières totales en suspension	102	30
Cadmium	n.d. **	1,5
Chrome	21,4	1,0
Cuivre	7,6	1,0
Plomb	n.d.	1,5
Zinc	2,1	2,0
Nickel	68,0	2,0
Cyanures oxydables	n.d.	0,1
totaux	<0,003	3,0
Ortho-phosphates	0,01	--
Phosphates totaux	0,03	--

* Environnement Canada (1977b)

** n.d. : non détecté

N.B.: Analyses faites selon des techniques courantes (APHA et al., 1980)

5. PROGRAMME ADDITIONNEL 5 D'ACTIVITES: Evaluation de la
possibilité de tests
de mutagénicité avec
des algues

a) Objectifs

- Préciser si des composés mutagènes reconnus peuvent induire chez l'algue *Selenastrum capricornutum* un changement facilement décelable dans sa morphologie après quelques générations.
- Vérifier si, après son apparition, ce changement morphologique persiste lorsqu'on transfère l'algue en milieu normal, ce qui traduirait un effet mutagène.

b) Problématique

Différents produits organochlorés fréquents dans des effluents de même que certains composés organiques présents dans des eaux ayant été traitées par chlorination sont mutagéniques (Rokosh et Lavasz, 1979; Rapson et al 1980; Grabow et al, 1980). Leur mutagénicité a été mise en évidence à l'aide du test d'Ames, lequel utilise des bactéries *Salmonella typhimurium* qui ne doivent plus importer et peuvent synthétiser leur histidine après une mutation causée par plusieurs produits activés avec un complexe microsomal énergétique.

Des composés organochlorés mutagéniques provoquent aussi des changements chez *Selenastrum capricornutum*. En effet, on a remarqué que la tétrachloroacétone et la dichlorohydroxybenzaldéhyde entre autres occasionnaient une modification morphologique chez l'algue; celle-ci qui présente normalement un aspect enroulé devenait rectiligne au cours des

génération successive en présence de ces produits (Eco-Recherches, données non publiées). La même transformation survenait également lorsque l'algue était traitée avec des polyélectrolytes organiques utilisés pour la floculation des eaux; elle persistait ensuite quand on transférait les cultures de *Selenastrum capricornutum* dans un milieu normal. Toutes ces observations nous ont amenés à penser que le déroulement constaté chez l'algue pouvait correspondre à un effet mutagénique.

Le cinquième programme d'activités examine cette possibilité d'effet mutagénique avec trois polyélectrolytes organiques et surtout avec deux composés mutagènes reconnus, à savoir le phtalate de potassium et le 5-fluorouracyle (Lehninger, 1975).

c) Protocole expérimental

La figure 5.1 schématise les opérations qui ont été faites avec trois polymères cationiques (P_1 , P_2 et P_3 étaient respectivement une polyamine M502, un polyacrylamide M855 et une polyamine M1190 de provenance confidentielle), le phtalate de potassium et le 5-fluorouracyle. On déterminait d'abord la toxicité de ces produits pour *Selenastrum capricornutum* (souche UQAM) avec des tests d'inhibition de croissance durant 14 jours. A la fin de ces tests, on examinait les cultures au microscope pour déceler les changements morphologiques survenus chez l'algue. Ensuite, après une brève centrifugation répétée deux fois, les cultures étaient transférées dans un milieu sans toxique pour vérifier si les modifications morphologiques observées demeureraient dans les générations ultérieures en conditions normales pendant au moins une semaine.

d) Résultats

Les cinq composés testés se révélèrent assez toxiques envers l'algue *Selenastrum capricornutum*; leurs CI50-14 jours pour la croissance de cette espèce équivalaient aux valeurs suivantes (figure 5.2 et tableau 5.1):

0,02 mg/l	pour le	5-fluoro-uracyle
0,30 mg/l	" "	polyélectrolyte P ₂
1,20 mg/l	" "	polyélectrolyte P ₁
16,80 mg/l	" "	polyélectrolyte P ₃
36,10 mg/l	" "	phtalate de potassium

A des concentrations supérieures à leurs CI50, plus précisément aux teneurs qui occasionnaient 80 à 98% d'inhibition de croissance, les produits provoquaient des modifications morphologiques chez *Selenastrum capricornutum*; notons toutefois que celles-ci ne purent être observées dans le cas du polyélectrolyte P₃, car on ne l'expérimenta qu'à des concentrations inférieures à sa CI50-14 jours (figure 5.2 et tableau 5.1). Ces modifications, présentes dans 20 à 30% des cellules des cultures, étaient des variantes d'un déroulement de l'algue (figures 5.3, 5.4 et 5.5).

Après transfert des cultures dans un milieu normal, ce déroulement continuait à être observé durant au moins une semaine.

e) Interprétation
.....

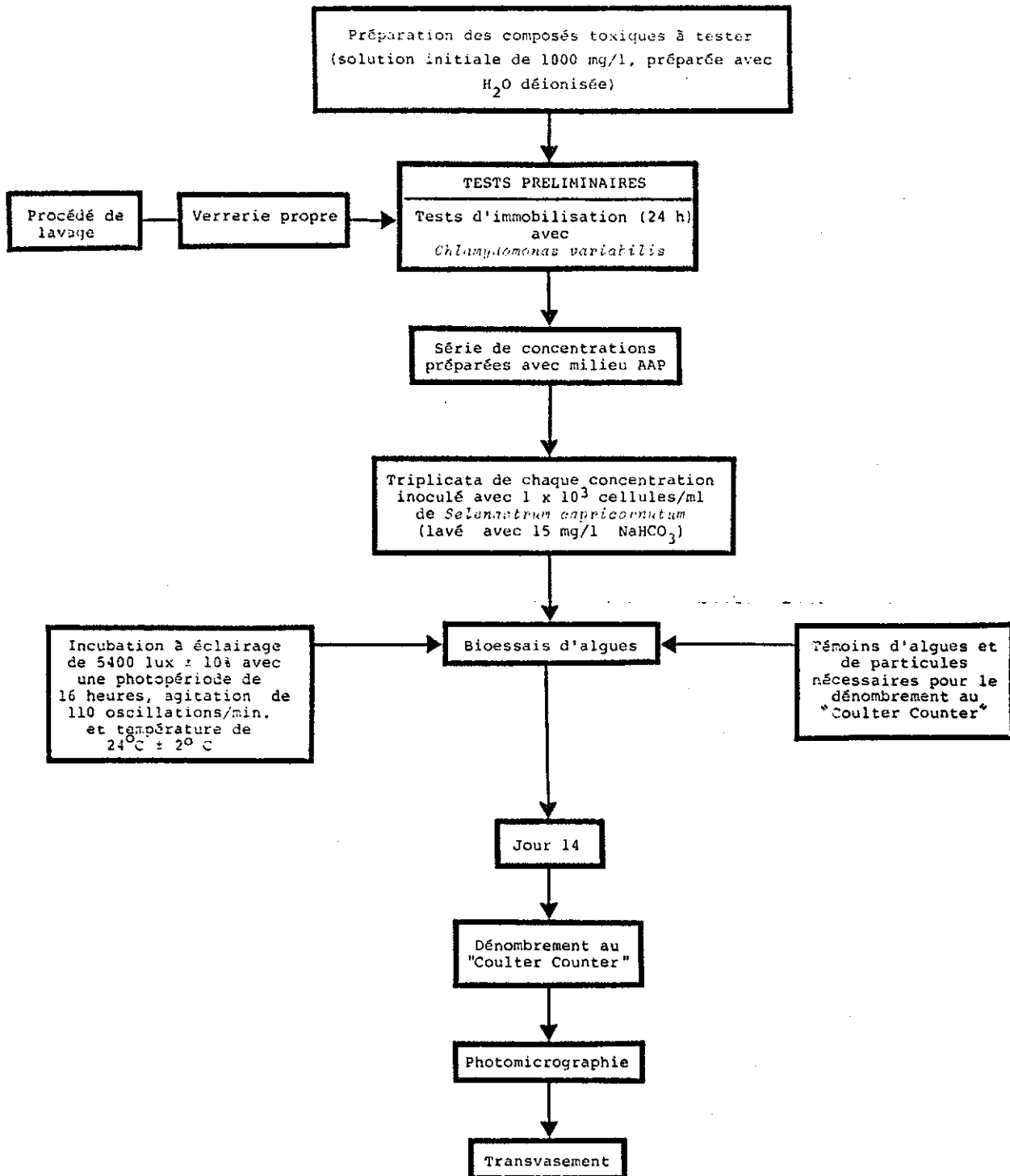
Les divers composés qui induisent une mutagénicité chez *Salmonella typhimurium* n'exercent cet effet qu'à des concentrations supérieures à leurs LC50 pour la bactérie (Rapson et al, 1980). Similairement, les cinq produits qui causent un déroulement chez *Selenastrum capricornutum* n'exercent cet effet qu'à des teneurs supérieures à leurs CI50 pour l'algue.

Certes, il ne faut pas exclure qu'un tel déroulement puisse être provoqué par un phénomène non mutagénique. Il pourrait par exemple résulter d'une distorsion de la membrane cellulaire ou d'une altération plus globale associée à une nécrose chez l'algue. Mais, dans ce cas, une persistance du changement en milieu normal s'explique difficilement.

Il y a plutôt lieu de retenir la possibilité que ce déroulement de *Selenastrum capricornutum* qui est occasionné par deux agents mutagènes reconnus et d'autres composés correspond à un effet mutagénique.

FIGURE 5.1

SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE LORS DE LA REALISATION DU PROGRAMME NO 5



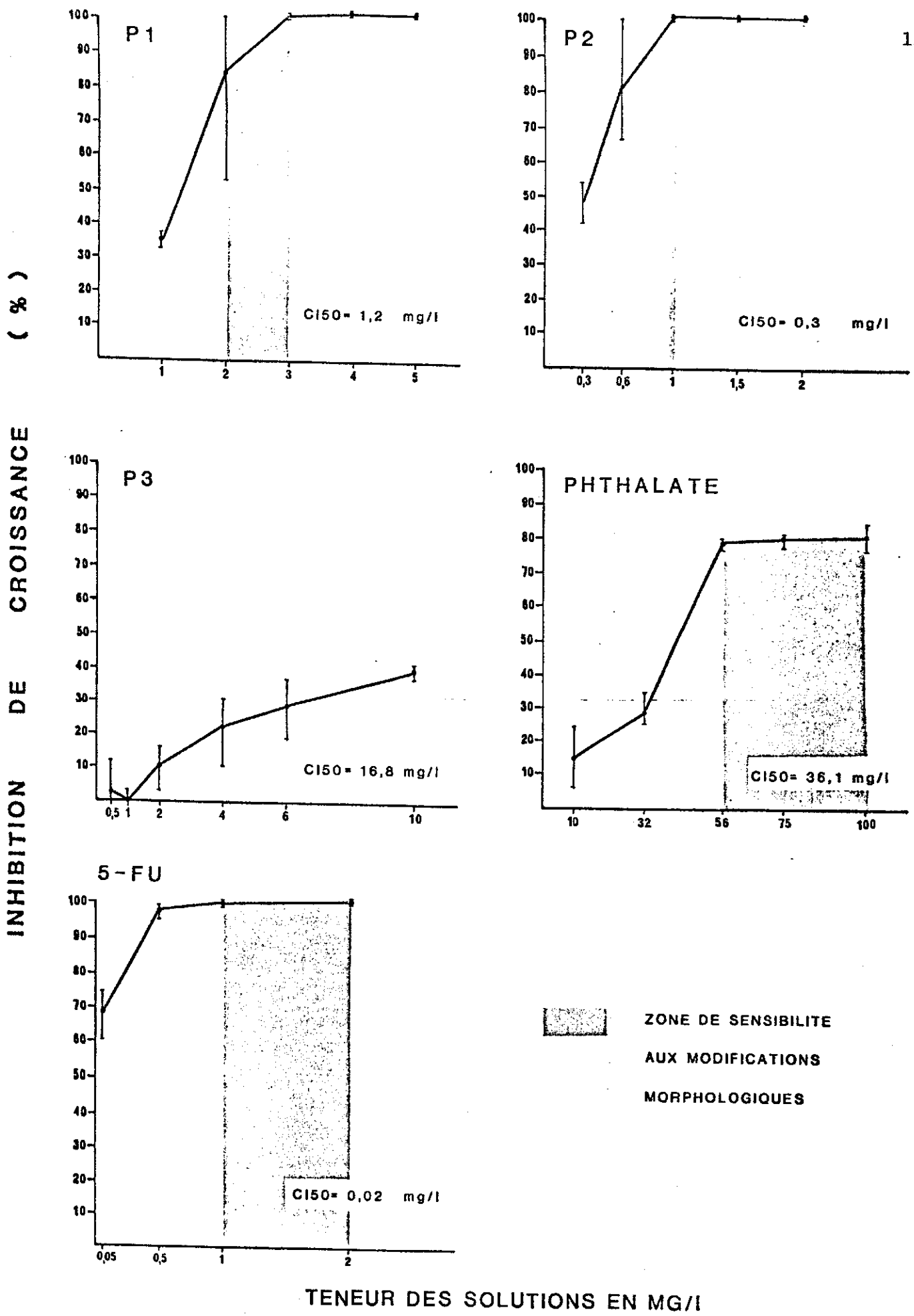
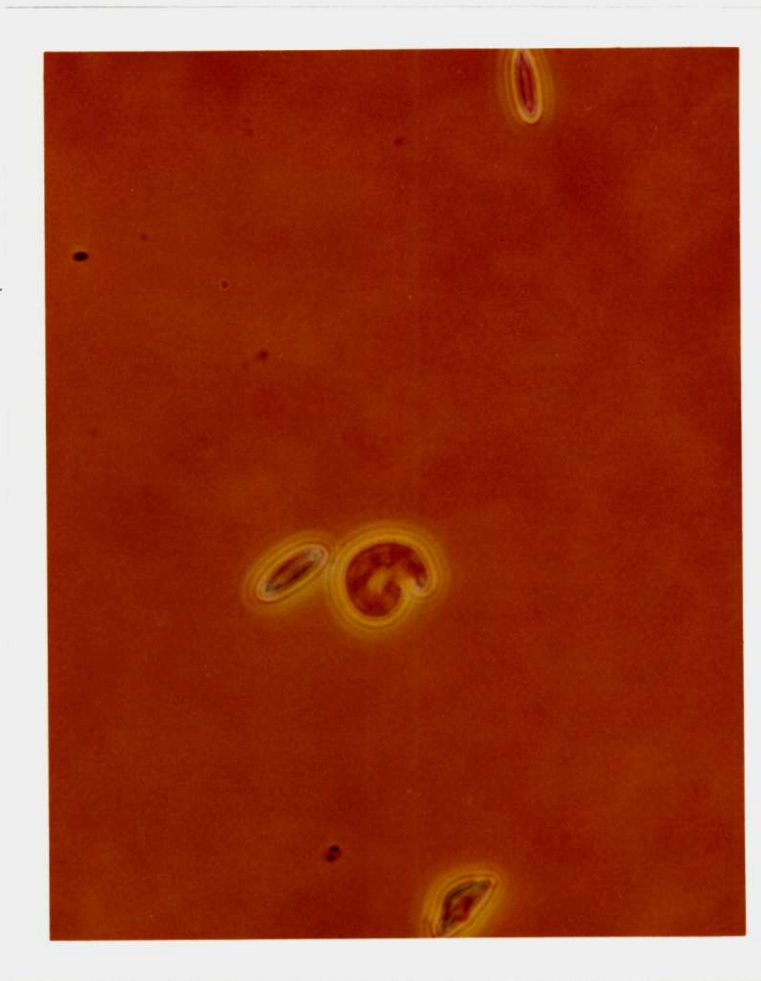


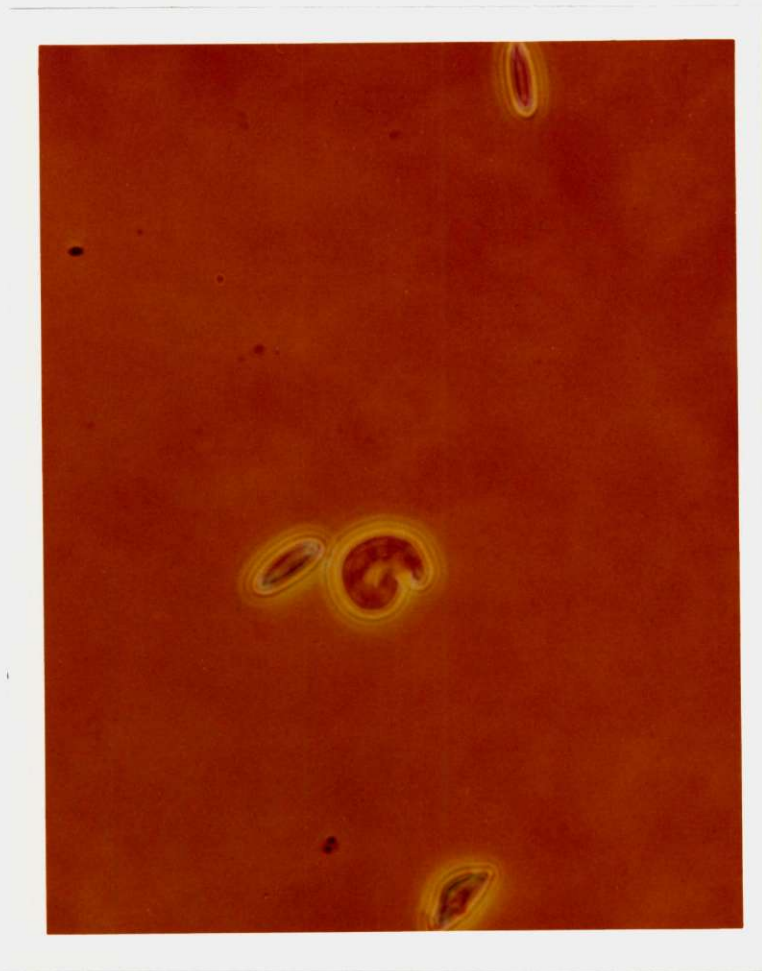
FIGURE 5.2 - INHIBITION DE LA CROISSANCE DE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* (UQAM) EXPOSE A DES POLY-ELECTROLYTES (P1, P2, P3) ET A DES AGENTS MUTAGENES CONNUS (PHTHALATE DE POTASSIUM ET 5-FLUORO- YL)



· FIGURE 5.5 - CELLULES D'ASPECT NORMAL ET D'ASPECT FUSIFORME CHEZ
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM APRES 14 JOURS D'INCUBATION
AVEC 100 MG/L DE PHTALATE DE POTASSIUM
(GROSSISSEMENT = 800 x)



FIGURE 5.4 - CELLULES D'ASPECT NORMAL ET D'ASPECT DEROULE CHEZ
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM APRES 14 JOURS D'INCUBATION AVEC 1 MG/L DE 5-FLUORO-URACYCLE
(GROSSISSEMENT = 800 x)



· FIGURE 5.5 - CELLULES D'ASPECT NORMAL ET D'ASPECT FUSIFORME CHEZ
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM APRES 14 JOURS D'INCUBATION
AVEC 100 MG/L DE PHTALATE DE POTASSIUM
(GROSSISSEMENT = 800 x)

TABLEAU 5.1

DEFORMATIONS OBSERVEES CHEZ *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM* APRES 14 JOURS
D'INCUBATION AVEC DES POLYELECTROLYTES ET DES AGENTS MUTAGENES A
DES CONCENTRATIONS SUPERIEURES A LEURS CI50-14 J.

PRODUIT	CI50-14 J (mg/l)	DEFORMATIONS OBSERVEES
Polyélectrolyte 1	1,2 (0,9 - 1,4)**	Cellules fusiformes à 2 mg/l
Polyélectrolyte 2	0,3 (0,2 - 0,4)	Cellules fusiformes à 1 mg/l
Polyélectrolyte 3	16,8 (9,6 -60,8)	Aucune déformation observée
Pthalate de potassium*	36,1 (28,9 -43,3)	Cellules fusiformes à 56 mg/l
5-Fluoro-uracyle*	0,02 (0,02 -0,03)	Cellules d'aspect déroulé à 1 mg/l

* Agents mutagènes

** Limites de confiance (pour une distribution logarithmique; P : 0,05) indiquées entre parenthèses

D CONCLUSIONS

Les tests avec des algues qui sont de plus en plus utilisés en toxicologie aquatique présentent plusieurs possibilités intéressantes mais aussi certaines limites pour une évaluation rapide de la toxicité des contaminants et des effluents. Les unes et les autres ont été expérimentées dans cinq programmes d'activités qui ont fourni successivement les indications stipulées ci-après.

- 1) L'algue *Selenastrum capricornutum* dont l'emploi devient assez fréquent dans des tests de toxicité à cause de sa large distribution et de sa grande sensibilité à divers toxiques, a une variation "inter-souche" relativement élevée. De fait, en conditions optimales, il y a une dispersion moyenne de 20% entre 6 souches de l'espèce pour la croissance en culture après 14 jours d'incubation. En présence de 6 composés considérés comme toxiques de référence (phénol, lauryl sulfate de sodium, NaN_3 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CdNO_3 et CuSO_4), cette dispersion moyenne atteint 48% pour l'inhibition de croissance. Par ailleurs, elle équivaut à 25% pour l'inhibition de la mobilité entre 3 souches de *Chlamydomonas variabilis* après 24 heures de traitement avec les 6 produits précités. Toutefois, les tests de mobilité avec cette espèce s'avèrent beaucoup moins sensibles à l'égard de ces composés que les bioessais de croissance avec *Selenastrum capricornutum*. En effet, pour 5 des 6 substances toxiques, les CI50-24 heures déterminées lors des premiers sont, en moyenne inter-souche, nettement plus élevées que les CI50-14 jours précisées lors des seconds. Les tests de mobilité avec *Chlamydomonas variabilis* pendant 24 heures apparaissent dès lors utiles pour déceler de façon préliminaire la toxicité d'un produit tandis que les bioessais de croissance avec *Selenastrum capricornutum* durant 14 jours, nonobstant leur variabilité, permettent d'évaluer et de différencier cette toxicité avec plus de sensibilité.

- 2) Une durée de 14 jours pour des tests d'inhibition de croissance avec *Selenastrum capricornutum* représente non seulement un long délai de réponse mais peut aussi entraîner un changement de la toxicité de divers produits testés pendant cette période comme cela se constate pour Cu SO_4 , Na N_3 et un effluent industriel riche en azote organique et ammoniacal. Il est toutefois possible de raccourcir le délai de 14 jours à 1-4 jours si l'on choisit d'autres paramètres tels que la fluorescence, l'assimilation du radiocarbone ou l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) qui sont des précurseurs de la croissance. De fait, après 1 à 4 jours de test, ces paramètres fournissent des réponses plus sensibles, différenciées et/ou représentatives pour la toxicité de ces 3 produits que la croissance pendant 1-4 et surtout 14 jours. Parmi ces paramètres, la fluorescence se révèle le plus sensible et le plus commode.
- 3) Pour déterminer la réelle toxicité des effluents, il faut que ceux-ci soient frais, non stérilisés et/ou non filtrés car leur toxicité peut changer durant des délais de 0 à 168 heures à 4 ° et surtout 24 ° C ou bien lors d'une stérilisation et/ou filtration. De plus, il faut tester leur toxicité avec plus d'une espèce; en effet, on a constaté qu'un effluent inhibait quasiment point la croissance de *Selenastrum capricornutum* tout en affectant celle de *Chlamydomonas variabilis* tandis que la situation contraire prévalait pour un autre effluent. Dans un cas comme dans l'autre, la sensibilité des algues affectées était apparue nettement plus prononcée que celle des poissons *Salmo gairdneri* ; ceci soutient que les tests avec les algues peuvent détecter davantage une toxicité d'effluent que les bioessais létaux avec les poissons.

- 4) Dans les effluents, certaines fractions chimiques sont plus toxiques que d'autres. Cette toxicité "fractionnée" se différencie bien avec les algues *Selenastrum capricornutum*, notamment au niveau de leur fluorescence après 3 jours de test; on décèle alors entre autres certains antagonismes ou synergismes d'action entre les fractions.

- 5) Des tests de mutagénicité avec *Selenastrum capricornutum* peuvent être envisagés. De fait, à des concentrations supérieures à leurs CI50-14 jours, des composés reconnus comme étant mutagènes occasionnent graduellement un déroulement de l'algue qui persiste lorsque celle-ci est transférée dans un milieu normal.

A partir des 5 séries de données précédentes, il appert que les tests avec les algues peuvent s'avérer des indicateurs plus polyvalents et plus révélateurs que les bioessais létaux avec les poissons, outre qu'ils soient logistiquement plus faciles et moins coûteux que ceux-ci. De plus, il est possible de les limiter à 1-4 jours en adoptant un paramètre biochimique tel que la fluorescence plutôt que la croissance, ce qui réduit les changements éventuels de toxicité et les longs délais de réponse. Leur variabilité intra et/ou inter spécifique s'avère toutefois un facteur à vérifier avec des calibrations entre laboratoires.

E. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR, (Association Française de Normalisation) (1974)

"Essais des eaux: détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna Strauss* (crustacés, cladocère)".

Association Française de Normalisation, Paris, Norme expérimentale, T90-301.

APHA, (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) and WPCF (Water Pollution Control Federation) (1980).

"Bioessay methods for aquatic organisms"

In: Standard methods for the examination of water and waste water (15th edition). Greenberg, A.E., Connors, V.V. and Jenkins, D., editors. American Public Health Association, Washington: p. 615-743.

BALL, I.R. (1967)

"The toxicity of cadmium to rainbow trout *Salmo gairdneri Richardson*".

Water Res., 1:805-806.

CABRIDENC, R. (1979)

"Les bioessais en écotoxicologie".

C.R. Séminaire International, Sao Paulo, Septembre 1979. Institut National de Recherche Chimique Appliquée, Ministère de la Qualité de la Vie, Vert-le-Petit, France, Rapport scientifique: 102 p.

CAMPBELL, P.E., COUTURE, P., TALBOT, L. and CAILLE, A. (1976)

"Nutrient dynamics in running waters: production, assimilation and mineralization of organic matter".

In: Environmental Biogeochemistry. Nriagu, J.O., editor Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, 2:681-704.

CHIAUDANI, G. and VIGHI, M. (1978)

"The use of *Selenastrum capricornutum* batch culture in toxicity studies".

Mitt. Intern Verein, Limnol., 21: 316-329.

CHRISTENSEN, E.R., and SCHERFIG, J. (1979)

"Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella stigmatophora*".

Water Res., 13: 79-82.

CRAMER, W.A. (1977)

"Cytochromes".

In: Photosynthesis. I. Photosynthetic electron transport and photophosphorylation. Encycl. Pl. Phynol, New Series, 5: 231-235.

COUTURE, P., CLUIS, D. et POTVIN, L. (1980a)

"Etude limnologique du bassin versant du lac Saint-Jean (Québec, Canada). Correspondance entre production et biodisponibilité d'éléments nutritifs".

Anuls Limnol., 16: 103-117.

COUTURE, P., LAMBERT, M. et VISSER, S.A. (1980b)

"Effets toxiques des insecticides fenitrothion et matacil sur le phytoplancton et le zooplancton".

Institut national de la Recherche Scientifique, Université du Québec, Rapport Scientifique INRS-Eau No. 102 : 103p.

COUTURE, P., COUILLARD, D. et CROTEAU, E., (1981)

"Un test biologique pour caractériser la toxicité des eaux usées".

Environm. Pollut. Series B, 2: 217-222.

ENVIRONMENT CANADA (1977a)

"Methods used by Environment Canada in the testing of oil spill dispersants".

Environmental Protection Service, Environment Canada, Report EPS-4-EC-77-6: 31 p.

ENVIRONNEMENT CANADA (1977b)

"Lignes directrices concernant le contrôle des effluents de traitements de surface".

Service de Protection de l'Environnement, Environnement Canada, Rapport EPS-1-WP-77-5: 35 p.

EPA (Environmental Protection Agency) (1971)

"Provisional algal assay procedures".

Sanitary Engineering Research Laboratory, University of California, Berkeley, SERL Report 71-6: 211 p.

EPA (Environmental Protection Agency) (1973)

"Water quality criteria book. Volume 3: Effects of Chemicals on aquatic life".

Environmental Protection Agency U.S.A., Washington: 537 p.

EPA (Environmental Protection Agency) (1978)

"The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test".

Environmental Protection Agency U.S.A., Environmental Research Laboratory, Corvallis, Oregon, EPA-600/9-78-018: 126 p.

GRABOW, W.O., VAN ROSSUM, P.G., GRABOW, N.A. and DENKHAUS, R. (1981)

"Relationship of the raw water quality to mutagens detectable by the Ames Salmonella Microcosm assay in a drinking water supply".

Water Res., 15: 1037-1043.

GREENE, J.C., MILLER, W.E., SHIROYAMA, T., SOLTERO, R.A. and PUTMAN, K. (1976)

"Use of algal assays to assess the effects of municipal and smelter wastes upon phytoplankton production".

Proc. Symp. Terrestrial Aquatic Ecol. Studies Northwest., Eastern Washington State College, Washington: 327-336.

JAKUBCZAK, E. et LECLERC, H. (1980)

"Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence: étude critique des méthodes d'extraction".

Ann. Biol. Chim., 38: 297-304.

JOUBERT, G. (1980).

"A bioassay application of quantitative toxicity measurements, using the green algae *Selenastrum capricornutum*".

Water Res., 14: 1759-1763.

JOUBERT, G. (1981).

"Etude comparative des réactions: la toxicité entre la truite *Salmo gairdneri* et quatre autres intégrateurs biologiques sur 36 cas de bioessais statiques".

Rap. Techn. Can. Sci. Halieutiques et Aquatiques, Pêches Océans Canada, Ottawa No. 990: 251-269.

GUY, R.D. and ROSS KEAN, A., (1980)

"Algae as a chemical speciation monitor.I. A comparison of algal growth and computer calculated speciation".

Water Res., 14: 891-899.

KLAVERKAMP, J.F., KENNEY, A., HARRISSON, S.E. and DANELL, R. (1975).

"An evaluation of phenol and sodium azide as reference toxicants in rainbow trout".

Proc. 2nd Ann. Aquatic Toxicity Workshop. Graig, G.R., editor. Ontario Ministry of Environment, Toronto: 73-92.

KOOIJMAN, S.A., HANSTWEIT, A.O. and OLDERSMA, H., (1982)

"Parametric analysis of population growth in bio-assays".
Submitted for paper.

LEHNINGER, A.L.(1975)

"Biochemistry".

Worth Publishers Inc., New York,: 1104 p.

MACIOROWSKI, A.F., SIMS, J.L., LITTLE, L.W. and GERARD, F.O. (1981)

"Bioassays, procedures and results".

J. Wat. Pollut. Control Fed., 53: 974-793.

NIE, N.H. HULL, C.H., JENKINS, G. STREINBRENNER, K. and BENT, D.H. (1975)

"Statistical package for the sciences".

2nd edition, McGraw Hill Co., New York: 675 p.

PAYNE, A.G., and HALL, R.H. (1979)

"A method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals".

In: Aquatic toxicology. Marking, L.L. and Kenerle, R.A., editors. American Society for testing and Materials, Philadelphia: 171-180.

PESSAH, E., WELLS, P.G. and SCHNEIDER, J.R. (1975)

"Dodecyl sodium sulphate (DSS) as an intralaboratory reference toxicant in fish bioassays".

Proc. 2nd Ann. Aquatic Toxicity Workshop. Graig, G.R., editor. Ontario Ministry of Environment, Toronto:93-112.

RAI, L.C., GAUR, J.P. and KUMAR, H.D. (1981)

"Phycology and heavy metal pollution".

Biol. Rev. , 56: 99-151.

RAPSON, W.H., NAZAR, M.A. and BUTSKY, V.V. (1980)

"Mutagenicity produced by aqueous chlorination of organic compounds".

Bull. Environm. Contam. Toxicol., 24: 590-596.

ROKOSH, D.A. and LOVASZ, T.N. (1979)

"Detection of mutagenic activity: screening of twenty three compounds of industrial origin in the St. Clair river".

Report Ontario Ministry of Environment: 30 p.

ROY, S. and LEGENDRE, L. (1979)

"DCMU-Enhanced fluorescence as an index of photosynthetic activity in phytoplankton".

Marine Biol., 55: 93-101.

SAMUELSSON, G., and OQUIST, G. (1977)

"A method for studying photosynthetic capacities in unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence".

Physiologia Pl., 40: 315-319.

SHIROYAMA, T., MILLER, W.E., GREENE, J.C. and SHIGIHARA, C. (1976)

"Growth response of *Anabaena flos - aquae De Bredisson* in waters collected from Long Lake Reservoir, Washington".

Proc. Symp. Terrestrial Aquatic Ecol. Studies Northwest., Eastern Washington State College, Washington: 267-274.

SIL (Societas Internationalis Limnologiae) (1978)

"Proceedings of the international symposium on experimental use of algal cultures in limnology".

Mitt. Intern. Verein Limnol., 21: 1-607.

SPRAGUE, J.B. (1971)

"Review paper : measurement of pollutant toxicity to fish. III. Sublethal effects and safe concentrations".

Water Res. , 5: 245-266.

STEFAN, C.E. (1977)

"Methods for calculating a LC50".

In: Aquatic toxicity and hazard evaluation. Mayer, F.L. and Hamelink, J.L., editors. American Society for testing and Materials, Philadelphia: 65-84.

VAN COILLIE, R., THELLEN, C. et DOL, J.C. (1981a)

"Détection des toxicités retardées avec algues en pollution aquatique".

Water Pollut. Res. J. Canada, 15: 203-216.

VAN COILLIE, R., VISSER, S.A. et COUTURE, P. (1981b)

"Utilisation de bioessais avec des algues pour l'étude des répercussions liées à la mise en cours des réservoirs".
Annls Limnol., 17: 79-91.

VANDENBERG, C.M., WONG, P.T. and CHAU, Y.K. (1979)

"Measurements of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity".
J. Fish. Res. Bd. Can., 36: 901-905.

WARREN, C.E. (1971)

"Tolerance of lethal conditions".

In: Biological and water pollution control. Warren, C.E. editor. W.B. Saunders Co., Philadelphia: 192-213.

WEISS, C.M. and HELMS, R.W. (1971)

"Inter-laboratory precision test. An eight-laboratory evaluation of the provisional algal assay procedure bottle test".

Water Quality Office, Environmental Protection Agency U.S.A., Washington, Project 16010D QT: 70p.

WONG, P.T., BURNISON, G. and CHAU, Y.K. (1979)

"Cadmium toxicity to freshwater algae".

Bull. Environm. Contam. Toxicol., 23: 487-490.

ZAR, J. (1974)

"Biostatistical analysis"

Prentice Hall Inc., Toronto: 380 p.