

QE 103.50

DÉTERMINATION DE LA GÉNOTOXICITÉ
(SOS CHROMOTEST^{MC})

ENVIRONNEMENT CANADA
Conservation et Protection
LONGUEUIL (Québec)

Février 1989

TD
424.5
D484
1989

INTRODUCTION

Pour évaluer le danger potentiel que représentent les résidus liquides industriels pour l'environnement, une approche expérimentale en laboratoire est préconisée. Celle-ci a comme objectifs majeurs 1) de dépister les effets toxiques, 2) renseigner sur la nature et la persistance des polluants, 3) établir les relations possibles entre les substances identifiées et les effets observés, 4) identifier les problèmes environnementaux autres que toxiques (eutrophisation, perturbations physico-chimiques, contamination bactérienne). Selon les connaissances préalables de l'échantillon visé (origine industrielle, type de procédé, bilan écotoxicologique antérieur), l'approche peut être réduite ou modifiée.

La stratégie de dépistage des effets toxiques repose sur l'utilisation d'organismes représentatifs de plusieurs niveaux trophiques (bactéries, algues, crustacés, poissons). Trois niveaux de toxicité sont analysés: 1) létal (mortalité), 2) subléthal (inhibition de croissance d'une population, stress physiologique altérant les fonctions vitales telles l'équilibre énergétique et la croissance, 3) chronique (inhibition de la reproduction, lésions du matériel génétique, bioaccumulation). L'évaluation des effets sur le réseau trophique est complétée par l'étude des interactions algales et des processus de biodégradation des substances. L'analyse chimique organique et inorganique offre le support nécessaire à l'interprétation des résultats.

Page manquante dans le document \

This page is missing in the original version

b) Dépistage bactériologique

La contamination bactérienne de l'effluent est évaluée par l'analyse des coliformes fécaux (APHA et al. 1985). L'évaluation peut être complétée par un test de résistance aux antibiotiques et l'identification de pathogènes spécifiques.

c) Tests biologiques

1- Bioessais létaux (poissons, crustacés)

La létalité des composantes physiques, chimiques et bactériologiques de l'effluent est déterminée par des bio-tests avec truites arc-en-ciel (Salmo gairdneri), tête-de-boule (Pimephales promelas) et le crustacé Ceriodaphnia reticulata. La durée des tests est respectivement de 4, 7 et 7 jours. Les méthodes normalisées (Env. Canada 1989b, EPA 1985a, b) sont utilisées. Le degré de toxicité létale de l'effluent est déterminé par une CL50. Les résultats sont exprimés sous forme d'unités toxiques ($UT1 = 100/CL50$).

2- Bioessais sublétaux (bactéries, algues, poissons)

Les tests ci-dessous mesurent quelques aspects des fonctions vitales d'un organisme ou d'une population pouvant être altérées, diminuant ainsi les probabilités de survie à plus ou moins long terme.

→ - Le test Microtox (Beckman Instruments 1982) mesure l'inhibition de lumière émise par la bactérie Photobacterium phosphoreum exposée à l'échantillon durant 5 minutes. La CI50 (concentration inhibitrice) est déterminée et les résultats exprimés sous forme d'unités toxiques sublétales (UTsl).

→ - Le test algal avec Selenastrum capricornutum (Blaise 1986) mesure l'inhibition de croissance d'une population exposée durant 96 heures. La CI50 est déterminée et les résultats exprimés en UTsl.

- Le test de croissance sur la tête-de-boule (EPA 1985a) mesure l'inhibition de croissance en poids de larves exposées durant 7 jours. La concentration maximale de l'effluent (% v/v) ne produisant pas d'effet et la concentration minimale produisant un effet sont déterminées. La moyenne géométrique de ces valeurs est calculée et exprimée en UTsl.

3- Bioessais chroniques (bactéries, crustacés)

-Reproduction

Le test sur le cladocère Ceriodaphnia reticulata (EPA 1985b) mesure l'inhibition de la reproduction d'individus exposés durant 7 jours. Le traitement des données est identique au précédent.

- Génotoxicité

→ Les lésions du matériel génétique sont le résultat de cette forme non-apparente de toxicité. Les altérations du génôme sont mises en évidence à l'aide d'un bio-test, le SOS chromotest (Quillardet et al. 1982). Une souche bactérienne de Escherichia coli, modifiée génétiquement pour permettre un dosage colorimétrique, est utilisée pour évaluer le potentiel génotoxique d'un effluent. Le test peut être réalisé sur l'échantillon original ou sur un concentré des substances de l'échantillon. L'ajout d'un extrait enzymatique de foie de rat (+S9) permet de déceler la présence de substances pro-mutagènes activables par les pro-

duits de l'activité métabolique de mammifère (et par inférence, de tout organisme). Les résultats sont exprimés par une dose-réponse des concentrations de l'effluent vs les facteurs d'induction (voir Quillardet et al. 1982) et un seuil minimal génotoxique (SMG).

-Interaction algale et bioaccumulation génotoxique

Les algues peuvent activer, désactiver ou accumuler les substances génotoxiques présentes dans le milieu. Ces processus sont évalués à l'aide d'une population algale de Selenastrum capricornutum exposée à l'effluent dans des conditions précises (Env. Canada 1989a). L'extraction des substances organiques du culot algal dans un solvant approprié (chlorure de méthylène) suivie du SOS Chromotest sur l'extrait, permet de tester l'hypothèse d'accumulation génotoxique. Le test de génotoxicité sur le liquide surnageant renseigne sur les processus d'activation ou de désactivation des substances génotoxiques.

d) Biodégradation

Ce test permet d'évaluer la biodégradabilité des substances présentes dans l'effluent et les modifications de la toxicité résultant de l'activité microbiologique. Pour accélérer le processus de biodégradation, un mélange bactérien standardisé (Env. Canada 1989c) est ajouté à l'échantillon. Après 5 jours, le pH, l'indice biologique (concentrations en ATP produites par l'activité biologique de l'échantillon) et le carbone organique total sont mesurés et comparés aux valeurs obtenues avant biodégradation.

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
1. DOMAINE D'APPLICATION	1
2. PRINCIPE ET THÉORIE	2
3. FIABILITÉ	3
3.1 Interférence	3
3.2 Limite de détection	3
3.3 Limite de quantification	3
3.4 Fidélité	4
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	5
4.1 Manipulation et préservation de l'échantillon	5
4.2 Manipulation du réactif bactérien et conservation	5
5. APPAREILLAGE	6
5.1 Matériel	6
5.2 Équipement	6
6. RÉACTIFS ET ORGANISMES BIOLOGIQUES	6
6.1 Liste des composés du SOS Chromotest ^(MC)	6
6.2 Description des composés du SOS Chromotest ^(MC)	7
7. PROTOCOLE ANALYTIQUE	10
7.1 Culture bactérienne	10
7.2 Préparation des dilutions de l'échantillon	10
7.3 Préparation des contrôles positifs	11
7.4 Disposition des échantillons dans la microplaque	12
7.5 Départ du SOS Chromotest ^(MC)	14
7.6 Ajout du chromogène et détermination de la viabilité de la culture	15
7.7 Détermination de l'activité génotoxique	16
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	19
8.1 Correction de la toxicité	19
8.2 Correction reliée à l'activité de la phosphatase alcaline	19
8.3 Facteur d'induction	21
8.4 Expression de l'activité génotoxique	21
8.5 Test de signification de la pente	22
8.6 Concentration minimale génotoxique	22
9. GLOSSAIRE	23
10. BIBLIOGRAPHIE	24

ANNEXE 1 Exemple de calcul pour lecture photométrique

INTRODUCTION

Le SOS Chromotest^(MC) est un test colorimétrique de dépistage du potentiel génotoxique de substances pures et d'échantillons complexes sous forme aqueuse (Organics Ltd, 1986).

Toutes les cellules vivantes ont un système enzymatique complexe pouvant être activé pour réparer les lésions du matériel génétique. Le test SOS Chromotest^(MC) met à profit ce mécanisme de détection et de réparation du matériel génétique pour détecter les substances qui endommagent l'ADN. Le bio-indicateur utilisé pour ce test est la bactérie *Escherichia coli* (souche PQ37), dont la génétique a été modifiée pour fournir une réponse colorimétrique lorsque le système de réparation de l'ADN est activé. L'intensité de la réponse colorimétrique est utilisée pour caractériser le potentiel génotoxique d'échantillons liquides.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Le test SOS Chromotest^(MC) sert à évaluer le potentiel génotoxique de divers échantillons liquides tels que les eaux usées industrielles, municipales ou agricoles; les produits chimiques purs ou commerciaux, les eaux de surface, les eaux de lixiviation et lixiviats de résidus solides, les extractions de sol et de sédiments, de même que toute autre solution aqueuse ou soluble dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) susceptible de contenir des substances génotoxiques.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Le bio-indicateur pour le test chromotest est la bactérie *Escherichia coli* (souche PQ 37), dont le génome a été modifié par manipulation génétique. Le seul système de réparation de l'ADN fonctionnel de la bactérie utilisée dans le chromotest est la réponse SOS. Lorsqu'une lésion du matériel génétique est détectée, un promoteur SOS (protéine RecA) est induit pour débiter la transcription des gènes SOS (gènes de réparation). Le système de réparation SOS est contrôlé par un certain nombre de gènes appelés *sfiA*. La souche bactérienne *E. coli* non transformée possède un gène structurel *lac Z*, responsable de la synthèse de l'enzyme B-galactosidase. Dans le test Chromotest, la région *lac Z* normale est supprimée et le gène *lac Z* est fusionné aux gènes *sfiA*. L'expression des gènes *sfiA* est mesurée par l'activité de l'enzyme B-galactosidase. La concentration de l'enzyme est déterminée par réaction colorimétrique. La quantité de couleur produite, proportionnelle à la quantité d'enzymes B-galactosidase, fournit une mesure des dommages induits à l'ADN de la souche bactérienne soumise et mettant en branle le système de réparation SOS.

Cette production de couleur peut être déterminée qualitativement (visuelle), ou quantitativement en utilisant un appareil photométrique approprié.

La souche bactérienne a également subi certaines mutations de façon à augmenter sa sensibilité aux dommages génétiques: augmentation de la perméabilité de sa membrane cellulaire (déficiency en lipopolysaccharide) et incapacité de réparation par excision.

La viabilité des bactéries est estimée à partir d'une mesure de la quantité de phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline est une enzyme périplasmique facilement accessible. Sa présence provoque l'apparition d'une coloration jaune si la culture bactérienne est viable. Un échantillon est considéré toxique si aucune ou une faible réaction de la phosphatase alcaline est notée comparativement aux témoins.

La réponse génotoxique s'exprime par une relation dose-réponse. La pente de la relation linéaire de la courbe représente l'indice du potentiel d'induction génotoxique de l'échantillon, soit le SOSIP ("SOS Induction Potential"). Plus une valeur de SOSIP est élevée, plus l'activité génotoxique de l'échantillon est élevée. Le potentiel génotoxique d'un toxique est exprimé également par la Concentration Minimale Génotoxique (CMG). La CMG correspond à la plus faible concentration d'échantillon indiquant une activité génotoxique.

3. FIABILITÉ

3.1 Interférence

La couleur et/ou la turbidité de l'échantillon peut interférer sur la mesure colorimétrique du test. Une correction doit donc être apportée comme décrite à la section 7.7.2.4.

3.2 Limite de détection

Les résultats sont disponibles sur demande.

3.3 Limite de quantification

La limite de quantification minimale est déterminée à partir des facteurs d'induction (F.I.) et est fixée à 1.1 (section 8.3).

La limite de quantification maximale est établie par l'écart de la linéarité du lecteur de microplaques. Pour un photomètre de type Multiskan MC, la limite maximale est une densité optique de 2.

3.4 Fidélité

3.4.1 Replicabilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

3.4.2 Répétabilité

Les résultats sont disponibles sur demande.

3.4.3 Reproductibilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

4. MANIPULATION ET PRÉSERVATION

4.1 Manipulation et préservation de l'échantillon

Le test contient deux contrôles positifs qui sont potentiellement carcinogéniques. La manipulation du test et des échantillons doit être faite avec les mêmes précautions que tout matériel potentiellement dangereux.

Les échantillons sont prélevés, transportés et conservés dans des contenants de verre ambré rempli à pleine capacité. Le test doit être commencé au plus tard dans les cinq jours du prélèvement. Les échantillons doivent être conservés à environ 4°C à l'obscurité.

4.2 Manipulation du réactif bactérien et conservation

Bien que la souche bactérienne du SOS Chromotest^(MC) ne soit pas reconnue comme pathogène, elle doit être manipulée selon les règles de l'Art des pratiques microbiologiques de laboratoire.

Le SOS Chromotest^(MC) (souches bactériennes et réactifs) doit être conservé à 4°C dès la réception. La souche bactérienne lyophilisée et l'extrait de foie de rat traité avec l'Arochlor 1254 (mélange S9) sont très sensibles aux écarts de températures, et particulièrement, aux températures trop élevées.

La souche bactérienne du SOS Chromotest^(MC) est sensible à la lumière. Un excès de lumière induira la réaction colorimétrique et augmentera le niveau du bruit de fond. Les manipulations s'effectueront donc sous une exposition minimale de lumière.

5. APPAREILLAGE

5.1 Matériel

- Tube de verre de 12 X 75 mm avec support
- Microplaque, 96 puits à fond plat et couvercles (capacité des puits: 250 ul)
- Micropipettes de 10 ul, de 20 ul et de 100 ul à pointes multiples

5.2 Équipement

- Lecteur de microplaque (longueurs d'onde: 615 et 405 nm)
- Agitateur à Vortex
- Incubateur à une température réglée à $37,0 \pm 0,5$ °C

6. RÉACTIFS ET ORGANISMES BIOLOGIQUES

6.1 Liste des composés du SOS Chromotest^(MC) fournis par le fabricant

Solutions:

A, J: Milieu nutritif pour les bactéries

B, K: Bactéries lyophilisées

C: Diméthyl sulfoxyde 10% (DMSO) dans une solution saline (0,85% NaCl)

D: 4-nitroquinoline oxyde (4NQO; PM 190,16)

10 ug/ml de DMSO 10% - en milieu salin (0,85% NaCl)

F: Chromogène bleu

G: Diluant pour la phosphatase alcaline

H: Phosphatase alcaline lyophilisée

I: Solution d'arrêt (solution stop)

L: Diluant pour le mélange S9

S: Homogénat de foie de rat traité avec de l'Arochlor 1254 (Mélange S9) lyophilisé

P: 2-amino-anthracène (2AA; PM 191,22)

1 mg/ml de DMSO 10% - en milieu salin (0,85% NaCl)

6.2 Description des composés du SOS Chromotest^(MC)

6.2.1 Organisme

Le réactif biologique est une souche lyophilisée de la bactérie *Escherichia coli* (souche PQ37).

6.2.2 Bouillon nutritif

Cette solution, fournie par le fabricant, sert à la reconstitution du réactif bactérien lyophilisé. Elle peut également être préparée en laboratoire. Dans un tel cas, elle est constituée des éléments suivants:

- | | | |
|----|-------------------|---------|
| 1. | Extrait de levure | 2,5 g/l |
| 2. | Bacto casitone | 2,5 g/l |
| 3. | NaCl | 8,5 g/l |

Ces composés sont dilués dans une eau déionisée, puis autoclavés 15 minutes à 121°C. Le pH final est ajusté entre 6,5 et 7,5, avec une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chloridrique. Les milieux sont conservés à 4°C avant l'utilisation.

6.2.3 Chromogènes

Deux chromogènes sont utilisés. L'un mesure la viabilité des bactéries (substrat jaune), l'autre sert à mesurer la génotoxicité des échantillons (substrat bleu).

Le chromogène bleu (X gal. ou 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-B-D-Galactoside) est le substrat utilisé par l'enzyme B-galactosidase. Le chromogène jaune (PNPP; p-nitro-phényle phosphate disodium) est le substrat pour l'enzyme phosphatase alcaline.

6.2.4 Contrôles positifs de génotoxicité

Le 4NQO (4-nitroquinoline oxyde) et le 2AA (2-amino-anthracène) sont utilisés comme contrôles positifs; le premier pour le milieu sans activation enzymatique (- S9), le deuxième pour le milieu avec activation enzymatique (+ S9).

6.2.5 Solution de dilution (diluant C)

Cette solution sert à la préparation des dilutions de l'échantillon. Elle est constituée d'eau déionisée, stérile, contenant 0,85% de chlorure de sodium (NaCl) et 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO).

6.2.6 Mélange d'activation enzymatique

Le SOS Chromotest^(MC) se divise en deux étapes. La première permet de détecter les composés génotoxiques sans activation métabolique. La deuxième permet d'identifier la présence de promutagènes et/ou de pro-cancérigènes en simulant le processus d'activation métabolique retrouvé chez les mammifères. Cette activation est favorisée par l'ajout dans le milieu bactérien d'un mélange d'homogénat de foie de rat traité avec de l'Arochlor 1254, communément appelé mélange S9.

Le fabricant du SOS Chromotest^(MC) fournit un mélange S9 lyophilisé et un diluant permettant de reconstituer le milieu S9. Il est également possible de se procurer commercialement l'homogénat de foie de rat induit par l'Aroclor 1254. Dans un tel cas, la préparation du mélange S9 se décrit comme suit:

1. Préparation du diluant

a) Solution 1

- KCl 1,65 mole ou 1,23 g/10 ml
 MgCl₂·6H₂O 0,4 mole ou 0,8132 g/10 ml
 - Autoclaver 15 minutes à 121°C
 - Conserver à 4°C

b) Solution 2

- Tampon tris - HCl 0,2 mole ou 3,152 g/100 ml
 - Ajuster le pH à 7,4 en utilisant du NaOH, 10 N
 - Conserver à 4°C

c) Solution 3

- Glucose 6 - phosphate - monosodique
 0,5 mole ou 1,42 g/10 ml
 - Filtrer à 0,22 µm
 - Conserver à -80°C

d) Solution 4

- NADP disodique 0,1 mole ou 0,765 g/10 ml
 - Filtrer à 0,22 µm
 - Conserver à -80°C

2. Préparation du mélange S9

Solution	Volume (ml)
1	0,1
2	2,5
3	0,05
4	0,1
Eau déionisée	2,05
Homogénat de foie	0,2
(Conservé au préalable à -80°C)	

Mélange S9 5,0 ml

7. PROTOCOLE ANALYTIQUE

7.1 Culture bactérienne

La première étape du test consiste à réhydrater la souche bactérienne avec le milieu nutritif.

Si le milieu nutritif est préparé en laboratoire, il est nécessaire d'ajouter 20 ug/ml d'ampicilline au milieu nutritif au moment de la réhydratation du réactif bactérien. Dix ml de milieu nutritif sont ajoutés aux bactéries lyophilisées (20 ml pour les cultures d'une nuit).

Les cultures bactériennes réhydratées sont placées à $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ dans un incubateur ou un bain-marie pour une période de 4 à 12 heures. L'incubation nocturne donne une densité bactérienne plus élevée qui doit par la suite être diluée au moment de l'essai.

7.2 Préparation des dilutions de l'échantillon

Le solvant considéré le plus approprié pour le SOS Chromotest^(MC) est le DMSO 10% dans une solution saline stérile (0,85%). Toutes les dilutions des échantillons et des contrôles positifs sont faites avec ce solvant. La dilution des échantillons se réalise avant leur insertion dans les puits appropriés de la microplaque.

a) Échantillon soluble dans l'eau

- Dissoudre l'échantillon avec la solution de dilution (diluante C).
- Préparer un minimum de 8 dilutions en série 1:2.

b) Échantillon insoluble dans l'eau

- Le solvant de choix est le DMSO, il faut cependant prendre garde de ne pas excéder une concentration de 2% v/v dans l'inoculum bactérien. L'utilisation d'un autre solvant doit d'abord faire l'objet d'essais pour déterminer la concentration maximale sécuritaire; c'est-à-dire celle qui causera peu ou pas d'effet toxique et aucune activité génotoxique, tout en permettant une solubilisation optimale de la substance à tester.
- Préparer toutes les dilutions, un minimum de huit, avec du DMSO-100%, puis ajouter 1 ul ou 2 ul aux puits correspondants. Pour ce faire, utiliser une ultra micropipette (e.g. Eppendorf ultra-micro) et changer d'embout à chaque prélèvement. Les concentrations initiales doivent, naturellement, être 50 ou 100 fois plus fortes que les concentrations finales désirées.

Notes: Des essais ont démontré qu'il y a perte de produit si les dilutions intermédiaires ou finales sont préparées avec du DMSO-10%. Pour certaines substances (e.g. HAP), cette perte peut être considérable et causer une estimation faussée de la CMG.

7.3 Préparation des contrôles positifs

Le SOS Chromotest^(MC) fournit deux contrôles positifs:

1. Le 4NQO, ayant une concentration de 10 ug/ml (solution de départ);
2. Le 2AA, ayant une concentration de 1 mg/ml (solution de départ);

les dilutions suivantes sont suggérées:

- 4NQO:
 - . Réaliser 7 dilutions en série (1:2) dans le diluant C à partir de la solution de départ.
 - . La solution de départ sert de première dilution.

- 2AA:

- Diluer la solution de départ avec 90 µl du diluant C pour obtenir une solution intermédiaire de 100 µg/ml
- Réaliser 7 dilutions en série (1:2) de la solution à concentration intermédiaire dans le diluant C
- La solution à concentration intermédiaire constituera la première dilution du contrôle positif avec activation

7.4 Disposition des échantillons dans la microplaque

Cette section propose une disposition des échantillons dans les microplaques (tableau 1). Deux microplaques sont utilisées; la microplaque 1 pour l'essai sans activation métabolique (- S9); la microplaque 2 pour l'essai avec activation métabolique (+ S9). À l'exception de l'étape c, les mêmes opérations sont effectuées sur les deux microplaques.

a) Blanc

- Introduire 10 µl du diluant C dans chaque puits de la colonne 1

b) Bruit de fond et viabilité (témoin)

- Introduire 10 µl de diluant C dans chaque puits de la colonne 2

c) Contrôle positif

Microplaque 1

- Introduire 10 µl des solutions diluées du 4NQO dans les puits de la colonne 3

Microplaque 2

- Introduire 10 µl des solutions diluées du 2AA dans les puits de la colonne 3

d) Échantillon

- Les colonnes 4 à 12 servent aux échantillons: Introduire 10 µl des dilutions des échantillons dans chacun des puits correspondants.

TABLEAU 1
DISPOSITION DES ÉCHANTILLONS DANS LA MICROPLAQUE

COLONNES

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

(ug/ml)

4NQO / 2AA

(plaque 1) (plaque 2)

A	10 ul	10 ul	10*/100*	10 ul de la solution de départ (e.g. 100%)
B	DMSO	DMSO	5/50	10 ul de la solution de départ 1:2 (50%)
C	10%	10%	2,5/25	10 ul de la solution de départ 1:4 (25%)
D	salin	salin	1,25/12,5	10 ul de la solution de départ 1:8 (12,5%)
E	puits	puits	0,63/6,25	10 ul de la solution de départ 1:16 (6,25%)
F			0,32/3,22	10 ul de la solution de départ 1:32 (3,125%)
G			0,16/1,56	10 ul de la solution de départ 1:64 (1,5625%)
H			0,08/0,78	10 ul de la solution de départ 1:128 (0,78125%)

Blanc

Témoin

Courbe
standard
4NQO/2AA

Échantillons

Concentration: ug/ml

7.5 Départ du SOS Chromotest(MC)

Après la période d'incubation du milieu bactérien et la préparation des microplaques, procéder comme suit:

a) Microplaques 1 et 2

- Introduire 100 ul de milieu nutritif (sans bactéries) dans chaque puits de la colonne 1
- Pour la microplaque 2 (+ S9), ajouter au bouillon nutritif la même proportion de mélange S9 que pour l'inoculum bactérien (section suivante), afin de tenir compte de la turbidité causée par le mélange S9 sur la lecture colorimétrique.

b) Microplaque 1 (sans activation)

- Introduire 100 ul de culture bactérienne dans les puits des colonnes 2 à 12

ATTENTION: L'utilisation d'une culture incubée durant une nuit exige habituellement que celle-ci soit préalablement diluée d'un facteur 1:3 avec du milieu nutritif. L'absorbance de la culture diluée doit être comprise entre 0,08 -0,15 à 600 nm.

Microplaque 2 (avec activation)

- Ajouter le mélange S9 à la culture bactérienne dans une proportion de 25%
 - Culture nocturne:
Pour un volume final de 10 ml:
4,2 ml milieu nutritif
3,3 ml milieu bactérien
2,5 ml mélange S9
 - Mélanger le milieu nutritif et bactérien avant l'ajout du mélange S9

- Culture d'une incubation de 4 heures:
Pour un volume final de 10 ml:
2,5 ml mélange S9
7,5 ml milieu bactérien
- Si le mélange S9 du fabricant est utilisé, la réhydratation du mélange S9 s'effectue immédiatement avant son introduction dans le milieu bactérien
- Introduire 100 µl de la culture bactérienne dans chaque puits des colonnes 2 à 12

c) Microplaques 1 et 2

- Incuber les deux microplaques à une température de $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pour une période de 2 heures
- Durant cette période, le matériel génotoxique interagit avec l'ADN des bactéries du SOS Chromotest^(MC) et induit la synthèse de l'enzyme B-galactosidase

7.6 Ajout du chromogène et détermination de la viabilité de la culture

Après les 2 heures d'incubation des deux microplaques, procéder comme suit:

- a) - Réhydrater la phosphatase alcaline lyophilisée avec 10 ml de chromogène bleu. Une microplaque utilise 9,6 ml de phosphatase alcaline rehydratée avec le chromogène bleu. L'emploi de deux microplaques exige la reconstitution de deux mélanges phosphatase alcaline/chromogène bleu
- b) - Homogénéiser les deux mélanges de reconstitution (si deux microplaques sont utilisées)

- c) - Introduire 100 μ l de ce mélange dans chaque puits des deux microplaques
- d) - Incuber les microplaques à $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pour une période de 30 à 120 minutes jusqu'au développement d'une coloration bleu-vert du contenu des puits

7.7 Détermination de l'activité génotoxique

L'analyse de l'activité génotoxique des échantillons peut être déterminée visuellement ou quantitativement par un spectrophotomètre. Dans les deux cas, la comparaison se réalise entre la densité de la coloration des témoins (puits recevant le diluant et le milieu bactérien, colonne 2) et la densité de la coloration des échantillons (puits ayant reçus les dilutions des échantillons ou des contrôles positifs).

7.7.1 Analyse visuelle des résultats

7.7.1.1 Observation des contrôles positifs

Comme l'échantillon (4NQO ou 2AA) est dilué, une relation dose-réponse doit normalement apparaître. Le test est éliminé si le contrôle positif ne réagit pas.

7.7.1.2 Viabilité des bactéries

L'activité de la phosphatase alcaline (coloration jaune) est un indicateur de la viabilité bactérienne. Si la coloration jaune apparaît dans les puits des échantillons et des témoins, les échantillons sont considérés non toxiques. Le test est éliminé si la coloration jaune n'apparaît pas dans les puits du témoin (bactéries non-viables).

7.7.1.3 Observation de l'activité génotoxique des échantillons

Les concentrations des échantillons donnant une réaction bleue sont l'indice de l'activité génotoxique du produit sur l'ADN des bactéries.

7.7.2 Analyse par lecteur de microplaque

7.7.2.1 Calibration du lecteur de microplaque (blanc)

La première colonne des microplaques sert à calibrer le lecteur de microplaques et permet la correction de la lecture de l'absorbance due aux réactifs sans activité bactérienne.

7.7.2.2 Bruit de fond du témoin

La deuxième colonne de chacune des microplaques permet de quantifier la réponse des bactéries en présence seulement des réactifs par mesure de la densité optique à des longueurs d'onde de 615 nm et 405 nm.

7.7.2.3 Mesure de l'activité génotoxique

L'intensité de la coloration bleue des échantillons et des contrôles positifs est mesurée par densité optique à une longueur d'onde de 615 nm. La viabilité des bactéries est évaluée en lisant la densité optique de 405 nm.

Habituellement, le développement de coloration en présence du mélange S9 est plus lent. Les lectures peuvent s'effectuer systématiquement aux 15 minutes ou à l'apparition d'un gradient de couleur ou encore par choix arbitraire d'un temps fixe d'incubation.

Le critère de décision du temps de lecture est dépendant de l'agent génotoxique et des particularités du lecteur de microplaques (écart de la linéarité). La qualité de la culture bactérienne (densité, viabilité, vieillissement, etc...) influence également le temps de réponse.

Bien entendu, la prolongation du temps d'incubation favorise le développement d'un plus fort gradient de couleur et d'une coloration plus intense. Dans un tel cas, la sensibilité du lecteur de microplaques peut devenir le facteur limitant à la prolongation du temps d'incubation. Par exemple, certains lecteurs de microplaques, tels que le photomètre de type Multiskan MC, ont une valeur maximale au delà de laquelle la linéarité de la réponse change (valeur maximale de 2 pour ce type de lecteur). Il est suggéré alors de procéder avec des lectures systématiques aux 15 minutes jusqu'à ce que la linéarité de la réponse soit modifiée.

7.7.2.4 Correction photométrique

La coloration originale d'un échantillon peut affecter la lecture de la densité optique de l'échantillon. Il est suggéré de prendre une lecture des densités optiques des échantillons au moment de l'introduction du chromogène. Ces valeurs sont soustraites des valeurs de densité optique après la période d'incubation.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Cette section ne s'applique que pour les utilisateurs d'un lecteur de microplaques. L'annexe 1 présente un exemple de calcul.

8.1 Correction de la toxicité

La toxicité de certains échantillons peut interférer avec la réponse SOS et perturber la linéarité des résultats. Les lectures de densité optique à 615 nm sont corrigées par le facteur de correction suivant:

Facteur de correction: DO_0/DO_x

où: DO_0 : Densité optique moyenne à 405 nm de la phosphatase alcaline seule (témoin)

DO_x : Densité optique à 405 nm de la phosphatase alcaline en présence d'une concentration donnée du matériel mis à l'essai.

Ce facteur de correction est multiplié à la valeur de densité optique à 615 nm pour une concentration donnée du matériel mis à l'essai.

8.2 Correction reliée à l'activité de la phosphatase alcaline

Le filtre à 405 nm ayant un faible pouvoir de résolution, une surestimation des valeurs de densité optique à cette longueur d'onde peut donc se produire due à un empiètement de la coloration bleue sur la jaune. Il est donc nécessaire d'établir une valeur précise de densité optique à 405 nm.

8.2.1 Courbe standard

L'empiètement du bleu sur le jaune s'établit à partir d'une courbe standard. Une microplaque à 16 puits fournie par le fabricant est utilisée pour établir la courbe standard.

Les puits de cette microplaque contiennent des concentrations décroissantes d'un réactif chromogène bleu.

La courbe standard s'établit comme suit:

- a) Ajouter 100 ul de bouillon nutritif dans chaque puits de la microplaque.
- b) Lire la densité optique à 615 nm et à 405 nm
- c) Établir la relation entre les densités optiques à 405 nm en fonction des densités optiques à 615 nm.

Des essais en laboratoire ont démontré la similarité de la courbe standard après avoir effectué plusieurs replicats de celle-ci. Une courbe standard peut donc être utilisée pour une grande série d'essai de SOS CHROMOTEST^(MC) et être vérifiée ponctuellement.

8.2.2 Correction de la valeur de la densité optique à 405 nm

La valeur corrigée de la densité optique à 405 nm pour une concentration donnée de l'échantillon se calcule de la façon suivante:

$$DO_{405} = DO_{405E} - (DO_{615E} \times (DO_{405C}/DO_{615C}))$$

où:	DO_{405}	=	Valeur corrigée de la phosphatase alcaline
	DO_{405E}	=	Densité optique à 405 nm de l'échantillon pour une concentration donnée
	DO_{615E}	=	Densité optique à 615 nm de l'échantillon pour une concentration donnée
	DO_{615C}	=	Densité optique à 615 nm de la courbe standard dont la valeur est la plus rapprochée de la DO_{615E}
	DO_{405C}	=	Densité optique à 405 nm de la courbe standard correspondant à la DO_{615C}

8.3 Facteur d'induction

Les facteurs d'induction sont déterminés selon la formule suivante:

$$F.I. = \frac{DO_{615}E/DO_{405}E}{DO_{615}T/DO_{405}T}$$

où: F.I. : Facteur d'induction

DO₆₁₅E: Densité optique corrigée à 615 nm de l'échantillon pour une concentration donnée

DO₄₀₅E: Densité optique corrigée à 405 nm de l'échantillon pour une concentration donnée

DO₆₁₅T: Densité optique moyenne à 615 nm du témoin

DO₄₁₅T: Densité optique corrigée moyenne à 405 nm du témoin.

Les facteurs d'induction normalisent les réponses et permettent la comparaison entre les essais avec ou sans activation et entre les différentes expériences.

8.4 Expression de l'activité génotoxique

Pour chacun des échantillons, une relation des facteurs d'induction en fonction des concentrations testées peut être tracée. La pente de la portion linéaire de la courbe multipliée par un facteur de 10 représente l'indice du potentiel d'induction génotoxique de l'échantillon, soit le SOSIP ("SOS Induction Potential").

8.5 Test de signification de la pente

Un calcul statistique (Zar, 1984) permet de vérifier si la pente calculée est significativement différente de zéro. L'hypothèse nulle est: la pente est égale à zéro. Autrement dit, la réponse génotoxique n'est pas significativement différente du témoin ($P < 0,05$).

L'intervale de confiance à 95% de probabilité sur la valeur de SOSIP est déterminée par calcul selon les équations basées sur une droite de régression linéaire.

8.6 Concentration minimale génotoxique

Pour chacun des échantillons démontrant un potentiel génotoxique, la concentration minimale génotoxique peut être établie. La concentration minimale génotoxique correspond à la plus faible concentration de l'échantillon indiquant une activité génotoxique. Concrètement, il s'agit du point d'intersection de la droite de régression avec la droite représentant un F.I. de 1.1. Pour déterminer la concentration minimale génotoxique, il est suggéré de procéder ainsi:

- a) Calculer les F.I. comme indiqué à la section 8.3
- b) Calculer la droite de régression avec la portion linéaire de la relation
- c) Interpoler sur le graphique la concentration de l'échantillon correspondant à un F.I. de 1.1. Cette concentration représente la concentration minimale génotoxique (CMG).

Note:- Lorsqu'il y a relation dose-réponse mais qu'il est mathématiquement ou graphiquement impossible d'interpoler la CMG, rapporter la plus faible concentration ayant démontré un F.I. supérieur à 1.1.

- Pour les situations où il n'y a pas de relation dose-réponse mais qu'une ou plusieurs concentrations exhibent des D.O. 615 significativement différentes du témoin + 2 E.T., recommencer l'essai avec des replicats (≥ 3) d'une même ou des mêmes dilutions. Pour mettre en évidence une activité génotoxique, procéder à une comparaison des moyennes (échantillon vs témoin) à l'aide du test "t" de Student à 0,05 (Zar, 1984).

9. GLOSSAIRE

9.1 Génotoxique

Activité toxique d'une substance par l'attaque du système génétique.

9.2 C.M.G.

Concentration minimale génotoxique soit la plus faible concentration provoquant une réponse génotoxique.

9.3 SOSIP ou SOS Induction Potential

Pente de la portion linéaire de la dose-réponse entre les facteurs d'induction et la quantité, en masse ou volume, soumise à l'essai. Il reflète donc l'habilité d'un composé à induire une réponse SOS.

10. BIBLIOGRAPHIE

HARWOOD, M., 1987.

Procédure de dépistage du potentiel génotoxique des eaux résiduaires en tenant compte des interactions phytoplanctoniques. Thèse de maîtrise. INRS-Eau, 109 pages.

ORGENICS LTD, 1986.

The SOS Chromotest Blue Kit. Instruction for Use. Organics Ltd. Document Location. SOS II/Sosbins. Imss. Yavne 70650, Israel, 23 pages.

QUILLARDET, P., M. HOLNUNG, 1985.

The SOS Chromotest, A Colorimetric Bacterial Assay for Genotoxins: Procedures. Mutat. Res., 147: 65-78.

QUILLARDET, P., O. HUISMAN, R. D'ARI and M. HOFNUNG, 1982.

SOS Chromotest, A Direct Assay for Induction of an SOS Function in *Escherichia coli* K-12 to Measure Genotoxicity. Proc. Nat. Acad. Sci., 79: 5971-5975.

ZAR, J.H., 1984

Biostatistical Analysis, 2nd ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.

ANNEXE 1

ANNEXE 1

EXEMPLE DE CALCUL POUR LECTURE PHOTOMÉTRIQUE

Le tableau 2 présente les données brutes de densité optique à 405 et 615 nm obtenues après lecture avec un photomètre. Les étapes suivantes présentent la manière de procéder pour la réalisation des calculs de l'essai:

Étape 1:

Faire la moyenne des lectures des blancs (colonnes 1 et 5).

Étape 2:

Soustraire les moyennes des blancs des valeurs de DO 405 et DO 615 pour les témoins et les échantillons (tableau 3).

Étape 3:

Correction de l'empiètement colorimétrique des témoins (section 8.2).

La figure 1 présente une courbe standard obtenue telle que décrite à la section 8.2.1. Cette courbe est la résultante de 23 essais différents.

La correction des valeurs de la DO à 405 nm pour les données du tableau 3 est présentée au tableau 4. Ces résultats sont obtenus comme suit (référence à la section 8.2.2):

$$DO_{405} = DO_{405E} - (DO_{615E} \times (DO_{405C}/DO_{615C}))$$

À partir des courbes de régression linéaire de la figure 1 et en considérant que $DO_{615E} = DO_{615C}$, la valeur de DO_{405} devient égale à:

$$DO_{405} = DO_{405E} - DO_{405C} \quad (1)$$

La DO₄₀₅C peut être obtenue des équations des régressions linéaires de la figure 1 soit:

$$DO_{615} = m1 \text{ (conc.)} \quad (2)$$

$$DO_{405} = m2 \text{ (conc.)} \quad (3)$$

Or, connaissant la valeur de la DO₆₁₅ (dans l'équation 2), la valeur de la DO₄₀₅C peut être évaluée comme suit (combinaison de l'équation 2 et 3):

$$DO_{405}C = m2 \text{ (conc.)} = m2 * \left[\frac{DO_{615}}{m1} \right]$$

Sachant les valeurs des pentes des régressions linéaires, la valeur de la DO₄₀₅C devient:

$$DO_{405}C = \frac{2,822 \text{ E} - 03}{2,133 \text{ E} - 02} DO_{615}C = 0,1323 DO_{615}C$$

La valeur de la DO₄₀₅ (équation 1) devient donc égale à l'équation suivante:

$$DO_{405} = DO_{405}E - (0,1323 * DO_{615})$$

Étape 4:

Calcul de la moyenne et de l'écart-type des témoins

Au tableau 4, pour une DO₄₀₅, la moyenne est de 1,228 et l'écart-type de 0,011. Pour une DO₆₁₅, la moyenne est de 0,287 et l'écart-type de 0,010.

Les critères de décision pour juger si un résultat de DO présente une toxicité ou une génotoxicité sont les suivants:

• Pour la toxicité:

Si la DO_{405} corrigée de l'échantillon est égale ou inférieure à la DO_{405} corrigée du témoin auquel est soustraite la valeur de deux écart-types, l'échantillon est considéré toxique. Par exemple, l'échantillon no 1 (ÉCH no 1) du tableau 4 n'est pas considéré toxique et la DO_{615} n'exige aucune correction. Cependant, l'échantillon no 2 (ÉCH no 2) du tableau 4 devrait être corrigé dans les sept premières dilutions avant de pouvoir interpréter la DO_{615} .

• Pour la génotoxicité:

Si la DO_{615} corrigé de l'échantillon est supérieure à la DO_{615} du témoin auquel est ajoutée la valeur de deux écart-types, l'échantillon est considéré génotoxique pour cette concentration. Par exemple, l'échantillon no 1 (ÉCH no 1) du tableau 4 présente une génotoxicité.

Étape 5:

Correction de l'empiètement colorimétrique et de la toxicité pour les échantillons

L'empiètement colorimétrique des échantillons est évalué comme à l'étape 3. Les données corrigées pour les échantillons sont présentées au tableau 5. Si la DO_{405} de l'échantillon est inférieure à la moyenne des DO_{405} des témoins, la DO_{615} de l'échantillon est corrigée. La correction s'effectue comme décrit à la section 8.1.

Ainsi, pour la première donnée de la colonne 4 du tableau 4, la correction de la toxicité est effectuée comme suit:

$$\begin{aligned}
 \text{Facteur de correction} &= \text{DO}_0 / \text{DO}_x = 1,228 / 0,55 = 2,23 \\
 \text{DO}_{615} \text{ corrigé} &= \text{DO}_{615\text{E}} * \text{Facteur de correction} \\
 \text{DO}_{615} \text{ corrigé} &= 0,073 * 2,23 \\
 \text{DO}_{615} \text{ corrigé} &= 0,163
 \end{aligned}$$

Étape 6:

Calcul des facteurs d'induction

Le tableau 6 présente les facteurs d'induction calculés à partir des données corrigées pour les échantillons. La détermination des facteurs d'induction s'effectue comme décrit à la section 8.3.

Ainsi, pour la première donnée de la colonne 4 du tableau 5 (ÉCH no 2), le facteur d'induction est calculé comme suit:

$$\begin{aligned}
 \text{F.I.} &= \frac{\text{DO}_{615\text{E}} / \text{DO}_{405\text{E}}}{\text{DO}_{615\text{T}} / \text{DO}_{405\text{T}}} = \frac{0,163 / 0,55}{0,287 / 1,228} = \frac{0,296}{0,234} \\
 \text{F.I.} &= 1,268
 \end{aligned}$$

Étape 7:

Expression de l'activité génotoxique

La figure 2 illustre la distribution des facteurs d'induction en fonction des quantités (en volume ou poids) ou des concentrations soumises de l'échantillon. Une droite de régression est réalisée avec les six (6) derniers points soit la portion linéaire de la distribution, ayant un facteur d'induction supérieur ou égal à 1.1. La pente de cette droite est de 13,09 et correspond à un SOSIP de 130,9 (SOSIP = 10 * pente = 10 * 13,09 = 130,9).

Étape 8:

Test de signification de la pente

Le test de signification de la pente revient à vérifier si la pente est significativement différente de zéro. Pour ce faire, on utilise le principe de la distribution d'échantillonnage de la pente.

Les hypothèses se formulent comme suit:

H_0 : La vraie pente de l'équation de régression est nulle.

H_1 : La pente n'est pas nulle ou une partie de la variation de y (F.I.) est expliquée par celle de x (concentration).

$$\text{où: } t_m = \frac{m}{\sqrt{\text{var}(m)}}$$

$$dl = n - 2$$

Si $|t_m|$ est inférieur à $t_{\alpha/2}$, la valeur observée se trouve dans les limites acceptables de fluctuations de la variable t. L'hypothèse H_0 est donc acceptée au seuil de signification α . Si $|t_m|$ est supérieur à $t_{\alpha/2}$, l'hypothèse H_0 est rejetée avec un risque d'erreur égal à α . Dans un tel cas, le SOSIP établi n'est donc pas nul, indiquant une réponse positive face à l'activité génotoxique.

Pour l'échantillon no 1 du tableau 6, le t calculé est de 20,9 et le t de la table pour 4 degrés de liberté et un seuil de probabilité de 0,05 est de 2,77. L'hypothèse H_0 est donc refusée et il y a réponse positive génotoxique.

Étape 9:

Intervalle de confiance de la pente (du SOSIP) d'une droite de régression

Pour un SOSIP déterminé, les intervalles de confiance à 95% peuvent être établis de la façon suivante:

$$\text{SOSIP} - t_{\alpha/2} \sqrt{\text{var}(\text{SOSIP})} < \text{SOSIP} < \text{SOSIP} + t_{\alpha/2} \sqrt{\text{var}(\text{SOSIP})}$$

Pour l'échantillon no 1 du tableau 5, le SOSIP est de 130,9 et les intervalles de confiance à 95% sont de 113,6 à 148,2.

Étape 10:

Détermination de la concentration minimale génotoxique

De la figure 3, la concentration minimale génotoxique est évaluée à 0,0029.

TABLEAU 2
DONNÉES BRUTES DE DENSITÉ OPTIQUE À 405 ET 615 nm
OBTENUES APRÈS LECTURE AVEC UN PHOTOMÈTRE

DO ₄₀₅				DO ₆₁₅			
BLANC	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2	BLANC	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2
0,247	1,539	1,649	0,814	0,041	0,318	1,269	0,124
0,252	1,508	1,645	0,875	0,044	0,334	1,081	0,207
0,263	1,522	1,609	0,975	0,056	0,342	0,847	0,3
0,261	1,517	1,573	1,093	0,054	0,349	0,634	0,356
0,255	1,513	1,553	1,204	0,051	0,337	0,497	0,369
0,257	1,509	1,528	1,33	0,052	0,33	0,415	0,348
0,249	1,515	1,505	1,437	0,053	0,34	0,369	0,329
0,248	1,538	1,533	1,518	0,059	0,354	0,355	0,355
MOYENNE							
0,254	1,520			0,051	0,338		
E.T.							
0,006	0,011			0,006	0,010		

TABLEAU 3
VALEURS DES DO APRÈS SOUSTRACTION DES
VALEURS DE LA MOYENNE DES BLANCS

DO ₄₀₅				DO ₆₁₅			
BLANC	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2	BLANC	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2
0,247	1,285	1,395	0,560	0,041	0,267	1,218	0,073
0,252	1,254	1,391	0,621	0,044	0,283	1,030	0,156
0,263	1,268	1,355	0,721	0,056	0,291	0,796	0,249
0,261	1,263	1,319	0,839	0,054	0,298	0,583	0,305
0,255	1,259	1,299	0,950	0,051	0,286	0,446	0,318
0,257	1,255	1,274	1,076	0,052	0,279	0,364	0,297
0,249	1,261	1,251	1,183	0,053	0,289	0,318	0,278
0,248	1,284	1,279	1,264	0,059	0,303	0,304	0,304
MOYENNE							
0,254	1,266			0,051	0,287		
E.T.							
0,006	0,011			0,006	0,010		

TABLEAU 4
VALEURS DES DO₄₀₅ APRÈS
CORRECTION COLORIMÉTRIQUE

DO ₄₀₅				DO ₆₁₅			
BLANC	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2	BLANC	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2
0,247	1,250	1,234	0,550	0,041	0,267	1,218	0,073
0,252	1,217	1,255	0,600	0,044	0,283	1,030	0,156
0,263	1,230	1,250	0,688	0,056	0,291	0,796	0,249
0,261	1,224	1,242	0,799	0,054	0,298	0,583	0,305
0,255	1,221	1,240	0,908	0,051	0,286	0,446	0,318
0,257	1,218	1,226	1,037	0,052	0,279	0,364	0,297
0,249	1,223	1,209	1,146	0,053	0,289	0,318	0,278
0,248	1,244	1,239	1,224	0,059	0,303	0,304	0,304
MOYENNE							
0,254	1,228			0,051	0,287		
E.T.							
0,006	0,011			0,006	0,010		
MOYENNE - 2 E.T.				MOYENNE + 2 E.T.			
	1,206				0,308		

TABLEAU 5
VALEURS DES DO₆₁₅ APRÈS
CORRECTION DE LA TOXICITÉ

BLANC	DO ₄₀₅			BLANC	DO ₆₁₅		
	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2		TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2
0,247	1,250	1,234	0,550	0,041	0,267	1,218	0,163
0,252	1,217	1,255	0,600	0,044	0,283	1,030	0,319
0,263	1,230	1,250	0,688	0,056	0,291	0,796	0,444
0,261	1,224	1,242	0,799	0,054	0,298	0,583	0,469
0,255	1,221	1,240	0,908	0,051	0,286	0,446	0,430
0,257	1,218	1,226	1,037	0,052	0,279	0,364	0,352
0,249	1,223	1,209	1,146	0,053	0,289	0,318	0,298
0,248	1,244	1,239	1,224	0,059	0,303	0,304	0,305
MOYENNE							
0,254	1,228			0,051	0,287		
E.T.							
0,006	0,011			0,006	0,010		
MOYENNE - 2 E.T.				MOYENNE + 2 E.T.			
	1,205				0,308		

TABLEAU 6
VALEURS DES FACTEURS D'INDUCTION

N°	DO ₄₀₅			DO ₆₁₅			F.I.		F.I.
	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 2	BLANC	TÉMOIN	ÉCH no 1	ÉCH no 1	ÉCH no 2	
21	1,250	1,234	0,550	0,041	0,267	1,218	4,227	0,163	1,268
22	1,217	1,255	0,600	0,044	0,283	1,030	3,515	0,319	2,273
23	1,230	1,250	0,688	0,056	0,291	0,796	2,727	0,444	2,764
261	1,224	1,242	0,799	0,054	0,298	0,583	2,010	0,469	2,513
25	1,221	1,240	0,908	0,051	0,286	0,446	1,540	0,430	2,028
257	1,218	1,226	1,037	0,052	0,279	0,364	1,271	0,352	1,452
29	1,223	1,209	1,146	0,053	0,289	0,318	1,126	0,298	1,112
248	1,244	1,239	1,224	0,059	0,303	0,304	1,050	0,305	1,067
MOYENNE									
24	1,228			0,051	0,287				
E.T.									
05	0,011			0,006	0,010				
MOYENNE - 2 E.T.									
	1,205				0,308				

Figure 1

COURBE STANDARD

CORRECTION COLORIMETRIQUE D0405

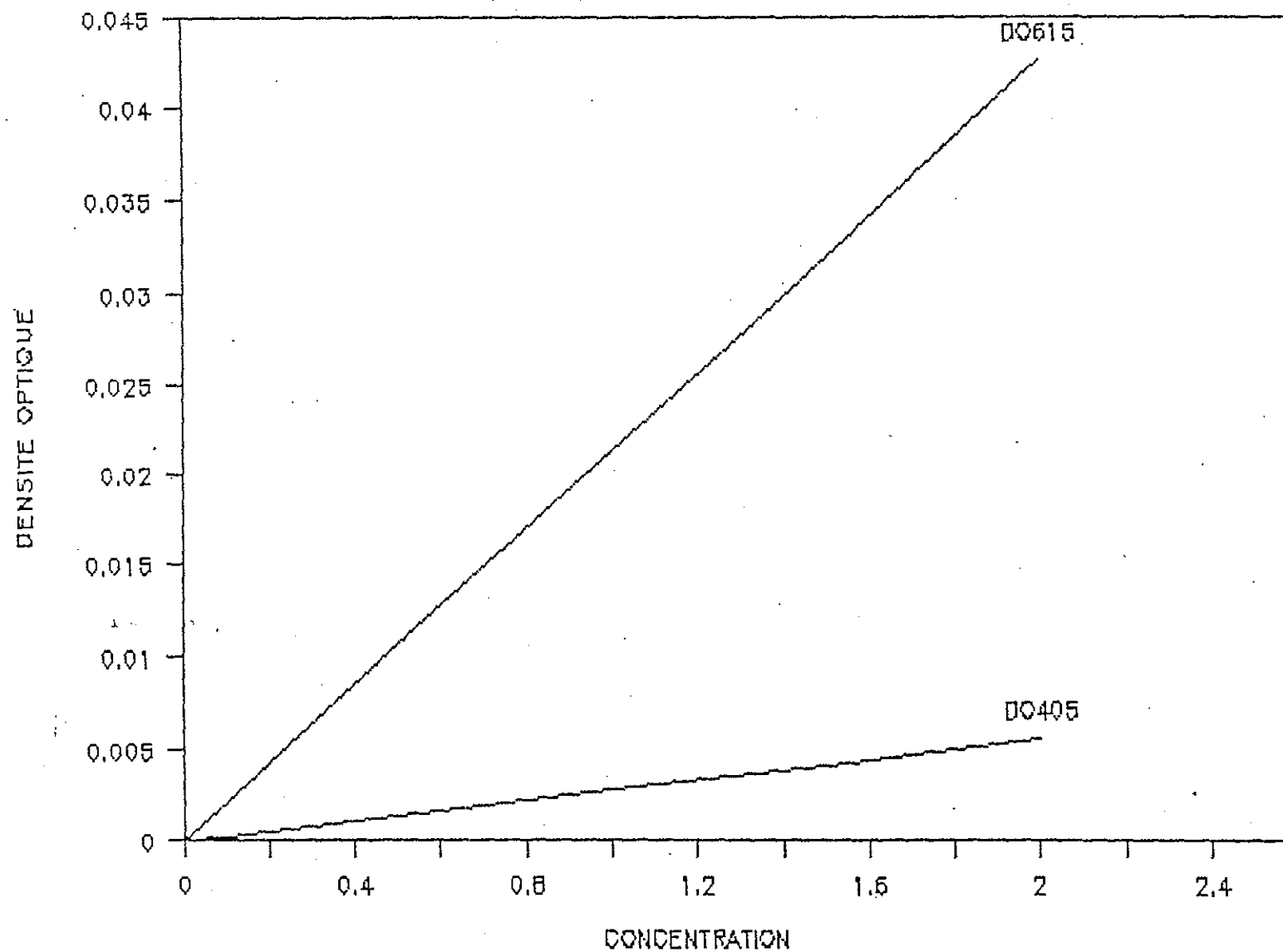


Figure 2

EXPRESSION DE L'ACTIVITE GENOTOXIQUE

COURBE DOSE-REPONSE

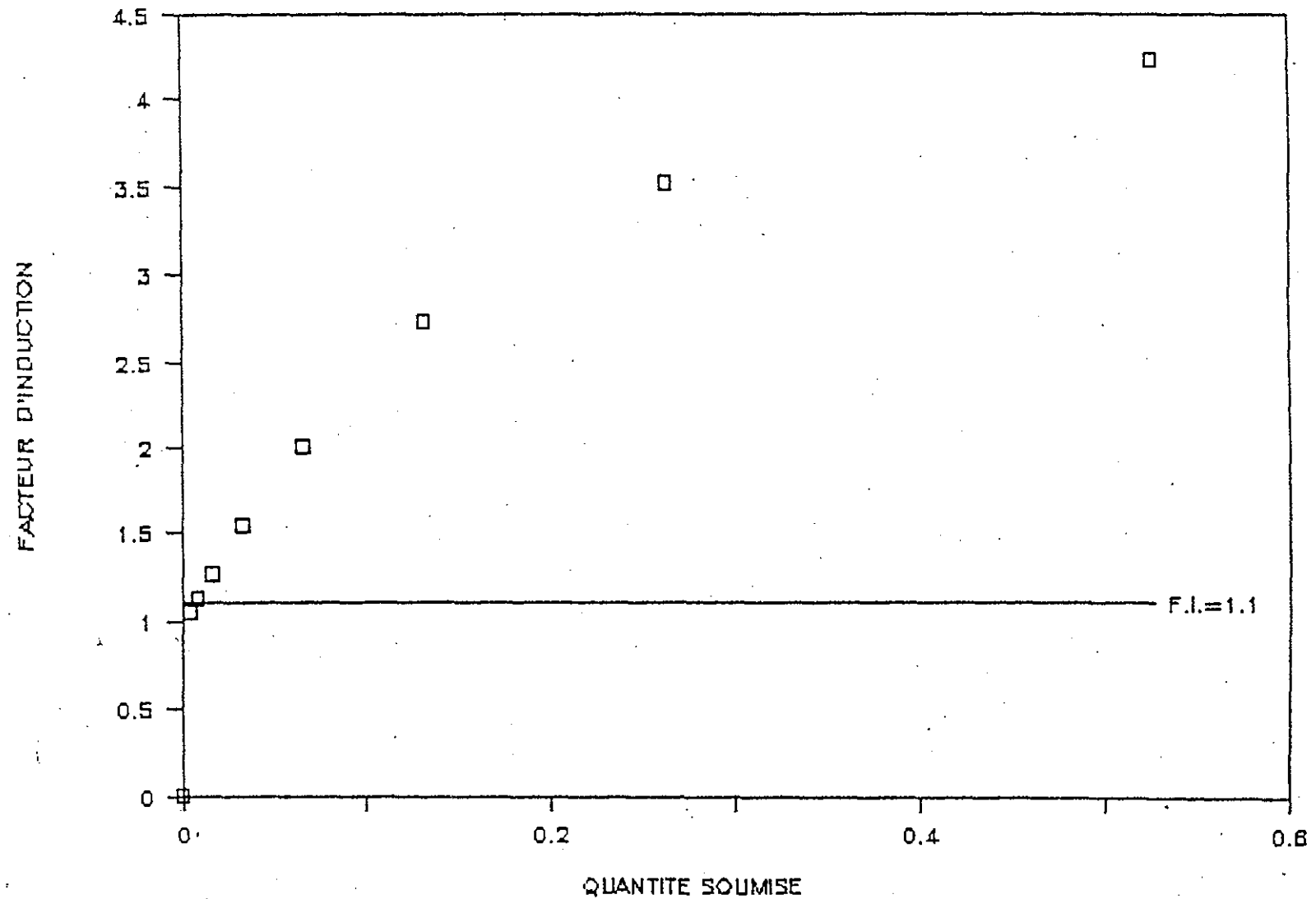
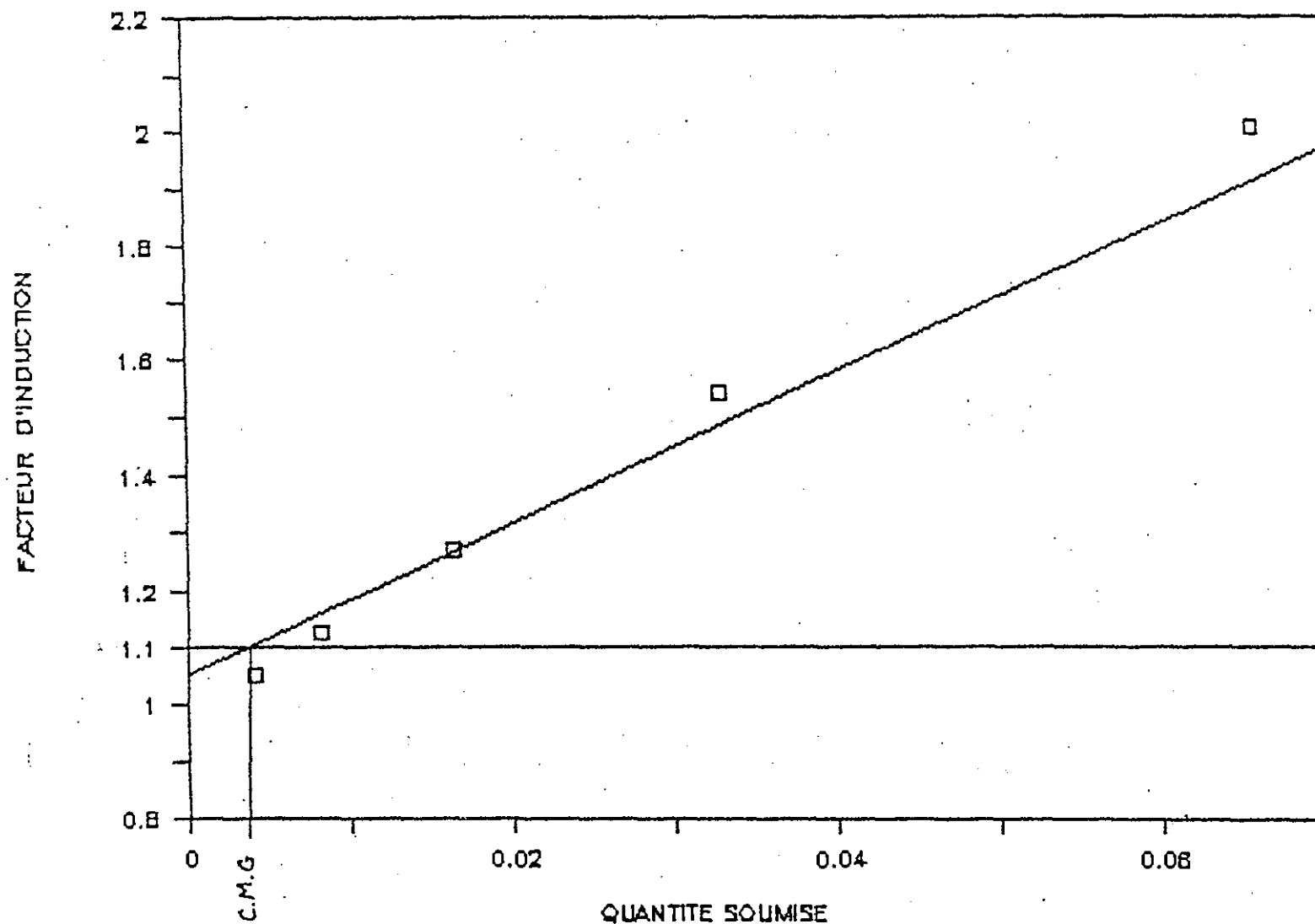


Figure 3

EXPRESSION DE L'ACTIVITE GENOTOXIQUE

DETERMINATION DE LA C.M.G.



bureau de normalisation du québec



Gouvernement du Québec
Ministère de l'Industrie
et du Commerce

NORME

EAUX - DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ

MÉTHODE AVEC LA BACTÉRIE BIOLUMINESCENTE

Photobacterium phosphoreum

NQ 3600-205
87-11-30

Les demandes de renseignements concernant le présent document peuvent être adressées au Bureau de normalisation du Québec, ministère de l'Industrie et du Commerce, 50, rue Saint-Joseph Est, Québec, G1K 3A5. Tél.: (418) 643-5114.

La référence à des marques de commerce a pour but de faciliter la compréhension du texte seulement et ne constitue pas une approbation.

Dépôt légal

Bibliothèque nationale du Québec

ISBN 2-550-09284-8



AVANT-PROPOS

Le Bureau de normalisation du Québec, en collaboration avec le ministère de l'Environnement, a mis sur pied un projet de normalisation des méthodes d'analyse à caractère environnemental de façon à améliorer les outils de travail mis à la disposition des laboratoires oeuvrant dans le domaine de l'environnement.

Pour réaliser ce projet, 8 comités techniques rattachés à un comité de coordination ont été créés à l'automne de 1982 avec le mandat de normaliser et remettre à jour des méthodes analytiques manuelles ou automatisées. Les méthodes visées sont celles utilisées dans la réglementation relative à l'environnement et dans le cadre du programme d'assainissement des eaux ainsi que dans d'autres projets reliés à l'environnement.

Le présent document s'adresse donc à tous les laboratoires ou intervenants reliés à l'environnement.



Le présent document a été élaboré par le comité de normalisation des méthodes biologiques, formé des membres suivants:

BLAISE, Christian	Service de la conservation et de la protection de l'environnement - Environnement Canada
COUTURE, Pierre	Institut national de la recherche scientifique - Eau
JOUBERT, Gérald (président)	Laboratoire de Québec - Ministère de l'Environnement du Québec
MARENGO, Claude	Laboratoire d'Environnement SM inc.
ROY, Yves	Eco-Recherches (Canada) inc.
SPEYER, Menno	Centre de recherche Noranda
THELLEN, Claude	Laboratoire de Québec - Ministère de l'Environnement du Québec



Le présent document a été entériné par le comité de coordination pour la normalisation des méthodes d'analyse à caractère environnemental, formé des membres suivants:

BISSON, Marc	Laboratoire de Québec - Ministère de l'Environnement du Québec
BOUCHARD, Aristide (président)	Direction des laboratoires - Ministère de l'Environnement du Québec
CÔTÉ, Laurent	Laboratoire de Montréal - Ministère de l'Environnement du Québec
GERMAIN, André	Service de la conservation et de la protection de l'environnement - Environnement Canada
JOUBERT, Gérald	Laboratoire de Québec - Ministère de l'Environnement du Québec
LE FLOCH, Annick	Service de l'environnement - Communauté urbaine de Montréal
TROTTIER, Jean	Laboratoire d'analyses et d'expertises alimentaires - Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
GENDRON, Pierre (coordonnateur)	Bureau de normalisation du Québec - Ministère de l'Industrie et du Commerce

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
INTRODUCTION	1
1. DOMAINE D'APPLICATION	1
2. PRINCIPE ET THÉORIE	2
3. FIABILITÉ	2
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	3
5. APPAREILLAGE	3
6. ORGANISMES BIOLOGIQUES ET RÉACTIFS	4
7. PROTOCOLE ANALYTIQUE	5
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	10
9. VOCABULAIRE	14
10. RÉFÉRENCES	17
11. BIBLIOGRAPHIE	17
TABLEAU 1 - EXEMPLE D'UN FORMULAIRE DE DONNÉES UTILISÉ POUR LE TEST D'INHIBITION DE BIOLUMINESCENCE	19
TABLEAU 2 - EXEMPLE DE RÉSULTATS CALCULÉS À PARTIR DU PROGRAMME INFORMATISÉ	20
FIGURE 1 - EXEMPLE D'UN TRACÉ DESTINÉ AU CALCUL DE CORRECTION PHOTOMÉTRIQUE	21
FIGURE 2 - EXEMPLE D'UNE COURBE DE TOXICITÉ TRACÉE SUR PAPIER LOG X LOG, 3 CYCLES	22
ANNEXE A - EXEMPLE D'UTILISATION DES Puits D'INCUBATION DE L'APPAREIL MICROTOX	23
ANNEXE B - EXEMPLE DE PRÉPARATION DE DILUTIONS	24



EAUX - DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ
MÉTHODE AVEC LA BACTÉRIE BIOLUMINESCENTE
Photobacterium phosphoreum

INTRODUCTION

La méthode analytique utilisant le réactif bactérien (Photobacterium phosphoreum) est employée pour la détermination d'une toxicité aiguë sur des échantillons liquides. Cette bactérie marine possède la caractéristique d'émettre une énergie lumineuse résultant de processus métaboliques particuliers; et pouvant être mesurée à l'aide d'un appareil muni d'un photodétecteur spécifique. Ce test de toxicité mesure l'inhibition de la bioluminescence d'une population bactérienne mise en expérimentation dans des conditions définies, laquelle s'exprime par une CI50 de 5, 15 ou 30 minutes. Ce bioessai s'avère utile pour le dépistage et la surveillance parce qu'il est simple, rapide et relativement peu coûteux.

La sensibilité du test se compare avantageusement à celle de d'autres bioessais reconnus (daphnies, poissons, par exemple). Il faut cependant souligner que le test doit être réalisé dans des conditions marines.

La procédure expérimentale a été conçue par la compagnie Beckman qui a, par la même occasion, mis sur le marché en 1978 un appareil de mesure de luminescence appelé Microtox.

Depuis, les écrits scientifiques concernant cette méthode d'analyse donnent un aperçu des différentes applications possibles pour cette bioanalyse (voir la bibliographie au chapitre 11).

1. DOMAINE D'APPLICATION

Le test utilisant la bactérie Photobacterium phosphoreum est applicable pour déterminer la toxicité de divers échantillons liquides tels que: les eaux usées de type industriel, municipal ou agricole; les produits chimiques purs et commerciaux; les eaux de surface; les eaux de



lixiviation et lixiviats de résidus solides; de même que toute autre solution aqueuse susceptible de contenir des substances toxiques.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Ce test de toxicité consiste à déterminer l'inhibition de l'activité bioluminescente de la bactérie marine Photobacterium phosphoreum. Cette inhibition est exprimée sous forme de CI50 (5, 15 ou 30 minutes) rapportées en unités toxiques correspondant à chacune de ces valeurs. La détermination des réactions d'inhibition nécessite l'utilisation d'un appareil muni d'un photodétecteur capable de mesurer l'activité bioluminescente du réactif bactérien, lequel consiste en une souche génétiquement uniformisée de la bactérie marine. Ces bactéries sont lyophilisées en phase exponentielle de croissance. Elles sont hydratées avec une solution de reconstitution afin de donner des suspensions bactériennes homogènes à chaque série de tests.

Puisque le mécanisme de production de lumière de la bactérie est lié à l'activité métabolique cellulaire, la présence d'un toxique aura pour effet de diminuer proportionnellement l'activité lumineuse. La réponse étant très rapide, l'effet peut donc être mesuré par des tests à court terme.

3. FIABILITÉ

3.1 Interférence

La présence de matières en suspension ainsi que la couleur de l'échantillon peuvent nuire à la mesure de luminescence de la bactérie. Il faut alors corriger selon la procédure décrite à la section 7.5.

3.2 Limite de détection

Il a été établi à partir de 236 données obtenues sur une période de 30 jours que 12 % d'inhibition de bioluminescence correspond au minimum d'inhibition significativement détectable, compte tenu des variations dues à la souche bactérienne et à l'appareil (Environnement Québec, 1986). D'une façon pratique, la limite de détection de la toxicité est d'une (1) unité toxique.

3.3 Limite de quantification

Il a été établi à partir de 236 données obtenues sur une période de 30 jours que 17 % et 83 % d'inhibition correspondent au minimum et au maximum d'inhibition significativement quantifiable, compte tenu des variations dues à la souche bactérienne et à l'appareil (Environnement Québec, 1986). D'une façon pratique, la limite de quantification de la toxicité est équivalente à la limite de détection, soit une (1) unité toxique.



3.4 Fidélité

3.4.1 Répliquabilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

3.4.2 Répétabilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

3.4.3 Reproductibilité

Une série de 9 essais réalisés avec 3 lots de réactifs biologiques par 3 techniciens sur 3 instruments différents montre que la CI50 du lauryl sulfate de sodium (LSS) est de 1,57 mg/L. L'écart-type est de 0,28 mg/L. Le coefficient de variation des 81 tests est de 18,2 %. Le coefficient de variation pour les lots varie entre 6 % et 10 %. Aucune différence significative n'est notée en considérant les analystes et les instruments (Bulich et coll, 1981).

3.5 Justesse

Aucune donnée statistique n'est disponible.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

4.1 Prélèvement

L'échantillon liquide doit être prélevé dans un contenant à paroi inerte rempli à pleine capacité. Le volume minimal requis est de 100 mL. Dès le prélèvement, l'échantillon doit être conservé à environ 4 °C jusqu'à son arrivée au laboratoire.

4.2 Agent de préservation

Aucun agent de préservation ne doit être ajouté.

4.3 Délais et conservation

Pour les échantillons liquides, le délai maximal de conservation entre le prélèvement et l'analyse est de 96 heures.

5. APPAREILLAGE

5.1 Matériel

- Récipient pouvant contenir 10 mL d'échantillon.
- Tubes en verre de 12 mm x 75 mm, avec support.



- Cuvettes d'incubation (Microtox ou l'équivalent, jetables, 12 mm x 50 mm).
- Cuvettes à double paroi servant à la correction photométrique (Microtox ou l'équivalent).
- Micropipettes de 10 μ L, 500 μ L et 1000 μ L.

5.2 Équipement

- Photomètre (Microtox ou l'équivalent).
- Enregistreur avec papier.
- pH mètre.
- Agitateur à vortex.
- Réfrigérateur à une température réglée entre 2 °C et 8 °C.

6. ORGANISMES BIOLOGIQUES ET RÉACTIFS

6.1 Organisme biologique (réactif Microtox)

Le réactif est une souche lyophilisée de la bactérie marine bioluminescente Photobacterium phosphoreum. Selon le fabricant, le réactif est stable pour une période de 6 mois lorsqu'il est conservé à une température entre 2 °C et 8 °C.

6.2 Solution de reconstitution

Cette solution, fournie par le fabricant, sert à la reconstitution du réactif bactérien lyophilisé. Elle est constituée d'une eau purifiée et est considérée stable pendant un (1) an lorsqu'elle est conservée entre 2 °C et 8 °C. Cette solution ne doit pas être congelée.

6.3 Solution de dilution

Cette solution, fournie par le fabricant, sert à la préparation des dilutions de l'échantillon. Elle est constituée d'une eau purifiée, contenant 2 % de chlorure de sodium (NaCl). Ce diluant est considéré stable pendant un (1) an lorsqu'il est conservé entre 2 °C et 8 °C. Il ne doit pas être congelé.

6.4 Chlorure de sodium

L'origine marine du réactif bactérien nécessite l'ajustement des échantillons à 2 % (P/V) de salinité par ajout de cristaux de chlorure de sodium.



7. PROTOCOLE ANALYTIQUE

Le protocole détaillé ci-après est spécifique au système d'analyse Microtox qui utilise l'appareil de la compagnie Microbics Corporation (Microtox, modèle 2055). Tout autre système capable de détecter des diminutions de bioluminescence de la bactérie Photobacterium phosphoreum peut également être utilisé.

7.1 Préparation de l'appareil

7.1.1 Étalonnage

L'appareil doit être étalonné de la façon suivante:

- a) mettre l'appareil en marche;
- b) appuyer sur le bouton HV;
- c) tourner le bouton 100 % ADJ environ 4 tours, de façon à ajuster la lecture à 100, puis enclencher le système de blocage;
- d) placer le bouton de la sensibilité (SENSITIVITY) à X10;
- e) fermer le puits de la tourelle vide;
- f) appuyer sur le bouton RUN puis sur le bouton CAL (le signal numérique devrait donner 100 ± 5);
- g) ramener le bouton de la sensibilité (SENSITIVITY) à X1;
- h) ajuster le signal à 0 avec le bouton ZERO ADJ jusqu'au scintillement du signe "--", puis enclencher le système de blocage (le puits de la tourelle doit être vide et ouvert);
- i) vérifier la température de la tourelle (TURRET) (15 °C), de l'incubateur (INCUB) (15 °C) et du puits de bactéries (AIR) (3 °C);
- j) vérifier le voltage de l'appareil en appuyant sur le bouton HV CHECK (le signal numérique devrait donner entre -600 et -900);
- k) appuyer sur le bouton RUN;
- l) mettre l'enregistreur en marche, fermer la tourelle vide et appuyer sur le bouton CAL. (Ajuster l'enregistreur pour obtenir une réponse similaire à celle fournie par l'appareil).



7.1.2 Lecture

Chaque lecture de luminescence est faite dans le puits de la tourelle et requiert un temps de stabilisation d'environ 3 secondes.

7.1.3 Incubateur

Sur l'appareil, le système d'incubation à 15 °C comporte 15 puits, qui sont disposés de la façon suivante:

	1	2	3	4	5
A	o	o	o	o	o
B	o	o	o	o	o
C	o	o	o	o	o

L'annexe A décrit un moyen efficace pour utiliser ce système lors d'un test de toxicité réalisé sur 5 concentrations d'un échantillon.

7.2 Reconstitution du réactif bactérien

La reconstitution du réactif s'effectue de la façon suivante:

- introduire 1,0 mL de la solution de reconstitution dans une cuvette d'incubation et refroidir à 3 °C dans le puits du réactif bactérien pendant environ 5 minutes;
- lorsque l'équilibre thermique est atteint, sortir du réfrigérateur une fiole de bactéries lyophilisées puis verser rapidement la solution de reconstitution dans celle-ci;
- mélanger et transférer rapidement le réactif biologique reconstitué dans la cuvette d'incubation et replacer celle-ci dans le puits réfrigéré à 3 °C;
- stabiliser le réactif durant 15 minutes avant de l'utiliser pour les tests.

7.3 Préparation de l'échantillon

7.3.1 Inspection visuelle de l'échantillon

Les échantillons colorés ou turbides, ou les deux à la fois, peuvent interférer sur les déterminations de luminescence. Ces interférences devront être corrigées conformément à l'article 7.5.



7.3.2 Ajustement de la salinité

Pour les échantillons d'origine non marine, l'ajustement de la salinité se fait par l'ajout de 0,2 g de NaCl par 10 mL d'échantillon.

Les échantillons d'origine marine ne subissent aucune modification de leur teneur saline.

7.3.3 Préparation des dilutions

La détermination de la toxicité se fait à partir des lectures obtenues sur diverses concentrations de l'échantillon testé. Avec l'appareil Microtox, un test peut comporter soit une série de 6 concentrations du produit avec un témoin ou encore une série de 5 concentrations du produit avec duplicata du témoin (voir l'exemple détaillé à l'annexe B).

NOTE 1 - La procédure du bioessai implique une dilution ultérieure de l'échantillon à 50 %. Donc, ne pas oublier de préparer la série de concentrations au double de la gamme prévue pour le test.

7.4 Procédure du bioessai

7.4.1 Test préliminaire

Le but du test préliminaire est de situer l'ordre de grandeur de la CI50. Ce test s'effectue à 2 concentrations différentes avec un témoin. Il est réalisé sur une gamme plus étendue de concentrations de manière à situer la zone de toxicité, ce qui permettra de fixer un meilleur choix des concentrations lors du test définitif.

EXEMPLE - L'exemple suivant décrit la procédure d'un test préliminaire utilisant des concentrations de 2 % et 50 % v/v appliqué à un effluent:

- a) introduire un minimum de 0,5 mL de diluant et 0,6 mL de l'échantillon salinisé dans deux cuvettes d'incubation et laisser stabiliser à 15 °C dans les puits d'incubation A4 et B4 respectivement;
- b) introduire 0,5 mL de diluant dans les cuvettes d'incubation A5, B5 et C5 et laisser stabiliser à 15 °C dans les puits d'incubation;
- c) ajouter 10 µL de suspension bactérienne dans les cuvettes A5, B5 et C5, agiter et replacer à 15 °C pendant environ 10 minutes;
- d) ajuster le signal numérique de l'appareil à 95 avec la cuvette témoin A5 et noter la lecture initiale (I_0) des cuvettes B5 et C5;



- e) ajouter immédiatement 0,5 mL du diluant (de A4) dans la cuvette témoin A5, 10 μ L de l'échantillon (de B4) dans la cuvette B5 et 0,5 mL de l'échantillon (de B4) dans la cuvette C5. Noter la lecture finale après 5 minutes d'incubation (I_5).

7.4.2 Test définitif (5 concentrations avec duplicata des témoins)

La cuvette A3 doit contenir suffisamment de diluant (1,5 mL) ajusté à 15 °C pour permettre la préparation et la dilution dans les cuvettes témoins:

- a) suite à la préparation des dilutions décrites à la section 7.3.3, incuber les tubes à 15 °C dans les puits B1, B2, B3, B4 et B5 (par ordre croissant de concentrations);
- b) dans les cuvettes C1, C2, C3, C4, C5 puis dans les témoins A4 et A5, introduire 0,5 mL du diluant. Incuber durant 5 minutes, ajouter 10 μ L de la suspension bactérienne, mélanger et laisser stabiliser l'activité bactérienne pendant 10 minutes, laquelle est suivie sur l'enregistreur;
- c) lorsque l'équilibre de température est atteint, ajuster le signal numérique de l'appareil à environ 95 à partir de la cuvette contenant la suspension bactérienne (C1 à C5 et A4, A5) présentant la plus forte activité. Noter également la lecture initiale pour chacune des six autres cuvettes (I_0);
- d) transférer immédiatement 0,5 mL de chacune des concentrations de l'échantillon dans la cuvette d'incubation correspondante et agiter. Commencer par les témoins, puis aller de la plus faible concentration vers la plus forte;
- e) incuber pendant 5 minutes, puis noter la lecture finale (I_5), en reprenant le même ordre de lectures que pour les lectures initiales (I_0).

Les lectures peuvent être prises également après 15 minutes ou 30 minutes.

NOTE 2 - Les lectures se font par ordre croissant de concentrations. Le temps de lecture requis à I_0 , I_5 , I_{15} et I_{30} doit tenir compte du temps requis pour la préparation des concentrations (voir l'élément d).

7.5 Correction photométrique

La procédure suivante, utilisant une cuvette à double paroi, permet de quantifier indirectement la réduction de lumière causée par la



couleur ou la turbidité d'un échantillon, ou l'une et l'autre (voir note 3):

- a) introduire 1,5 mL de diluant dans la chambre extérieure d'une cuvette à double paroi et la placer dans le puits de la tourelle;
- b) introduire 1,0 mL du diluant dans une cuvette d'incubation et 2,0 mL de la plus forte concentration de l'échantillon testé dans 2 cuvettes d'incubation et les placer dans les puits d'incubation à 15 °C. L'une servira au nettoyage de la cuvette à double paroi et l'autre à la mesure de luminescence (voir note 4);
- c) après équilibre thermique, introduire 50 µL du réactif bactérien dans la cuvette d'incubation contenant le diluant et agiter;
- d) dans la chambre intérieure de la cuvette à double paroi, ajouter la solution bactérienne à une hauteur équivalente à celle de la chambre extérieure et chasser les bulles par chiquenaudes;
- e) fermer la tourelle, placer le bouton de l'appareil en position de lecture (READ) et ajuster le signal numérique à environ 90 avec le bouton d'ajustement (100 % ADJ). Incuber pendant environ 20 minutes, jusqu'à la stabilisation de la réaction de luminescence. Cette réaction doit être suivie avec l'enregistreur. Les quatre dernières minutes les plus stables serviront au calcul de correction photométrique (voir article 8.3);
- f) sans retirer la cuvette de la tourelle, vidanger le diluant contenu dans la chambre extérieure en l'aspirant à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une seringue; rincer ce compartiment avec 1,5 mL de l'échantillon stabilisé à 15 °C et vidanger de nouveau;
- g) introduire 1,5 mL de l'échantillon préparé en b) dans la chambre extérieure de la cuvette;
- h) fermer la tourelle et enregistrer l'activité bioluminescente pendant au moins 10 minutes. Les données enregistrées entre la sixième et la dixième minute serviront au calcul de correction photométrique (voir article 8.3).

NOTES -

- 3) S'assurer que la température dans les puits est la même que celle employée pour le bioessai définitif et utiliser la même souche bactérienne.



- 4) Pour un produit chimique ou une solution inconnue, employer la plus forte concentration utilisée pour le bio-essai définitif.

7.6 Toxique de référence

Le toxique de référence recommandé est le lauryl sulfate de sodium (LSS). Compte tenu du potentiel de variabilité entre les réactifs bactériens, il est recommandé de procéder à un test de référence pour chaque réactif reconstitué. Il est suggéré que le test soit réalisé à une gamme de concentration de 0,5 mg/L à 25 mg/L de LSS.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les données et les valeurs calculées peuvent être compilées sur une feuille de résultats comme celle présentée au tableau 1. Cette feuille de résultats inclut les renseignements relatifs à l'échantillon et à la souche bactérienne ainsi que le tableau des données observées et calculées. Ce tableau présente les données obtenues des témoins pour chaque niveau de concentration ainsi que la correction photométrique, si nécessaire.

8.1 Calcul du rapport des témoins: R_t

La formule suivante permet de calculer le facteur de correction relié à la variabilité de l'activité bioluminescente des témoins durant chaque test:

$$R_t = \frac{I_t(T)}{I_0(T)}$$

où R_t : activité des témoins après le temps t ;
 $I_0(T)$: valeur initiale de la bioluminescence du témoin;
 $I_t(T)$: valeur au temps t de la bioluminescence du témoin.

Calculer d'abord R_t pour chaque réplicat des témoins, et établir la moyenne $\bar{R}_t$. Ceci permet, par la même occasion, de comparer l'activité de chaque témoin. La différence entre les valeurs de R_t devrait être inférieure à 0,04 pour les témoins, sinon le test est jugé non valable et doit être repris.

8.2 Expression de l'activité de bioluminescence

La formule suivante permet de corriger les variations de bioluminescence pour chaque concentration testée et d'exprimer en gamma (γ_t) la réaction d'inhibition:

$$\gamma_t = \frac{\text{lumière perdue}}{\text{lumière restante}}$$



$$= \frac{\bar{R}_t I_0 - I_t}{I_t}$$

$$= \frac{\bar{R}_t I_0}{I_t} - 1$$

où γ_t : valeur corrigée de la réaction d'inhibition pour chaque concentration, qui correspond au temps d'incubation t ;

$\bar{R}_t$: moyenne de l'activité des témoins calculée à la section 8.1;

I_0 : valeur initiale de la bioluminescence pour chaque concentration;

I_t : valeur au temps t de la bioluminescence pour chaque concentration.

L'effet toxique net doit être ainsi calculé pour chaque concentration et pour chaque durée d'incubation. Lorsque l'échantillon ne présente pas d'interférence photométrique, la détermination des concentrations inhibitrices (CI) doit être faite conformément aux indications de l'article 8.4.

8.3 Correction photométrique

- a) En se référant à l'article 7.5, tracer sur le papier enregistreur les 2 lignes droites correspondant à l'enregistrement des 4 dernières minutes d'incubation du témoin (I_p) et de la concentration testée de l'échantillon (I_f). Extrapoler les droites afin de déterminer les 2 valeurs de luminescence I_p et I_f (voir figure 1).
- b) A partir de ces valeurs, calculer l'absorbance résultant de la correction photométrique (A_c) pour la concentration de l'échantillon utilisée (C_0):

$$A_c = 3,1 \ln \frac{I_p}{I_f} \quad \text{ou} \quad = 7,14 \text{ Log } \frac{I_p}{I_f}$$

où A_c : absorbance résultant de la correction photométrique pour la concentration de l'échantillon utilisée C_0 ;

3,1 et 7,14: constantes permettant de corriger les différences géométriques entre la cuvette de correction photométrique et les cuvettes



d'incubation selon que le logarithme naturel (ln) ou le logarithme à base 10 (Log) est utilisé;

I_p : valeur de la bioluminescence obtenue à partir du tracé du témoin;

I_f : valeur de la bioluminescence obtenue à partir du tracé de l'échantillon.

- c) Calculer la contribution de l'absorbance due à l'échantillon pour chaque concentration du test définitif:

$$A_x = \frac{C}{C_0} \cdot A_c$$

où A_x : absorbance due à l'échantillon à la concentration x ;

C : concentration utilisée dans le test;

C_0 : concentration utilisée pour la détermination du A_c .

- d) Transformer en transmittance (T_x) les valeurs d'absorbance (A_x) obtenues:

$$T_x = \frac{1 - e^{-A_x}}{A_x}$$

où T_x : transmittance calculée à la concentration C de l'échantillon.

- e) Calculer les valeurs de gamma corrigées (γ_c) pour chaque niveau de concentration:

$$\gamma_c = T_x (1 + \gamma_t) - 1$$

8.4. Détermination des concentrations inhibitrices

A partir des valeurs de γ obtenues directement (γ_t ; voir article 8.2) ou corrigées (γ_c ; voir article 8.3), procéder à la détermination des valeurs de CI, directement sur papier graphique (figure 2) ou à partir d'une courbe de régression. Le traitement des données est basé sur une relation dose-réponse linéaire lorsqu'elle est exprimée de façon logarithmique. La conversion des valeurs de gamma en pourcentage d'inhibition (% I) est obtenue par la relation suivante:

$$\% I = \frac{\gamma}{1 + \gamma} \times 100$$



où γ : expression de l'inhibition de la bioluminescence basée sur le rapport de la lumière perdue sur la lumière restante. Une valeur de gamma égale à un (1) équivaut à 50 % d'inhibition.

8.4.1 Détermination graphique des valeurs de CI

- a) Utiliser du papier graphique logarithmique 3 x 3 cycles. En abscisse, placer les concentrations de l'échantillon et en ordonnée les valeurs de γ .
- b) Lorsque la relation semble linéaire, tracer la droite la plus probable en tenant compte des valeurs de γ situées entre les limites de quantification.
- c) Interpoler à partir de cette droite la concentration correspondant au pourcentage d'inhibition recherché (10, 20, 50 et 80 % d'inhibition correspondent à 0,1, 0,25, 1,0 et 4,0 en gamma). Les valeurs de CI sont ainsi rapportées sur la feuille de données (tableau 1). L'intervalle de confiance sur une valeur de CI ne peut être déterminé graphiquement.

8.4.2 Détermination des valeurs de CI par régression

A l'aide des valeurs de γ et des concentrations correspondantes, une droite du type $\text{Log } \gamma = \text{Log } A + B \text{ Log } C$ peut être déterminée par régression linéaire.

L'intervalle de confiance à 95 % de probabilité sur une valeur de CI est déterminé par calcul selon les équations basées sur une droite de régression linéaire. Les données de l'équation de régression, le coefficient de corrélation et la méthode de calcul de l'intervalle de confiance doivent être rapportés.

NOTE 5 - Un programme informatisé sur Apple IIe développé par Environnement Canada est disponible pour la détermination des valeurs de CI.

8.5 Expression de la toxicité

Les valeurs de CI50 et les intervalles de confiance déterminés peuvent être par la suite transformés en unités toxiques (U.T.), telles que définies par Sprague et Ramsay (1965).

8.6 Estimation de la toxicité

Lors de l'évaluation de la toxicité, l'analyste peut être confronté à des difficultés qui sont inhérentes à la spécificité du bioessai ou à la forme chimique du produit à l'étude. Normalement, il est préférable d'avoir 3 points à l'intérieur des limites de quantification pour éta-



blir des données statistiques du tracé de la droite et obtenir la valeur de la CI50. Cependant, 2 points seulement peuvent être utilisés dans les différentes droites de toxicité, étant donné que les points qui se situent à l'intérieur de ces limites sont la plupart du temps en ligne droite. Dans ce cas, aucun traitement statistique ne peut être appliqué et une estimation de la CI50 sera obtenue et rapportée comme valeur estimée.

9. VOCABULAIRE

9.1 Termes et définitions relatifs à la fiabilité

9.1.1 Interférence: tout composé, tout élément, toute particule, tout organisme ou tout facteur, qui affectent le résultat d'une détermination analytique.

9.1.2 Limite de détection: valeur minimale qui peut être décelée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

C'est la mesure d'une réaction biologique équivalant à 2,3 fois l'écart-type (s) calculé à partir d'au moins 10 mesures d'essais du témoin (niveau de probabilité équivalant à environ 95 %). Dans le cas de la toxicité, la limite de détection constitue la concentration équivalant à la mesure décelable de la réaction biologique, laquelle est obtenue à partir d'une droite de toxicité.

9.1.3 Limite de quantification: valeurs minimale et maximale qui peuvent être quantifiées à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité définie.

Ce sont les mesures (inférieure et supérieure) d'une réaction biologique que l'on peut quantifier durant un bioessai avec une fiabilité définie.

La limite inférieure de quantification est la mesure d'une réaction biologique équivalant à 3,3 fois l'écart-type (s) calculée à partir d'au moins 10 mesures d'essais du témoin (niveau de probabilité équivalant à 99 %).

La limite supérieure de quantification est la mesure d'une réaction biologique égale à la différence entre la valeur de la réaction biologique complète, soit 100 % de réponse, et la valeur de la limite inférieure de quantification.

Dans le cas de la toxicité, les limites de quantification constituent les concentrations équivalant aux mesures quantifiables de la réaction biologique, lesquelles sont obtenues à partir d'une droite de toxicité. Un minimum de trois points situés à l'intérieur des limites de quantification devraient servir à tracer cette droite.



9.1.4 Fidélité: à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Selon les conditions d'exécution de l'essai, cette caractéristique s'exprime sous forme de répliquabilité, de répétabilité ou de reproductibilité.

- Répliquabilité: à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre les résultats individuels successifs obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dans les conditions suivantes, même analyste, même appareil, même jour.
- Répétabilité: à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans le même laboratoire et dont au moins l'un des éléments suivants est différent, l'analyste, l'appareil, le jour.
- Reproductibilité: à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre les résultats individuels obtenus sur le même échantillon soumis à l'essai dans des laboratoires différents et dans les conditions suivantes, analyste différent, appareil différent, jour différent ou même jour.

Les trois termes précédents se rapportant à la fidélité s'expriment, à l'aide d'un intervalle de confiance à une concentration donnée, en fonction de l'écart-type (s), à un niveau de confiance spécifié, pour un nombre donné (N_1) de déterminations. Le niveau de confiance habituel est de 95 %.

L'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique d'une série de mesures à un niveau de confiance de 95 % est défini par la double inégalité suivante:

$$\bar{X} - \frac{t(0,975;N_1-1) s}{\sqrt{N_1}} < m < \bar{X} + \frac{t(0,975;N_1-1) s}{\sqrt{N_1}}$$

- où N_1 : nombre de mesures;
- m : espérance mathématique de la moyenne de la population;
- $\bar{X}$: la moyenne arithmétique d'une série de mesures;
- s : l'écart-type d'une série de mesures;
- $t(0,975;N_1-1)$: variable de la distribution de Student au niveau de confiance de 95 % pour N_1-1 degrés de liberté;



$N_1 - 1$: nombre de degrés de liberté.

Lorsque $N_1 \geq 30$, $t(0,975; N_1 - 1) = 2$. Pour $N_1 < 30$, il faut se référer à une table statistique de la distribution de Student pour connaître la valeur de $t(0,975; N_1 - 1)$ correspondant à la probabilité au dépassement bilatéral.

9.1.4.1 Intervalle de confiance des résultats: l'intervalle de confiance bilatéral de la moyenne arithmétique à un niveau de confiance de 95 % pour une mesure individuelle ($N_2 = 1$) ou pour une série de mesures ($N_2 > 1$) à partir d'un écart-type (s) préalablement établi à l'aide d'une série de mesures (N_1) sur un échantillon de concentration équivalente est défini par la double inégalité suivante:

$$\bar{X} - t(0,975; N_1 + N_2 - 2) s \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}} < m < \bar{X} + t(0,975; N_1 + N_2 - 2) s \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

où m : espérance mathématique de la moyenne de la population;

$\bar{X}$: moyenne arithmétique de N_2 mesures. Dans le cas d'une seule mesure ($N_2 = 1$), $\bar{X} = X$;

$t(0,975; N_1 + N_2 - 2)$: variable de la distribution de Student au niveau de confiance de 95 % pour $N_1 + N_2 - 2$ degrés de liberté;

$N_1 + N_2 - 2$: nombre de degrés de liberté;

s : écart-type de la moyenne arithmétique de N_1 mesures. Habituellement cet écart-type est calculé lors de la mise au point d'une méthode d'analyse;

N_1 : nombre de mesures qui ont servi à calculer l'écart-type;

N_2 : nombre de mesures effectuées sur un échantillon (en pratique $N_2 = 1$).

L'intervalle de confiance des résultats est basé sur l'hypothèse que l'écart-type est le même dans toutes les séries de mesures de même niveau de concentration.

9.1.5 Justesse: à un niveau donné, étroitesse de l'accord entre la valeur certifiée par un organisme reconnu et le résultat moyen qui serait obtenu si on appliquait le procédé expérimental un grand nombre de fois. Elle s'exprime par le rapport, en pourcentage, de la moyenne des valeurs observées sur la valeur vraie.



9.2 Termes et définitions relatifs à la méthode d'essai

9.2.1 Bioluminescence: phénomène de luminescence chimique qui se produit chez des êtres vivants et qui est dû généralement à des réactions enzymatiques.

9.2.2 CI50: concentration d'une substance toxique provoquant 50 % d'inhibition d'un processus chimique ou biologique après une période fixe d'incubation et dans des conditions définies.

9.2.3 Inhibition: effet d'une substance qui réduit la vitesse de réaction à l'intérieur d'un processus chimique ou biologique.

9.2.4 Toxicité: caractère de ce qui agit comme une substance capable de troubler ou d'interrompre les fonctions vitales d'un organisme.

9.2.5 Unité toxique: expression de la CI50 en valeur absolue. Elle est déterminée en divisant la valeur relative de 100 % v/v par la valeur de CI50 obtenue. L'unité toxique réfère également au facteur de dilution nécessaire pour que la CI50 corresponde à 100 % v/v.

10. RÉFÉRENCES

10.1 BECKMAN, Microtox, System Operating Manual, Beckman Instruments Inc., Microbics Operations, Carlsbad, CA, 1982, 64 pages.

10.2 BULICH, A.A., GREENE, N.W. and INSENBURG, D.L., Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents, Aquatic Toxicity and Hazard Assessment, Fourth Conference of American Society for Testing and Materials, D.R. Branson and K.L. Dickson édit., ASTM STP 737, 1981, p. 338-347.

10.3 SPRAGUE, J.B., and RAMSAY, B.A., Lethal Levels of Mixed Copper - Zinc Solutions for Juvenile Salmon, Journal of Fisheries Research Board of Canada, 22, 1965, p. 425-432.

10.4 ENVIRONNEMENT QUÉBEC, Méthode de calcul des CI50 pour le test d'inhibition de bioluminescence de la bactérie marine Photobacterium phosphoreum, Rapport interne, 1986, 16 pages.

11. BIBLIOGRAPHIE

11.1 BLAISE, C., SKA, B., SABATINI, G., BERMINGHAM, N. et LEGAULT, R., Potentiel de bioaccumulation de substances toxiques d'eaux résiduaires industrielles à l'aide d'un essai utilisant des algues et des bactéries, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, INSERM 106, 1981, p. 155-165.



- 11.2 BULICH, A.A., A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples, Process Biochemistry, March-April, 1982, p. 45-47.
- 11.3 CURTIS, C., LIMA, A., LOZANO, S.J. and VEITH, G.D., Evaluation of a Bacterial Luminescence Bioassay as a Method for Predicting Acute Toxicity of Organic Chemicals to Fish, Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, Fifth Conference of American Society for Testing and Materials, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop édit., ASTM STP 766, 1982, p. 170-178.
- 11.4 DE ZWART, D. and SLOOFF, W., The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Toxicity Assessment of Water Pollutants, Aquatic Toxicology 4, 1983, p. 129-138.
- 11.5 MALLAK, F.P. and BRUNKER, R.L., Determination of the Toxicity of Selected Metalworking Fluid Preservatives by Use of the Microtox System and in Vitro Enzyme Assay, Toxicity Screening Procedures Using Bacterial System, B.J. Dutka and D. Liu édit., Marcel Dekker Inc., New-York, NY, 1984, p. 65-76.
- 11.6 MATTHEWS, J.E. and BULICH, A.A., A Toxicity Reduction Test System to Assist in Predicting Land Treatability of Hazardous Organic Wastes, Hazardous and Industrial Solid Wastes Testing, Fourth Symposium of American Society for Testing and Materials, J.K. Petros Jr., W.J. Lacy and R.A. Conway édit., ASTM STP 886, 1986; p. 176-191.
- 11.7 QURESHI, A.A., FLOOD, K.W., THOMPSON, S.R., JANHURST, S.M., INNISS, C.S. and ROKOSH, D.A., Comparison of a Luminescent Bacterial Test with Other Bioassays for Determining Toxicity of Pure Compounds and Complex Effluents, Aquatic Toxicology and Hazard Assessment, Fifth Conference of American Society for Testing and Materials, J.G. Pearson, R.B. Foster and W.E. Bishop édit., ASTM STP 766, 1982, p. 179-195.
- 11.8 RIBO, J.M. and KAISER, K.L.E., Effects of Selected Chemicals to Photoluminescent Bacteria and their Correlations with Acute and Sublethal Effects on Other Organisms, Chemosphere 12, 1983, p. 1421-1442.
- 11.9 VASSEUR, P., FERARD, J.F., VIAL, J. et LARBAIGT, G., Comparaison des tests Microtox et Daphnie pour l'évaluation de la toxicité avec des effluents industriels, Environmental Pollution, series A, 34, 1984, p. 1-11.
- 11.10 YATES, I.E. and PORTER, J.K., Bacterial Bioluminescence as a Bioassay for Mycotoxins, Applied Environmental Microbiology, 44, 1982, p. 1072-1075.



TABLEAU 1

EXEMPLE D'UN FORMULAIRE DE DONNÉES UTILISÉ POUR LE TEST D'INHIBITION DE BIOLUMINESCENCE

ÉCHANTILLON: LAURYL SULFATE DE SODIUM

ASPECT: Solution mère de 18 mg/L

NO DU LABO: 6

COULEUR: Incolore

DATE reçue: 1985-12-02

pH: 5.9

Analysée: 1985-12-02

BACTÉRIE	TEST RAPIDE							
FIOLE <u>M-504915</u>	No. Cuv.	Concentration	I_o	I_{o_c}	I_5	Δ	$\% \Delta$	Témoin
	B5	0.4 mg/L	89	70	70	0	0	I_o 95
TEMPS <u>60 minutes</u> (Hydratation)	C5	9 mg/L	85	67	23	44	66	I_5 75
								F_c^5 .789

No. Cuv.	TÉMOIN	I_o	I_5	I_{15}	ÉCART DES TÉMOINS (A-B)	
A 5	0 (A)	92	70	58	R(5):	.024
A 4	0 (B)	95	71	58	R(15):	.019
RAPPORT DES TÉMOINS R_t		A	.761	.630	CORRECTION PHOTOMÉTRIQUE	
		B	.737	.611		
		MOY	.749	.621		
No. Cuv.	Concentration	I_o	I_5	I_{15}	REMARQUES	
C 5	9.00 mg/L	84	13	6		
C 4	4.50	89	25	12		
C 3	2.25	89	49	28		
C 2	1.13	90	62	45		
C 1	0.06	82	60	48		

CALCULS

☐ Graph.

☒ Inf.

DURÉE	CI50 (L.C., 95%) mg/L	U.T. (L.C., 95%)
5 min	3.8 (1.0-7.3)	
15 min	2.3 (2.0-2.6)	



TABLEAU 2

EXEMPLE DE RÉSULTATS CALCULÉS À PARTIR DU PROGRAMME INFORMATISÉ

* RÉSULTATS DE LA BIOANALYSE MICROTOX *

$$0,2 < \gamma < 5,0 \quad (P > 99 \%)$$

Description de l'échantillon:
 Lauryl sulfate de sodium (5 minutes)
 # du test = 6
 Testé le 85-10-03
 Facteur de correction des $I_0 = 0,76$

#	Conc. (mg/L)	Gamma γ	% d'inhibition
1	10	1,93	65,8
2	8	1,41	58,6
3	6	0,95	48,7
4	4	0,36	26,7
5	2	0,09	7,9

CI-20 = 3,2 mg/L

* CI-50 = 6,7 (5,6 - 7,6) mg/L

CI-80 = 14,1 mg/L

Le nombre de données utilisées pour le calcul des CI = 4

* Les valeurs $\gamma < 0,2$ et les valeurs $\gamma > 5,0$ sont retirées du calcul de la CI-50

Principales valeurs statistiques

L'équation de la régression est de la forme $\text{Log } \gamma = \text{Log } A + B \text{ Log } C$

Ordonnée à l'origine (A) = -3,439

Pente (B) = 1,81

Erreur type = 0,128

Coefficient de corrélation (r) du test = 0,989

Coefficient de corrélation (r) pour 95 % de confiance = 0,95

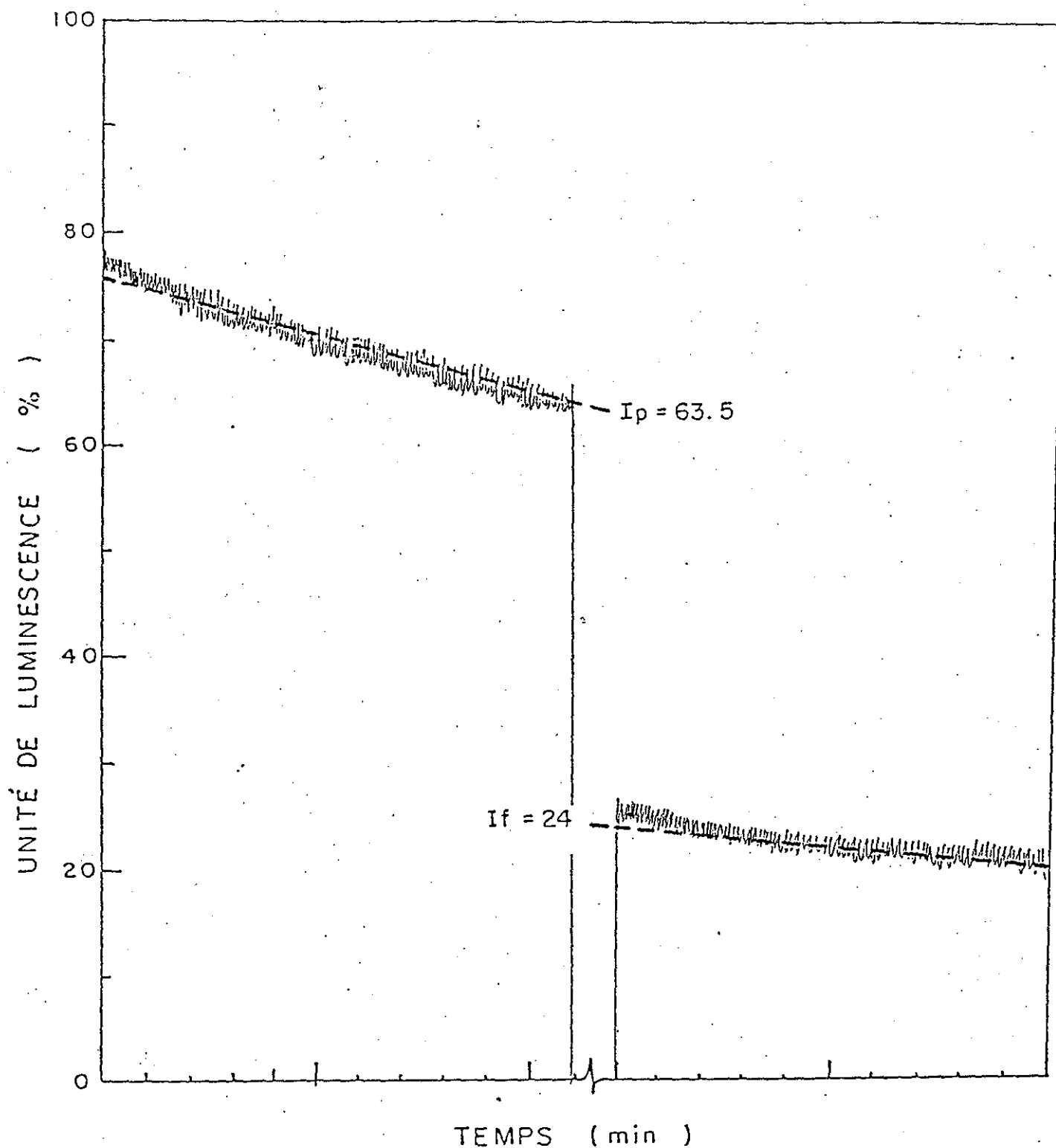


FIGURE 1: EXEMPLE D'UN TRACÉ DESTINÉ AU CALCUL DE CORRECTION PHOTOMÉTRIQUE



PRODUIT: Lauryl sulfate de sodium

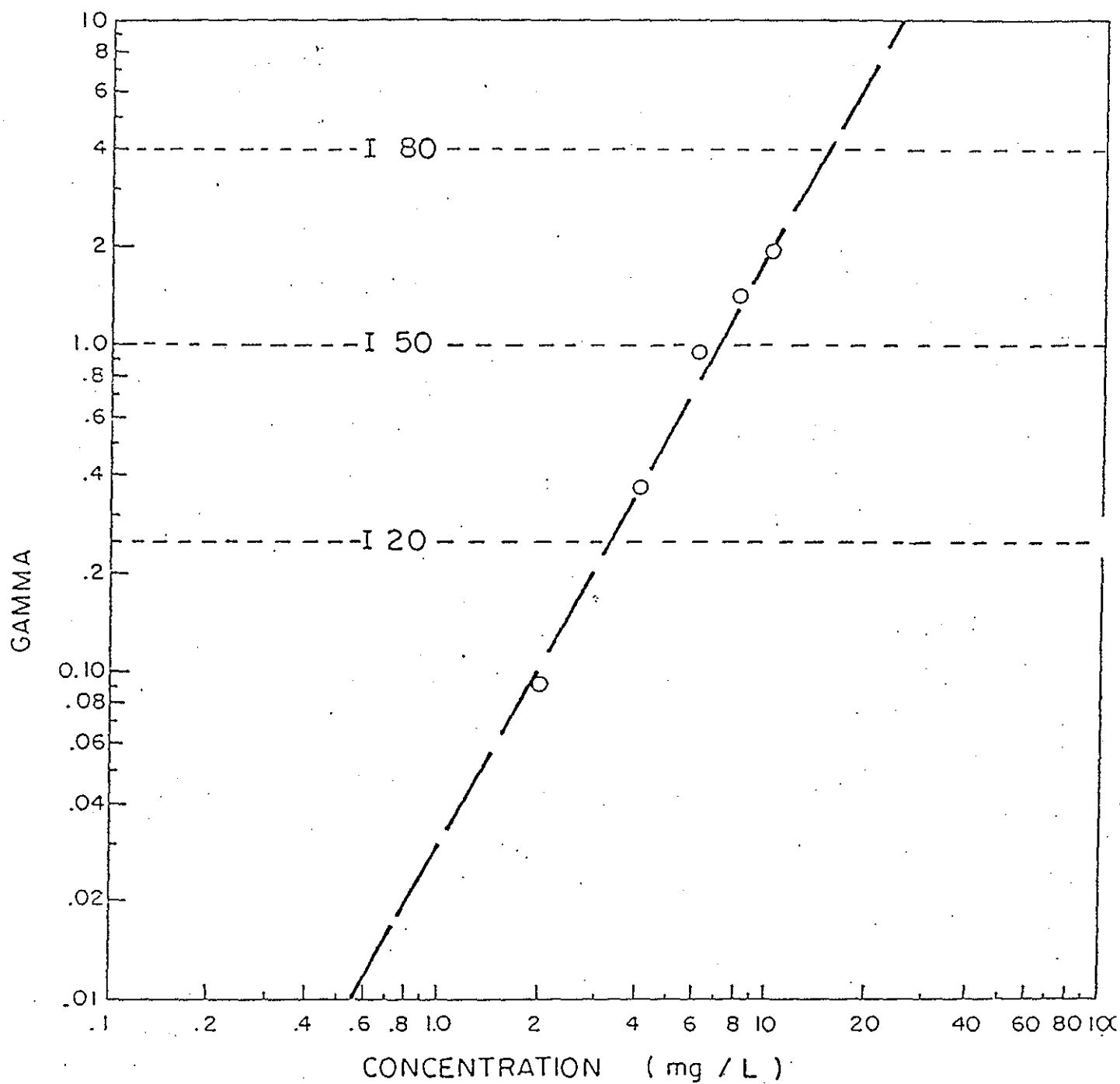


FIGURE 2: EXEMPLE D'UNE COURBE DE TOXICITÉ TRACÉE SUR PAPIER LOG X LOG
3 CYCLES

ANNEXE AEXEMPLE D'UTILISATION DES PUIITS D'INCUBATIONDE L'APPAREIL MICROTOX

Sur l'appareil Microtox, le système d'incubation à 15 °C comporte 15 puits, qui sont disposés de la façon suivante:

	1	2	3	4	5
A	o	o	o	o	o
B	o	o	o	o	o
C	o	o	o	o	o

Lors d'un test de toxicité avec 5 concentrations de l'échantillon, le système d'incubation peut être utilisé de la façon suivante:

- la série B1, B2, B3, B4 et B5 sert à l'incubation des dilutions de l'échantillon;
- la série C1, C2, C3, C4 et C5 sert à la préparation des suspensions bactériennes, puis à la réalisation du test;
- le test est initié par le transfert de chacune des concentrations de l'échantillon en procédant de la façon suivante:
 - B1 est transféré dans C1;
 - B2 est transféré dans C2;
 - B3 est transféré dans C3;
 - B4 est transféré dans C4;
 - B5 est transféré dans C5;
- le puits A3 est réservé au diluant et les puits A4 et A5 servent à l'incubation des témoins durant le test.

ANNEXE BEXEMPLE DE PRÉPARATION DE DILUTIONS

L'exemple suivant décrit les étapes de manipulations requises pour la préparation d'un échantillon à cinq (5) concentrations avec facteur de dilution de 2 à 1 (0,5 x):

- a) numéroté 5 tubes de verre (12 mm x 75 mm) 1, 2, 3, 4, 5;
- b) introduire 2 mL de l'échantillon (dont la salinité a été préalablement ajustée) dans le tube 1, puis 1 mL de la solution de dilution dans les tubes 2, 3, 4 et 5;
- c) transférer 1 mL de l'échantillon (tube 1) dans le tube 2 puis agiter au vortex;
- d) transférer 1 mL de l'échantillon dilué du tube 2 dans le tube 3 puis agiter au vortex;
- e) transférer 1 mL de l'échantillon dilué du tube 3 dans le tube 4 puis agiter au vortex;
- f) transférer 1 mL de l'échantillon dilué du tube 4 dans le tube 5 puis agiter au vortex;

NOTE - Seul l'échantillon du tube 5 devrait contenir 2 mL.

- g) placer, ensuite, les tubes dans les puits B₁ à B₅ de l'appareil à une température de 15 °C. Le bioessai est ensuite réalisé selon la procédure décrite à la section 7.4.2.