

DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ
SUB-LÉTALE SUR MICROPLAQUE AVEC L'ALGUE
Selenastrum capricornutum Printz

ENVIRONNEMENT CANADA
Conservation et Protection
LONGUEUIL (Québec)

Mars 1989

INTRODUCTION

La détérioration accélérée du milieu aquatique suite à ses divers usages a entraîné, durant les dernières années, l'élaboration de bioessais permettant de prédire ou de caractériser les effets (stimulateurs ou inhibiteurs) des substances déversées dans l'environnement. Dans ce contexte, le rôle capital des algues dans les écosystèmes aquatiques a grandement favorisé l'emploi de ces organismes comme indicateurs biologiques de ces essais.

En effet, constituant le premier maillon de la chaîne alimentaire, ces organismes sont considérés comme les piliers de l'organisation du biota aquatique. En conséquence, si leur croissance est affectée, la biomasse des niveaux trophiques supérieurs en subit les répercussions. De plus, les algues sont reconnues depuis longtemps comme des indicateurs sensibles à la qualité de leur milieu, que les effets soient stimulateurs ou inhibiteurs de leurs activités.

La méthode analytique présentée utilise l'algue unicellulaire *Selenastrum capricornutum*. L'essai permet de déterminer une toxicité sub-aiguë sur des échantillons liquides. Le paramètre biologique évalué est la croissance. L'essai consiste à soumettre une population d'algues en phase exponentielle de croissance à plusieurs dilutions de l'échantillon et de mesurer l'effet inhibiteur sur la croissance par comparaison du changement de la densité cellulaire avec un témoin.

La sensibilité de cette algue à plusieurs agents a été grandement documentée. Cette algue est favorisée à cause de sa facilité de culture et la reproductibilité de sa réponse. Finalement, ce bioessai est simple, rapide, peu coûteux et sa sensibilité se compare avantageusement à celle d'autres bioessais reconnus.

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION	1
1. DOMAINE D'APPLICATION	2
2. PRINCIPE	2
3. FIABILITÉ	3
3.1 Interférence	3
3.2 Variabilité du test	3
3.3 Limite de quantification	3
3.4 Fidélité	3
3.4.1 Replicabilité	3
3.4.2 Répétabilité	4
3.4.3 Reproductibilité	4
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	4
4.1 Prélèvement	4
4.2 Agent de préservation	4
4.3 Délais	5
4.4 Préparation de l'échantillon	5
5. RÉACTIFS, MATÉRIEL ET APPAREILLAGE	5
5.1 Réactifs	5
5.1.1 Milieu de culture	5
5.1.2 Diluant isotonique pour le compte cellulaire avec le compteur de particules	7
5.2 Organismes biologiques	7
5.3 Matériel	7
5.4 Appareillage	8
6. MAINTIEN DE LA CULTURE	8
6.1 Culture en milieu liquide	8
6.2 Culture en milieu solide	9
7. PROTOCOLE ANALYTIQUE	9
7.1 Préparation des dilutions de l'échantillon	9
7.2 Préparation de l'inoculum	10
7.3 Préparation de l'essai sur microplaque	10
7.4 Fin de l'essai de toxicité	11
8. CALCUL ET EXPRESSION DES CALCULS	12
8.1 Détermination des pourcentages d'inhibition (% I)	12
8.2 Détermination de la CI ₅₀	12
9. BIBLIOGRAPHIE	13
ANNEXE 1	Exemple numérique pour la préparation d'un essai d'algues sur microplaque
ANNEXE 2	Feuilles de travail

1. DOMAINE D'APPLICATION

L'essai d'inhibition de la croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum* est applicable pour déterminer la toxicité contenue dans les eaux usées industrielles, domestiques ou agricoles, les produits chimiques purs ou commerciaux, les eaux de surface, les eaux de lixiviation, ou tout autre solution aqueuse.

2. PRINCIPE

Ce test de toxicité consiste à déterminer l'inhibition de l'activité reproductrice de l'algue verte unicellulaire *Selenastrum capricornutum* Printz. L'essai consiste à effectuer en triplicata plusieurs dilutions d'un échantillon préalablement enrichi d'une quantité connue d'éléments nutritifs. Cet ajout, tout de même minimisé, permet d'éviter une baisse de croissance due à une carence en éléments nutritifs. Ainsi, après 96 heures d'exposition, le changement de la densité cellulaire comparé à celle d'un témoin est interprété comme une inhibition de la croissance par l'activité toxique des constituants de l'échantillon.

L'inhibition de la croissance est réalisée par numération cellulaire à l'aide d'un compteur électronique de particules ou autres. L'algue *Selenastrum capricornutum* est facilement dénombrée et se prête bien à ce genre d'analyses pour plusieurs raisons tel que son immobilité, elle n'a pas tendance à s'agglomérer et elle n'a pas de grands changements morphologiques durant son cycle de vie.

3. FIABILITÉ

3.1 Interférence

La présence de particules dans l'échantillon ou de débris cellulaires peut interférer avec le dénombrement cellulaire lorsque réalisé avec un compteur électronique de particules.

3.2 Variabilité du test

La variation de l'essai est due à l'inoculum ou à l'état physiologique de la culture au moment de l'inoculation ou encore aux variations du milieu de culture. L'étude réalisée par Thellen et al. (sous presse) indique une variation de la croissance des témoins de 4,8% à 16,2% pour des essais réalisés par six techniciens différents dans trois laboratoires différents (moyenne de 8,7% de variation pour un n de 204).

Blaise et al. (1986) rapportent également une variation de 1,2% à 18,7% dans les croissances des témoins obtenues à partir de 23 essais différents.

3.3 Limite de quantification

Les limites de quantification sont de 16% et de 84% d'inhibition et un minimum de trois (3) points, à l'intérieur de cette zone, servant à tracer la droite de toxicité pour l'obtention de la valeur de la CI50.

3.4 Fidélité

3.4.1 Replicabilité

Aucune donnée statistique n'est disponible.

4.3 Délais

Tous les échantillons doivent parvenir au laboratoire dans les 24 heures suivant le prélèvement. Le délai analytique est de 48 heures.

4.4 Préparation de l'échantillon

L'échantillon est filtré à 0,45 μm avant l'utilisation pour l'essai afin d'éliminer les algues et les bactéries de l'échantillon. La filtration par pression est la plus appropriée. Le pH de l'échantillon peut être ajusté entre 7 et 8.

5. RÉACTIFS, MATÉRIEL ET APPAREILLAGE

5.1 Réactifs

Les produits chimiques utilisés sont de grade ordinaire ("Reagent grade"). L'eau recommandée est une eau distillée (par exemple, une eau Millipore Super Q, stérilisée à 121°C et une pression de 1,1 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$).

5.1.1 Milieu de culture

5.1.1.1 Solution de macroéléments

<u>Solution</u>	<u>Composé</u>	<u>Concentration</u> ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	NaNO_3	25,5
2	$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,0
3	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,41
4	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,7
5	K_2HPO_4	1,044
6	NaHCO_3	15,0
		...6

5.1.1.2 Solution de microélément (solution 7)

H_3BO_3	185,52	mg L ⁻¹
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415,61	mg L ⁻¹
ZnCl_2	0,3271	mg L ⁻¹
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,428	mg L ⁻¹
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,012	mg L ⁻¹
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7,26	mg L ⁻¹
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	160,0	mg L ⁻¹
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300,0	mg L ⁻¹
(sodium éthylènediaminetétraacétate)		

5.1.1.3 Milieu de culture de soutien (1 X AAM)

Les six solutions de macroéléments (section 5.1.1.1) et la solution de microéléments (section 5.1.1.2) sont tous 1 000 fois concentrées. Le milieu de culture se prépare en ajoutant un (1) mL de chacune des solutions à 900 mL d'eau, dans l'ordre suivant 1, 2, 3, 7, 4, 5, 6. Le volume est complété à un (1) litre. Le pH final est ajusté à $7,5 \pm 0,1$ avec du 0,1 N NaOH ou du HCl. Le milieu est filtré sous une pression de 0,5 atmosphère sur une membrane de 0,45 μm . Le milieu est conservé à 4°C.

5.1.1.4 Milieu de culture enrichi (13,5 X AAM)

Comme dans la section 5.1.1.3, le milieu de culture enrichi de 13,5 X se prépare en additionnant 13,75 mL de chacune des sept solutions préparées aux sections 5.1.1.1 et 5.1.1.2 à un volume approximatif de 800 mL. Le volume est complété à un (1) litre. Le pH est ajusté et le milieu filtré sous pression à 0,45 μm . Cette solution sert d'ajout nutritif durant l'essai sur microplaque.

5.1.2 Diluant isotonique pour le compte cellulaire avec le compteur de particules

Lors de l'utilisation d'un compteur électronique de particules, une solution isotonique est utilisée pour diluer la masse algale. Cette solution est achetée commercialement et se compose comme suit:

NaCl	0,15	mole·L ⁻¹
KCl	3,0	mmole·L ⁻¹
Tampon phosphate (pH = 7,5)	15	mmole·L ⁻¹

5.2 Organismes biologiques

L'algue unicellulaire *Selenastrum capricornutum* (American Type Culture Collection No. 22662) est utilisée comme réactif biologique pour la réalisation de ce bioessai. Les algues peuvent être conservées dans un milieu AAM (Algal Assay Medium) gélosé ou dans un milieu AAM liquide.

5.3 Matériel

- Microplaque stérile avec couvert et 96 puits en forme de "U"
- Pipettes à canaux multiples de 20 et 200 uL
- Pointes de pipette stérile de 20 et 200 uL
- Réservoirs de prélèvement stérile pour pipette
- Éprouvette de verre stérile etposable (16 X 160 mm)
- Tubes à centrifuger stérile etposable (15 mL de capacité)
- Sacs de plastique transparent (16,5 X 20 cm)
- Accuvettes pour compte cellulaire
- Pétri standard
- Membranes de filtration de 0,45 um de porosité.

5.4 Appareillage

- Compteur électronique de particules muni d'une cellule de 70 μm
- Incubateur ($24 \pm 2^\circ\text{C}$)
- Réfrigérateur
- Microscope optique
- Centrifugeuse (capacité de 2000 g)
- Système de filtration sous pression
- Autoclave à cycle humide
- Balance analytique.

6. MAINTIEN DE LA CULTURE

6.1 Culture en milieu liquide

Le repiquage hebdomadaire de la culture algale est essentiel au maintien d'une culture saine. Pour se faire, 1 à 2 mL de culture est transféré aseptiquement dans le milieu de culture de soutien 1 X AAM préparé selon la section 5.1.1.3. La taille du contenant n'est pas critique mais le rapport du volume de solution sur le volume du contenant peut être la cause d'une limitation en CO_2 . Un rapport de 20 pourcent est recommandé.

Les cultures sont conservées dans une unité d'incubation possédant les caractéristiques suivantes:

Température:	$24 \pm 2^\circ\text{C}$
Illumination:	$95 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ en continu
Agitation:	Manuelle, deux fois par jour ou avec un agitateur rotatif capable de fournir un mouvement orbital de 100 rpm.

6.2 Culture en milieu solide

Pour assurer la pureté de la culture, les cultures peuvent être isolées sur du milieu 1 X AAM solidifié avec 1% agar. Les cellules algales sont striées du milieu liquide au milieu solide. Les pétris sont incubés à l'envers jusqu'à apparition des colonies (environ deux semaines). Une colonie isolée est, par la suite, repiquée aseptiquement dans un milieu de culture 1 X AAM stérile. Quand une croissance suffisante est observée dans le milieu liquide, des milieux solides inclinés de 1 X AAM et 1% agar sont inoculés. Lorsqu'il y a croissance sur ces milieux, le tout est conservé à 4°C dans l'obscurité. Chaque mois, les cultures en milieu liquide sont réparties à partir des cultures algales sur milieux solides inclinés.

7. PROTOCOLE ANALYTIQUE

Un exemple numérique du protocole analytique est présenté à l'annexe 1.

7.1 Préparation des dilutions de l'échantillon

Les dilutions peuvent être réalisées en série (eg. 100, 50, 25,...) ou par progression logarithmique (eg. 100, 56, 32, 18,...) ou à partir de proportions différentes (eg. 1, 1:2, 1:3, 1:4,...). Le nombre minimum de replicats par dilution est de trois, mais il est fortement recommandé d'en faire plus. L'eau de dilution utilisée est une eau déionisée stérile. Chaque dilution de l'échantillon doit avoir un volume minimum approximatif de 3 mL si les pipettes à pointes multiples sont utilisées pour distribuer l'échantillon dans la microplaque à l'essai, ou un volume minimum approximatif d'un (1) mL par dilution si une pipette à pointe unique est utilisée.

7.2 Préparation de l'inoculum

L'inoculum d'algues est préparé en centrifugeant approximativement 15 mL d'une culture agée de 5 à 7 jours (phase exponentielle de croissance) à 2 000 g pour 15 minutes. Après élimination du surnageant, le culot d'algues est resuspendu dans 5 à 10 mL d'une solution d'eau distillée stérile, tamponnée avec $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaHCO_3 . Répétez cette procédure deux (2) autres fois. La concentration cellulaire est déterminée en utilisant un compteur électronique de particules ou par hémacymètre.

Le concentré d'algues est dilué avec la solution de NaHCO_3 ($15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de telle façon que l'introduction de 10 μL de l'inoculum dans chaque puits de la microplaque donne une concentration cellulaire de 20 000 cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$.

7.3 Préparation de l'essai sur microplaque

- Transférer 200 μL de chacune des dilutions dans les puits appropriés de la microplaque. La disposition des échantillons dans la microplaque est dépendante du nombre de dilutions utilisées et du nombre de replicat.
- Transférer 200 μL d'eau de dilution dans les puits appropriés de la microplaque. Ces puits serviront de témoins.
- Combiner en proportion égale l'inoculum d'algues et le milieu de culture enrichi (13,75 X AAM). Ajouter 20 μL de ce mélange à chaque puits de la microplaque.
- Placer la microplaque dans un sac transparent, sceller pour éviter l'évaporation et incuber pour 96 heures.

7.4 Fin de l'essai de toxicité

Après l'incubation, le contenu de chaque puits est resuspendu et la croissance des algues est estimée par compte cellulaire. La densité cellulaire peut être déterminée par compteur électronique de particules ou par hémacymètre.

Dans le premier cas, le compteur électronique de particules est calibré selon le manuel de l'utilisateur de l'appareil. Pour chaque dilution de l'échantillon ou chaque témoin et pour chaque replicat, le contenu de chaque puits est homogénéisé, puis 100 uL sont prélevés et dilués dans 9,9 mL de diluant isotonique. Les algues sont dénombrées et les résultats sont rapportés sur une feuille de laboratoire telle qu'illustrée à l'annexe 2.

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1 Détermination des pourcentages d'inhibition (% I)

À partir des quantités de cellules par mL, procéder à la détermination du pourcentage d'inhibition de croissance, par la relation suivante:

$$\% I = \frac{C_t - C_d}{C_t} \times 100$$

où: C_t : Compte cellulaire des témoins exprimé en cellules/mL
 C_d : Compte cellulaire pour une dilution donnée exprimé en cellules/mL
 $\% I$: Pourcentage d'inhibition.

8.2 Détermination de la CI_{50}

La concentration inhibant 50% des algues par rapport au témoin (CI_{50}) peut être estimée par la relation logarithmique des concentrations vs les pourcentages d'inhibition. Habituellement, une droite de régression est déterminée à partir de la portion linéaire comprise entre 16 et 84% bien que ces limites peuvent être excédées. Il est souvent souhaitable de visualiser la distribution des données en traçant la droite sur papier Probit.

L'intervalle de confiance à 95% de probabilité est déterminée par calcul selon les équations usuelles pour une droite de régression linéaire.

La valeur de CI_{50} peut être calculée statistiquement à partir de la droite de régression ou rapportée entre deux (2) concentrations (exemple, 20% v/v $< CI_{50}$ $<$ 50% v/v, valeur estimée).

9. BIBLIOGRAPHIE

BLAISE, C.R., 1986.

"Micromethod for Acute Aquatic Toxicity Assessment Using the Green Alga *Selenastrum capricornutum*", *Tox. Assesm.: An Intern. Quaterly*, 1: 377-385.

JOUBERT, G., 1980.

"A Bioassay Application for Quantitative Toxicity Measurement, using the Green Alga *Selenastrum Capricornutum*". *Water Research*. 14: 1759-1763.

MILLER, W.E., J.C. GREEN et T. SHIROYAMA, 1978.

"The *Selenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Test: Experimental Design, Application, And Data Interpretation Protocol". U.S. Environmental Protection Agency. Report No EPA-600/9-78-018, Corvallis, Oregon, 126 pages.

THELLEN, C., C. BLAISE, Y. ROY et C. HICKEY, (sous presse).

"Round Robin Testing with the *Selenastrum capricornutum* Microplate Toxicity Assay, *Hydrobiologia*.

ANNEXE 1

EXEMPLE NUMÉRIQUE POUR LA PRÉPARATION D'UN ESSAI D'ALGUES SUR MICROPLAQUE

ANNEXE 1

EXEMPLE NUMÉRIQUE POUR LA PRÉPARATION D'UN ESSAI D'ALGUES SUR MICROPLAQUE

1) Préparation des dilutions de l'échantillon

L'échantillon filtré est dilué en utilisant deux ensembles de dilution en série, juxtaposés l'un à l'autre:

- a) Introduire 5 mL d'eau de dilution dans chacune des éprouvettes numérotées de 1 à 10.
- b) Préparer une dilution de 75% v/v de l'échantillon en mélangeant 2,5 mL d'eau de dilution avec 7,5 mL de l'échantillon et homogénéiser.
- c) Ajouter 5 mL de l'échantillon non-dilué ou de la première concentration à l'essai dans l'éprouvette numéro 1 et homogénéiser.
- d) Prélever 5 mL de l'éprouvette numéro 1 et ajouter à l'éprouvette numéro 2. Homogénéiser et répéter cette opération de l'éprouvette 2 à 3, 3 à 4 et 4 à 5.
- e) Ajouter 5 mL de l'échantillon dilué à 75% v/v dans l'éprouvette numéro 6 et homogénéiser.
- f) Prélever 5 mL de l'éprouvette numéro 6 et ajouter à l'éprouvette numéro 7. Homogénéiser et répéter cette opération de l'éprouvette 7 à 8, 8 à 9 et 9 à 10.
- g) Les étapes précédentes permettent donc la préparation des dilutions suivantes:

Numéro d'éprouvette	Dilution (% v/v)
---------------------	------------------

---	100
---	75
1	50
6	37,5
2	25
7	18,75
3	12,5
8	9,375
4	6,25
9	4,69
5	3,125
10	2,343

- h) 200 uL de chacune des dilutions sont introduites dans la microplaque tel qu'illustré à la figure 1. Dans cet exemple, six (6) puits sont utilisés pour chaque dilution et le témoin occupe 24 puits dans les deux dernières rangées.

2. Préparation de l'inoculum

La densité cellulaire du concentré d'algues préparé tel que décrit à la section 7.2 est estimée à 8,8 millions de cellules par mL. Par simple règle de 3, si nous voulons que chaque puits ait une concentration d'algues de 20 000 cellules·mL⁻¹ et que l'inoculum soit ensemencé par un volume total de 10 uL, nous savons que l'inoculum doit avoir:

$$C_I = \frac{C_P * V_T}{V_E} = \frac{20\,000 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1} * 220 \text{ uL}}{10 \text{ uL}} = 440\,000 \text{ cellules} \cdot \text{mL}^{-1}$$

- où:
- C_I = Concentration cellulaire de l'inoculum (cellule·mL⁻¹)
 - C_P = Concentration cellulaire désirée dans chaque puits
(20 000 cellules·mL⁻¹)
 - V_T = Volume total de chaque puits (220 uL)
 - V_E = Volume d'ensemencement pour l'introduction des algues dans
chaque puits (10 uL)

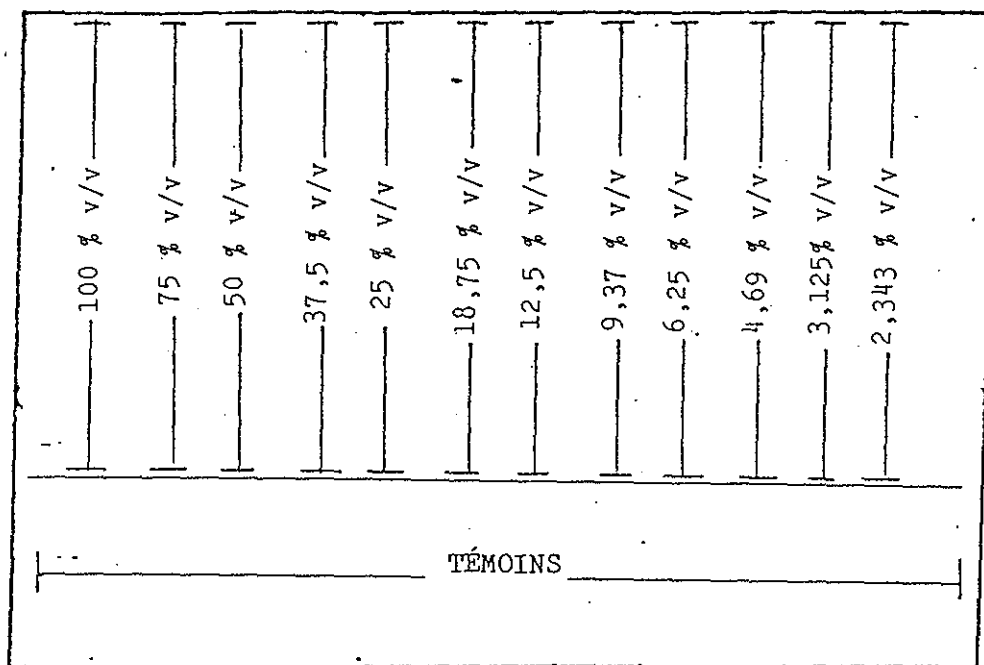
Ainsi, un concentré cellulaire de 8,8 millions de cellules par mL exige une dilution de 1 mL du concentré dans 19 mL d'une solution de NaHCO₃ (15mg·L⁻¹) (volume final de 20 mL) pour obtenir un contenu cellulaire de 440 000 cellules par mL. À cette dilution, est ajoutée 20 mL de milieu de culture enrichi (13,75 X) pour un volume final de 40 mL. De cette solution, 20 uL est transférée dans chaque puits. Le tout est scellé et incubé pour 96 heures.

FIGURE 1

MICROPLAQUE

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

DISTRIBUTION DES ÉCHANTILLONS



ANNEXE 2

FEUILLE DE TRAVAIL

TEST DE TOXICITÉ AVEC ALGUES

ECHANTILLON :	ALGUES :	DATE, réception:
MANIPULATION :	CULTURE :	, analyse :
DILUTION :	INOULATION:	PROJET :
B.F. (Ech) :	MILIEU :	TEST :
		PAR:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

REMARQUES: