



HAL
open science

Développement de bioessais sublétaux pour les évaluations écotoxicologiques des effluents

Christian Blaise

► **To cite this version:**

Christian Blaise. Développement de bioessais sublétaux pour les évaluations écotoxicologiques des effluents. Sciences de l'environnement. Université Paul Verlaine - Metz, 1984. Français. NNT : 1984METZ008S . tel-01775665

HAL Id: tel-01775665

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775665>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

No d'ordre _____

THESE DE DOCTORAT
DE 3ième CYCLE

présentée à
L'UNIVERSITÉ DE METZ
METZ, FRANCE

PAR

CHRISTIAN BLAISE

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19840165
Cote	S/M3 84/8
Loc	Magasin



DÉVELOPPEMENT DE BIOESSAIS SUBLÉTAUX
POUR LES ÉVALUATIONS ÉCOTOXICOLOGIQUES DES EFFLUENTS

Soutenue le 17 décembre 1984, devant le jury d'examen:

- MM. J.C. BLOCK, Professeur à l'Université de Metz
P. COUTURE, Professeur à l'Institut National de la Recherche
Scientifique de l'Université du Québec
D. DIVE, Chargé de Recherches à l'INSERM, Villeneuve-d'Ascq
J.M. JOUANY, Professeur à l'Université de Rouen
G. PERSOONE, Professeur à la Rijksuniversiteit-Gent
R. VAN OILLIE, Scientifique sénior à Environnement Canada,
Montréal
P. VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz: Présidente du
jury.

- 1984 -

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 326920 6

AVANT-PROPOS

Diverses énergies ont participé à la concrétisation de cette thèse. Il m'est très agréable, en ce moment, d'exprimer mes remerciements sincères à tous ceux et celles qui y ont joué un rôle:

Aux membres du jury

Le Docteur J.C. BLOCK, directeur du Centre des Sciences de l'Environnement (U. de Metz), a bien voulu considérer ma candidature au grade postulé en acceptant l'adéquation de mes acquis académiques canadiens et en facilitant les questions administratives à cet égard. Pour sa confiance, son intérêt à nos travaux et sa disponibilité, je tiens à lui témoigner ma profonde reconnaissance.

Le Docteur P. COUTURE, Professeur à l'Institut National de la Recherche Scientifique en Eau (INRS-EAU) de l'Université du Québec, a été pour moi une source de consultation appréciable tout au long du travail expérimental. Pour ses conseils judicieux et son esprit critique, je lui fais part de mes sincères remerciements.

Le Docteur D. DIVE, Chargé de Recherches à l'INSERM (Villeneuve d'Ascq), a inspiré la réalisation du chapitre premier de cette thèse en me suggérant, un jour, d'expérimenter l'emploi des microplaques pour l'entreprise de biotests algaux. Pour d'intéres-

sants échanges scientifiques aussi bien à son laboratoire qu'au nôtre et pour son amitié spontanée, je lui exprime mes remerciements sincères.

Le Docteur J.M. JOUANY, Professeur à l'université de Rouen, nous honore de sa présence par sa participation au jury d'examen. Pour sa disponibilité qui témoigne de l'intérêt qu'il porte envers nos travaux, je lui assure l'expression de ma gratitude sincère.

Le Docteur G. PERSOONE, Professeur à la Rijksuniversiteit-Gent, a pu m'apporter l'aide précieuse de ses encouragements et de ses conseils scientifiques, lors de ses passages au Canada. Cette heureuse collaboration a contribué à orienter positivement nos travaux. Pour ces considérations combinées à sa franche amitié, je lui suis on ne peut plus reconnaissant.

Le Docteur R. VAN COILLIE, Scientifique sénior à Environnement Canada (Montréal), s'est chargé de la co-direction locale des travaux. Je le remercie tout d'abord de m'avoir "contaminé" à l'idée d'entreprendre cette thèse sous sa gouverne. Ce gage de confiance et d'intérêt qu'il m'a démontré suscite chez moi une grande appréciation à son égard. Enfin, qu'il me soit permis de le remercier sincèrement pour m'avoir offert ses judicieux conseils et sa compétence dans une agréable atmosphère d'amitié réciproque.

Le Docteur P. VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz, a bien voulu accepter d'être mon directeur de thèse. Pour ce témoignage de confiance à mon égard, dès le début, je lui manifeste toute ma gratitude. Ses encouragements et ses précieux conseils, tant au Canada qu'en France, ont assuré le bon déroulement de plusieurs aspects du travail expérimental. Pour cette bienveillance, je lui exprime toute ma reconnaissance et mon amitié.

Aux gestionnaires d'Environnement Canada

Monsieur G. MEZZETTA, Directeur Régional du Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, m'a accordé son entière confiance et a fait les démarches administratives appropriées auprès de notre ministère. Pour son soutien, je lui exprime toute ma reconnaissance.

Monsieur G. FORTIER (Directeur Suppléant, Contrôle de l'Environnement, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec) et J.G. BROCHU (Chef Administratif, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec) m'ont offert une collaboration estimable pour plusieurs aspects administratifs reliés à nos travaux. Pour leur coopération constante, je tiens à les remercier sincèrement.

Monsieur P. HIGGINS (Directeur général, Programmes de Protection de l'Environnement, Service de la Protection de l'Environnement, Ottawa) et le Docteur R. SLATER (Sous-ministre adjoint, Service de la Protection de l'Environnement, Ottawa) ont bien voulu m'accorder l'approbation ministérielle de certains déplacements pour les besoins de la thèse. Pour l'intérêt qu'ils ont porté à nos travaux et pour leur aide précieuse, je leur fais part de ma respectueuse gratitude.

A mes collègues de travail aux laboratoires

Monsieur N. BERMINGHAM, Chef des Laboratoires, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, m'a grandement aidé par la constance de sa collaboration à tous les points de vue. En plus, son encouragement, ses idées très innovatrices concernant les différents aspects de l'écotoxicité et sa disponibilité débordante ont été pour moi une grande source de motivation. C'est en toute sincérité que je lui exprime ma profonde reconnaissance et le témoignage de mon amitié.

Monsieur R. LEGAULT, Technologue sénior à nos laboratoires, a été mon bras droit pour tout ce qui concernait l'aspect expérimental des travaux. Touche à tout infatigable, son assistance polyvalente a largement contribué à l'avancement efficace des travaux. Pour sa collaboration de qualité et son dynamisme, je lui manifeste mes sincères remerciements.

Madame D. BRÛLÉ a eu la tâche ingrate de dactylographier les écrits de la thèse. Qu'il me soit permis de lui faire part de ma reconnaissance sincère pour sa patience exemplaire et son dévouement durant cette "épreuve".

Monsieur G. SABATINI, stagiaire au laboratoire, a participé à certaines phases du travail expérimental. Je lui suis gré de sa collaboration à cet égard.

Monsieur F. DUMOUCHEL, technologue à nos laboratoires, a apporté une contribution pour la partie graphique de la thèse. Sa participation à cette fin est très appréciée.

Enfin, je remercie Messieurs R. VEZEAU (chimiste) et I. JOBIN (technologue sénior) pour les divers services consultatifs et analytiques qu'ils m'ont rendus lors des travaux de la thèse.

Aux autres collaborateurs

Je désire également exprimer toute ma gratitude aux personnes suivantes qui ont directement ou indirectement contribué à la réalisation de nos travaux:

- . Docteur A. BULICH, Microbiologiste sénior, Beckman Instruments, Carsbad, Californie, pour ses conseils et la précieuse aide bibliographique qu'il m'a apportés vis-à-vis du troisième chapitre.

- . Docteur J.F. FERARD, Professeur à l'Université de Metz, pour ses conseils, son intérêt, son amitié, sa gentillesse et son aide précieuse lors de mes passages à Metz et de son passage au Canada;

- . Monsieur M. LACHANCE, Agent de Recherches à l'INRS-EAU de l'Université du Québec, pour ses conseils et suggestions relatifs à la statistique des données expérimentales;

- . Docteur B. TROTTIER, Professeur à l'Université du Québec à Montréal, pour sa collaboration active et sa compétence apportées à l'entreprise de certains travaux expérimentaux;

. Docteur P. WELLS, Conseiller en évaluation, Direction générale des questions prioritaires, Environnement Canada, Ottawa, pour ses conseils et son intérêt portés envers nos travaux;

Aux miens

Qu'il me soit permis d'adresser mes sentiments profonds à mes parents pour leur encouragement et leur support moral qui m'ont fait un grand bien tout au long du déroulement de ce travail.

Enfin, pour le soutien essentiel qu'elles m'ont apporté et pour leur grande patience, je remercie mon épouse ALDONA et mes filles EVE-MARIE et MAGDALENA d'avoir supporté cette activité qui n'a pas été sans imposition sur le plan familial. Je les remercie de tout coeur pour leur compréhension à cet égard.

RÉSUMÉ

Les rejets industriels constituent une source de pollution grandissante et, dans ce contexte, l'agression toxique due aux effluents dans l'environnement aquatique présente un problème de premier ordre. Pour démasquer leur potentiel écotoxique, nous préconisons une stratégie intégrée alliant des bioessais à des analyses chimiques afin d'identifier les effets écotoxiques et leurs causes. Vu que ces effets se manifestent à différents niveaux trophiques et écotoxiques et, qu'en plus, le degré de nocivité constaté peut varier en fonction des espèces utilisées, des paramètres employés et de la durée de l'exposition, il s'avère essentiel de recourir à l'emploi d'une gamme de biotests pour préciser l'impact écotoxicologique d'un rejet à l'étude. A cette fin, nous croyons que les biotests de toxicité directe, malgré les critiques classiques qu'on leur attribue, constituent un moyen à la fois fiable et rentable pour mettre en évidence ces effets. Dans le but de contribuer à une approche écotoxicologique intégrée pour dépister l'écotoxicité des effluents, nous avons procédé au développement et à l'application de biotests pratiques au niveau sublétal, à savoir:

- 1) le développement d'un microtest algal;
- 2) le développement d'un test de stress ATP chez la truite arc-en-ciel;
- 3) une évaluation comparative des sensibilités de trois intégrateurs biologiques exposés à des échantillons d'effluents de l'industrie des pâtes et papiers.

Pour développer un biotest algal sur microplaque, on a choisi l'espèce unicellulaire Selenastrum capricornutum. La réalisation expérimentale du microtest s'est avérée avantageuse car elle est simple et rapide par rapport à celle du biotest algal classique. Pour rapporter la toxicité avec le biotest microplaque, les paramètres de dénombrement cellulaire, d'observation visuelle et d'ATP (adénosine triphosphate) ont été utilisés. Dans le cas de l'ATP, nous avons modifié une méthode d'extraction au diméthylsulfoxyde (DMSO), ce qui a permis d'augmenter le seuil de sensibilité de la mesure lumineuse: ceci se révélait important car les densités d'algues dans les puits des microplaques ne sont pas considérables.

L'étude comparative des réponses toxiques (CI50 4 ou 8 jours) entre les méthodes classique et microplaque a été réalisée avec le dénombrement cellulaire. Une deuxième comparaison a aussi été faite entre les CI50 obtenues par dénombrement cellulaire et celles obtenues par la mesure de l'ATP pour le test microplaque. Dans les deux cas, on obtint une bonne concordance pour les réponses toxiques. Nous avons également expérimenté un microtest algal de 4 heures utilisant l'ATP comme mesure de toxicité car ce bioessai semble offrir un potentiel intéressant pour dépister rapidement les effets toxiques flagrants de rejets liquides envers le phytoplancton.

Nous présentons aussi une procédure expérimentale que nous avons développée pour déterminer le stress induit chez la truite arc-en-ciel par des concentrations sublétales d'effluents industriels. Les principales conditions expérimentales permettant de préciser cet effet subléthal sont les suivantes: exposition de 96 heures aux effluents; prélèvement de tissu musculaire blanc; estimation de stress par mesure luminométrique de l'ATP extraite à l'aide du DMSO. Nous avons montré qu'il est possible d'estimer le stress en ne considérant que l'émission lumineuse produite par l'échantillon sans devoir en doser la teneur d'ATP. Ceci présente un avantage marqué car il en résulte une épargne importante de temps et de réactif enzymatique. De plus, l'adéquation du rendement de notre technique au DMSO pour extraire l'ATP du muscle blanc est supportée par le fait que l'on retrouve dans la littérature des teneurs comparables pour cet adénylate chez différentes espèces ichthyennes pour ce même tissu.

L'exposition de truites arc-en-ciel à sept effluents industriels, pour lesquels on a précisé des valeurs CL50 et des CMS (concentrations minimales de stress), nous a permis de constater diverses réponses de stress. Une forte relation linéaire ($r = 0,948$) a été observée lorsque nous avons fait une régression des données de létalité (log des unités toxiques des CL50) avec celles de sublétalité (log des unités toxiques des CMS). Ceci laisse supposer qu'il est possible de prédire des seuils de stress pour les effluents à partir

des données CL50. Pour évaluer la représentativité écologique des CMS, nous avons exposé, à deux composés toxiques de référence, des poissons non-stressés et des poissons préalablement stressés avec une concentration sublétales de l'un des 7 effluents étudiés. Les résultats ont démontré la plus grande vulnérabilité des poissons stressés car leur mortalité était plus élevée que celle des poissons non-stressés. Ainsi, l'utilisation d'un indicateur biochimique tel que l'ATP semble bien approprié pour la mise en évidence du potentiel écotoxique sublétales des effluents.

Par ailleurs, nous avons étudié le portrait écotoxique d'une cinquantaine d'effluents de fabriques de pâtes et papiers en estimant leur toxicité avec des indicateurs biologiques de trois niveaux trophiques, à savoir, la truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri), l'algue unicellulaire Selenastrum capricornutum et la bactérie Photobacterium phosphoreum du système Microtox.

Une première série d'analyses des résultats a fait ressortir une nocivité marquée de ces rejets en examinant les résultats obtenus pour les CI50 (biotests algues et Microtox) et CL50 (biotest truite). Nous avons aussi pu constater que la concordance générale était excellente entre les trois biotests pour rapporter la toxicité des effluents, comme l'indiquent 1) une comparaison entre les nombres de réponses toxiques et non toxiques, 2) une comparaison entre rangs

Une deuxième série d'analyses des résultats a mis en évidence la plus grande sensibilité du biotest algues envers les effluents analysés, suivie de celle du biotest Microtox, par rapport à celle du biotest truite. Il est probable que cette plus grande sensibilité des biotests algues et Microtox s'explique par le fait que leur toxicité s'exprime au niveau sublétal par rapport au test de létalité avec la truite. De plus, la concordance de sensibilité s'aurait meilleure entre algues et bactéries: ceci peut être dû au rapprochement phylogénique existant entre ces deux indicateurs. Malgré ceci, les différences de sensibilité constatées soulignent le besoin d'utiliser plus d'un indicateur pour préciser correctement l'écotoxicité d'un rejet.

Lorsque nous avons évalué la toxicité des effluents étudiés en rapport avec le type 1) de procédé industriel et 2) de traitement des rejets, chaque biotest s'est montré apte à différencier la nocivité en fonction de ces deux variables.

Bref, les biotests et bioindicateurs utilisés se sont révélés des outils sensibles et fiables pour mettre en évidence la toxicité (sub)létale des rejets liquides d'origine industrielle. Ils sont donc recommandables pour des évaluations écotoxicologiques intégrées de ces rejets, lesquelles évaluations peuvent être articulées selon trois niveaux de protection environnementale, à savoir les niveaux létal, sublétal et chronique avec des portées respectivement

TABLE DES MATIÈRES

	Page
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1: VALORISATION D'UN MICROTEST ALGAL POUR PRÉCISER L'ÉCOTOXICITÉ SUBLÉTALE	5
1.1 Contexte	6
1.2 Matériel et méthodes	12
1.2.a Echantillons	12
1.2.b Conditions expérimentales générales	13
1.2.c Test algal "classique"	15
1.2.d Test algal "microplaque"	19
1.3 Résultats et discussion	27
1.3.a Facteurs reliés au test algal microplaque	27
1.3.b Paramètre ATP pour le test algal microplaque	39
1.3.c Précision et "reproductibilité" du test algal microplaque	48
1.3.d Comparaison entre les tests microplaque et classique pour les algues	52
1.3.e Comparaison entre paramètres pour le test algal microplaque	55
1.3.f Comparaison entre durées pour le test algal microplaque	58
1.3.g Etude statistique	61
1.4 Sommaire	74
1.5 Perspective	75

TABLE DES MATIÈRES (suite)

	Page
CHAPITRE 2: EXPÉRIMENTATION DU PARAMÈTRE ATP DES POISSONS POUR ÉVALUER L'ÉCOTOXICITÉ SUBLÉTALE	76
2.1 Contexte	77
2.2 Matériel et méthodes	81
2.2.a Echantillons	81
2.2.b Protocole général	81
2.2.c Bioessai de toxicité létale aiguë	83
2.2.d Mesure du seuil de stress	83
2.3 Résultats et discussion	90
2.3.a Vérifications préalables pour la mesure de l'ATP	90
2.3.b Précision et "reproductibilité" de la mesure de l'ATP	93
2.3.c Comparaison des teneurs d'ATP du muscle obtenues chez la truite arc-en-ciel avec celles d'autres poissons	95
2.3.d Mise en évidence du stress ATP causé par des effluents industriels	97
2.3.e Conséquence du stress ATP sur le plan environnemental	107
2.4 Sommaire	107
2.5 Perspective	109
CHAPITRE 3: COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ DE TROIS BIOESSAIS D'ÉCOTOXICITÉ	111
3.1 Contexte	112
3.2 Matériel et méthodes	118
3.2.a Echantillons	118

TABLE DES MATIÈRES (suite)

	Page
3.2.b Bioessais réalisés	119
3.2.c Traitement des données	121
3.3 Résultats et discussion	125
3.3.a Comparaison des réponses toxiques des trois indicateurs exposés aux effluents de l'industrie des pâtes et papiers	125
3.3.b Comparaison entre les nombres de réponses toxiques et non-toxiques	127
3.3.c Comparaison entre rangs de toxicité	129
3.3.d Comparaison entre classes log de toxicité	131
3.3.e Sensibilité relative des bioindicateurs	133
3.3.f Evaluation de la toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers en fonction du type de procédé industriel	136
3.3.g Evaluation de la toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers en fonction du type de traitement des rejets	139
3.4 Sommaire	145
3.5 Perspective	146
INTÉGRATION	148
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	160

LISTE DES FIGURES

	Page
1. Technique de bioessai algal sur microplaque	20
2. Evolution de la croissance algale en milieu AAM avec et sans EDTA selon les tests classique et microplaque	34
3. Evolution de la croissance algale en milieu AAM sur différentes marques de microplaques	37
4. Dénombrements cellulaires après 4 et 8 jours sur différentes marques de microplaques	38
5. Relation entre URL et cellules algales dosées	45
6. Relation entre ATP et cellules algales dosées	46
7. Seuil de sensibilité pour le dosage de l'ATP cellulaire algal	47
8. Comparaison de toxicité par dénombrement cellulaire entre les tests classique et microplaque	54
9. Comparaison de toxicité avec test microplaque entre trois paramètres	57
10. Comparaison des droites de régression linéaire obtenues entre différentes méthodes de mesure de la toxicité algale	70
11. Vue schématique de la procédure pour mesurer l'ATP dans le muscle blanc chez la truite arc-en-ciel	84
12. Relation poids (mg) versus URL et URL.mg ⁻¹ versus umole ATP.g ⁻¹ lors du dosage de l'ATP du muscle blanc chez la truite arc-en-ciel	91
13. Stress causés par sept effluents industriels au niveau de l'ATP chez la truite arc-en-ciel	98
14. Pyramide de stress montrant les rapports entre unités toxiques sublétales et létales pour sept effluents industriels	100
15. Corrélation entre unités toxiques sublétales et létales pour sept effluents industriels	103

LISTE DES FIGURES (suite)

	Page
16. Comparaison des résultats CI50 et CL50 obtenus pour chaque groupe d'indicateurs exposés aux effluents de l'industrie des pâtes et papiers	126
17. Toxicité des effluents de pâtes et papiers en fonction du type de procédé industriel sans égard au traitement de l'effluent	138
18. Spirale de l'écotoxicité	150

LISTE DES TABLEAUX

	Page
1. Avantages de l'emploi des microplaques pour les bioessais d'algues unicellulaires	9
2. Effort-temps comparatif requis pour la mise en marche d'un bioessai algal selon les tests classique et micro-plaque	23
3. Perte volumétrique d'échantillon due à l'évaporation lors des tests classique et microplaque durant 8 jours	29
4. Dénombrements cellulaires obtenus après 8 jours de croissance en milieu AAM selon différentes proportions volumétriques d'échantillon présentes dans le contenant expérimental	32
5. Essais d'extraction de l'ATP d'une culture de <u>Selenastrum capricornutum</u> après 8 jours d'incubation dans le milieu AAM	41
6. Comparaisons des volumes du DMSO et de l'échantillon dans le mélange du dosage pour la mesure de l'ATP avec deux préparations différentes	42
7. Dosage de l'ATP chez l'algue <u>Selenastrum capricornutum</u> par deux méthodes d'extraction différentes	44
8. Effet du pH du mélange d'extraction sur le pH final du mélange du dosage pour la mesure de l'ATP	49
9. Effet du pH du mélange d'extraction sur l'émission lumineuse de l'ATP	50
10. Précision du biotest algal sur microplaque: coefficients de variation pour 18 microplaques-contrôles	51
11. Précision du biotest algal sur microplaque: coefficients de variation des croissances-contrôles pour les divers échantillons comparés	53
12. Comparaison de tests microplaques de 4 et 96 heures réalisés avec <u>Selenastrum capricornutum</u> pour quatre effluents industriels	60
13. Comparaison de tests microplaques de 4 et 96 heures réalisés avec <u>Selenastrum capricornutum</u> pour deux métaux	62

LISTE DES TABLEAUX (suite)

	Page
14. CI50 employées pour l'analyse statistique des biotests algaux	64
15. Valeurs logarithmiques des unités toxiques employées pour l'analyse statistique des biotests algaux	66
16. Valeurs t de comparaison pour les résultats de toxicité obtenus (1) par dénombrement cellulaire à partir du test classique et du test microplaque et (2) par le test microplaque à partir du dénombrement cellulaire et de l'ATP	67
17. Sommaire des relations linéaires obtenues entre différentes méthodes de mesure de la toxicité algale	69
18. Intervalles de confiance à 95% sur les pentes des équations de régression pour différentes méthodes de mesure de la toxicité algale	72
19. Intervalles de confiance à 95% sur les ordonnées à l'origine des équations de régression pour différentes méthodes de mesure de la toxicité algale	73
20. Teneurs d'ATP ($\mu\text{mole.g}^{-1}$) dosées dans le muscle blanc de la truite arc-en-ciel	94
21. Mortalité comparative de poissons préalablement stressés et non stressés et ensuite exposés à deux composés toxiques	108
22. Applications possibles des tests de stress sur les adénylates	110
23. Comparaison des réponses toxiques et non toxiques entre bioindicateurs pour des effluents de pâtes et papiers	128
24. Différences de rangs de toxicité pour des effluents de pâtes et papiers	130
25. Différences de classes log. de toxicité pour des effluents de pâtes et papiers	132
26. Sensibilité relative des trois bioindicateurs utilisés envers des effluents de pâtes et papiers	134

LISTE DES TABLEAUX (fin)

	Page
27. Toxicité des effluents de pâtes et papiers en fonction du type de procédé industriel	137
28. Toxicité des effluents de pâtes et papiers en fonction du type de traitement des rejets	140
29. Relevé des effluents de pâtes et papiers utilisés pour l'étude et de leurs CI50 et CL50	142
30. Niveaux de protection environnementale pour l'écotoxicité aquatique	149
31. Approche simultanée pour l'évaluation écotoxicologique des rejets en milieu aquatique	156
32. Principaux avantages et emplois suggérés pour les biotests considérés dans cette thèse	159

INTRODUCTION

Le développement industriel a diverses répercussions environnementales parmi lesquelles l'agression toxique est la plus néfaste. Plusieurs stratégies environnementales sont présentement considérées afin d'évaluer les dangers et risques posés par l'écotoxicité et les tests biologiques y jouent un rôle clef. L'utilisation de ceux-ci permet en effet une caractérisation écotoxicologique relativement complète des rejets à l'étude, comme l'ont montré les récents travaux de Van Coillie et al (1983a), Millemann et al. (1984) et Mount et al. (1984) portant respectivement sur des eaux de dépotoirs, des déchets organiques de charbon et divers effluents. L'intérêt porté envers les biotests pour l'étude de sources polluantes s'accroît car on se rend davantage compte qu'ils constituent une méthodologie plus efficace et plus rentable que celle faisant appel exclusivement aux analyses chimiques conventionnelles. On a de plus en plus besoin d'une méthode d'analyse globale, utilisant des bioessais, pour l'évaluation des décharges dans l'environnement aquatique; une récente conférence internationale fut entièrement consacrée à ce sujet (OCDE, 1984).

Au Canada, il n'y a pas encore de politique ferme établie par le Service de la Protection de l'Environnement pour l'évaluation de l'écotoxicité à l'aide de biotests mais il existe un support implicite encourageant une telle initiative (MacGregor et Wells, 1984). Citons certains textes représentatifs à ce sujet:

- "Le ministère de l'Environnement doit voir au développement de modes opératoires simples, rapides et peu coûteux destinés à déterminer les effets toxiques des contaminants de l'environnement..." (Chant et Hall, 1979).

- "L'émission de produits chimiques toxiques artificiels dans le milieu constitue l'une des plus graves préoccupations de notre époque... Les initiatives d'Environnement Canada sont très simples. Nous essayons de prévoir le problème de la contamination toxique au lieu de nous livrer plus tard à des programmes coûteux de rattrapage." (SBSC et Environnement Canada, 1983).

- "Le ministère considère qu'il est essentiel de développer des outils d'interprétation conformes à l'approche de l'écotoxicologie." (Environnement Canada, 1983).

De tels écrits plaident en faveur du développement de bioessais permettant de réaliser des évaluations écotoxicologiques rentables. Cette orientation a été prise à nos laboratoires* depuis 1980 et a permis de mettre au point une approche écotoxicologique intégrée afin de contribuer à la lutte contre les perturbations du milieu aquatique dues à divers rejets. C'est dans cette perspective

*Laboratoires Capitaine Bernier, Service de la Protection de l'Environnement, Environnement Canada, Région du Québec, Longueuil, Québec (Canada).

que les biotests dont il est question dans la présente thèse ont été développés. Il est prévu que ceux-ci feront partie d'une gamme incluant plusieurs outils biologiques capables de préciser les effets létaux, sub-létaux et chroniques d'un rejet à l'étude.

En vue de démasquer le potentiel écotoxique d'échantillons de sources industrielles par l'entremise d'une démarche intégrée réalisée en laboratoire, on peut miser sur les tests d'écotoxicité directe. Malgré que les résultats de tels essais réalisés avec des espèces isolées ne prédisent pas avec certitude des effets comparables pour le milieu naturel, ces tests s'avèrent forts utiles et se révèlent moins complexes et moins coûteux que des expérimentations faites in situ ou avec des micro-écosystèmes. D'ailleurs, selon Cairns (1983a), les tests d'écotoxicité directe seraient le seul moyen vraiment fiable et rentable d'estimer les perturbations environnementales résultant de sources anthropogéniques.

Conscients du fait que le portrait écotoxique d'un rejet industriel se précise au fur et à mesure qu'augmente le nombre d'espèces et de paramètres expérimentés, nous avons réalisé les travaux suivants:

a) développement d'un microtest sublétal d'algues;

- b) potentiel d'un essai subléta1 mettant en évidence un stress physiologique chez la truite arc-en-ciel en utilisant l'ATP comme paramètre;

- c) comparaison des sensibilités de trois bioindicateurs d'écotoxicité (algues, truites et bactéries) exposés à des échantillons d'effluents provenant de l'industrie des pâtes et papiers.

CHAPITRE 1:

VALORISATION D'UN MICROTTEST ALGAL POUR PRÉCISER
L'ÉCOTOXICITÉ SUBLÉTALE

1.1 CONTEXTE

Les programmes de lutte contre les pollutions environnementales nécessitent l'utilisation de tests bioanalytiques variés capables de dépister les dangers écotoxiques qui menacent les écosystèmes aquatiques (Danielson, 1979; Lloyd, 1980; Cairns, 1983b; Chapman et Long, 1983). Pour le choix des biotests, il faut tenir compte de plusieurs facteurs. Tout d'abord, il est tout simplement impensable, pour un personnel limité de laboratoire devant réaliser régulièrement une quantité importante de bioessais avec indicateurs multiples, d'entreprendre des activités exigeantes au niveau du temps qui se traduiraient, en définitive, par une baisse de rendement. Ensuite, les méthodes, en plus d'être fiables, doivent être le plus possible peu coûteuses, rapides, pratiques et simples. Enfin, les techniques devraient pouvoir se prêter à l'automatisation tout en gardant leur valeur scientifique pour la représentativité et la sensibilité des organismes choisis. Dans cette perspective, nous avons entrepris de développer un test algal sur "microplaques" pour la réalisation de bioessais aquatiques.

Il existe de nombreuses applications expérimentales pour les microplaques, dont l'usage est fort répandu en microbiologie clinique (voir entre autres la revue faite par Conrath, 1972). Par contre, celles-ci ont été quasiment inexploitées jusqu'ici dans le domaine environnemental. Mentionnons, cependant, les travaux de Hassett et al. (1981) qui ont développé une microtechnique permettant

de préciser la bioaccumulation de métaux par différentes espèces d'algues vertes et bleues-vertes (unicellulaires et filamenteuses) à l'aide de microplaques. Dive (1981) a également utilisé des microplaques pour un biotest de viabilité de Colpidium campylum, un protozoaire cilié, en présence de diverses expositions écotoxiques.

Pour le développement d'un microtest de toxicité avec algues sur microplaque, nous avons choisis l'algue verte unicellulaire Selenastrum capricornutum Printz. Aujourd'hui, on préconise de plus en plus l'emploi des algues en tant qu'indicateurs de la qualité environnementale, leur polyvalence d'emploi à préciser les répercussions environnementales dues à des facteurs nutritifs ou toxiques ayant été largement documentée (Miller et al., 1978; Couture, 1981; Rai et al., 1981; Van Coillie et al., 1983b). Dans cette tendance, S. capricornutum est, sans équivoque, l'algue expérimentalement la plus utilisée en Amérique du Nord, notamment dans le milieu scientifique québécois (Keighan, 1977; Joubert, 1980a; Couture et al., 1981; Van Coillie et al., 1981 et 1982; Blaise et Couture, 1984). Nous réalisons régulièrement en laboratoire des tests de toxicité avec cette espèce afin d'évaluer effluents, lessivats de déchets solides et autres mélanges complexes en adoptant une méthode presque "classique" avec des paramètres d'incubation semblables à ceux de Miller et al., (1978). Compte tenu de ces antécédents, il apparaissait approprié de tenter le développement d'un test d'algues sur microplaque et de comparer les résultats obtenus avec ceux d'une méthode éprouvée dont la fiabilité et la reproductibilité sont connues (Miller et al., 1978).

Les avantages apportés par l'emploi des microplaques pour la réalisation des tests avec algues sont considérables (tableau 1). Signalons, tout d'abord, que le test classique fait usage de fioles coniques en verre ("erlens" de 125mL) et qu'un volume d'échantillon de 1L est généralement requis afin de satisfaire les exigences analytiques de l'essai (Joubert, 1980a). De son côté, le microtest ne requiert qu'environ 10mL pour sa réalisation. Ceci représente une épargne considérable d'effort au niveau du temps qu'il faut consacrer à la filtration (0,22u), laquelle est essentielle pour les dénombrements cellulaires ultérieurs. Les manipulations requises pour débiter le test classique (préparation des dilutions et dispense volumétrique de 25mL ou plus dans les erlens) sont relativement laborieuses. Par contre, il y a, dans le cas d'un microtest, un rendement accru du traitement d'échantillons vu que les dilutions de l'échantillon sont réalisées en éprouvettes et que la dispense subséquente est accélérée par l'utilisation de micropipettes à dispositif répétitif. L'économie d'espace lors de l'incubation constitue encore un autre facteur favorisant une technique microplaque. De plus, le lavage spécialisé que doivent subir les erlens pour le test classique impose une contrainte additionnelle effort/temps aux utilisateurs. Les microplaques, quant à elles, sont jetables, ce qui élimine les problèmes de contamination et/ou de toxicité pouvant résulter d'une ré-utilisation des erlens. Des imprécisions dans les données analytiques peuvent aussi être imputables à une telle pratique de ré-emploi de verrerie, car les propriétés optiques de celle-ci peuvent changer avec le temps (vieillesse et rayures des fioles, par exemple). Le test microplaque

TABLEAU 1. AVANTAGES DE L'EMPLOI DES MICROPLAQUES POUR
LES BIOESSAIS D'ALGUES UNICELLULAIRES

- Petit volume d'échantillon requis;
- Rendement accru du traitement d'échantillons;
- Economie d'espace d'incubation;
- Possibilités d'automatisation;
- Elimination du lavage de verrerie post-expérimental (les microplaques sont jetables);
- Elimination de contamination potentielle et/ou de problèmes de toxicité résultant du réemploi de verrerie;
- Nombre accru de réplicats par concentration testée.

permet, en outre, d'accroître le nombre de réplicats par concentration testée. Ceci n'est réalisable, dans le cas du test classique, qu'en alourdissant les manipulations méthodologiques. A la lumière de ces nombreux avantages, le développement d'un microtest algal offrait un potentiel intéressant.

Il existe une grande flexibilité quant au choix de la durée de l'exposition toxique. On peut chercher à mettre en évidence une toxicité ultra-aiguë de quelques heures (par exemple, 6 heures: Vasseur et al., 1981; Fitzwater et al., 1983) comme on peut aussi expérimenter une toxicité sub-aiguë pendant plusieurs jours (par exemple, 14 jours: Couture, 1981). Etant donné que nous effectuons de façon routinière des tests classiques de 8 jours, nous avons retenu ce temps d'exposition pour les comparaisons méthodologiques. Les tests de 8 jours ont cependant tendance à être raccourcis à des tests de 4 jours (Couture et al., 1981; OCDE, 1981b; Van Coillie et al., 1983b). En effet, la complexation de substances inorganiques par des composés organiques (métabolites), la biodégradation, la dégradation photochimique et le temps d'acclimatation des cultures sont autant de facteurs pouvant produire une modification de la toxicité originale du matériel testé (Couture et al., 1981). Ces facteurs incitent à l'utilisation de bioessais de courte durée. Nous avons dès lors ajouté un deuxième choix en effectuant des tests de 4 jours dans notre démarche expérimentale. Il nous semblait également pertinent de considérer l'emploi d'un microtest avec réponse toxique ultra-rapide en 4 heures à l'aide d'une mesure paramétrique appropriée; ceci nous a amenés à entreprendre aussi des biotests de cette durée.

Pour les comparaisons méthodologiques avec S. capricornutum, le premier paramètre choisi a été l'inhibition de la croissance, soit le calcul d'une CI50* déterminée par numération cellulaire à l'aide d'un compteur électronique de particules. L'algue S. capricornutum y est facilement dénombrée (Couture, 1981) et l'emploi de ce paramètre a été adopté par divers chercheurs (Chiaudani et Vighi, 1978; Miller et al., 1978; Joubert, 1980a; Truhaut et al., 1980, Couture, 1981). Il semblait donc logique d'effectuer une comparaison entre les méthodes classique et microplaque en fonction de ce type de mesure. On a également expérimenté un second paramètre, à savoir le dosage de l'adénosine triphosphate (ATP) et la CI50 qui s'y rapporte. Trois raisons nous ont encouragés à entreprendre cette expérimentation. Il y a d'abord le fait que l'ATP a été proposé comme un moyen sensible et précis de mesurer la biomasse vivante (Holm-Hansen, 1969; Brezonik et al., 1975; Karl, 1980, Kennicutt II, 1980; Leach, 1981; Vasseur et al., 1981). La mesure de l'ATP permet aussi la réalisation de tests de toxicité sublétales à très court terme (quelques heures), comme l'ont démontré Vasseur et al., (1981): ce dépistage rapide d'effets nocifs envers les populations de production végétale primaire des cours d'eau peut être très utile pour l'évaluation urgente de dangers dans l'environnement (par exemple, déversement accidentel de produits chimiques). Finalement, les travaux de Butterwick et al., (1982) et ceux de Rehnberg et al., (1982) ont montré que les interférences causées par des débris cellulaires

*CI50: Concentration inhibant à 50% un paramètre physiologique pendant une durée précise.

affectaient la justesse des dénombrements effectués à l'aide d'un compteur électronique de particules, d'où l'intérêt porté envers l'ATP comme paramètre additionnel pour mesurer la toxicité.

1.2 MATERIEL ET METHODES

1.2.a Echantillons

Vingt-cinq échantillons d'effluents industriels de la province de Québec ont servi pour cette étude comparative. Treize de ceux-ci provenaient d'industries des Pâtes et Papiers, onze d'industries de production chimique et un seul d'une industrie alimentaire. Ces effluents ont été échantillonnés durant les automnes 1982 et 1983 par le Service de la Protection de l'Environnement (Environnement Canada), Région du Québec. Immédiatement refroidis ($<10^{\circ}\text{C}$) dans des glacières portatives dès leur prise dans des bouteilles en polyéthylène, les échantillons (2L par site) étaient ensuite acheminés au laboratoire où leur pH était ajusté à 7,0 s'il n'était pas situé entre 5 et 9. Chaque échantillon était alors stérilisé par filtration sur membrane (Gelman, GA-8; 0,20 μ) et reversé dans deux bouteilles de polypropylène préalablement stériles. Nous tenons à préciser que l'échantillon était stérilisé par filtration et non par autoclavage, étant donné que ce dernier traitement en modifie la toxicité (Couture et al., 1981; Van Coillie et al., 1982). Si les différents biotests d'algues ne pouvaient débiter concomitamment la journée même, les

échantillons traités étaient conservés au réfrigérateur (4°C). Le délai analytique maximal était de 7 jours. Selon Couture et al. (1981), cette période de conservation n'affecterait nullement la toxicité originale d'échantillons de type industriel.

Des biotests comparatifs ont également été réalisés avec six métaux en solution (Ni^{+2} : $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Co^{+2} : CoSO_4 , Cd^{+2} : CdCl_2 , Zn^{+2} : ZnCl_2 , Cu^{+2} : CuSO_4 , Cr^{+2} : CrCl_2) à partir d'une solution de travail de $500\mu\text{g.L}^{-1}$ pour chaque métal testé.

1.2.b Conditions expérimentales générales

La souche d'algues utilisée, Selenastrum capricornutum, est une chlorophycée unicellulaire qui provenait de la source suivante: Environmental Protection Agency, Corvallis Environmental Research Laboratory, Special Studies Branch, 200SW 35th street, Corvallis, Oregon 97330, USA. Les principaux avantages à utiliser des cultures de cette espèce pour la réalisation de biotests ont été énumérés par Couture (1981). Parmi ceux-ci, notons que ces organismes demeurent en suspension sans s'agglomérer ce qui facilite leur dénombrement à l'aide d'un compteur de particules.

Le milieu nutritif de conservation des algues fut l'AAM 30% ("Algal Assay Medium") contenant divers macro et micro-éléments

(USEPA, 1971). Les algues y étaient repiquées hebdomadairement: seules les cultures en phase logarithmique servaient pour les inoculations bioanalytiques. Afin de maintenir la pureté et d'assurer l'axénie de la culture (pour les biotests faisant appel à la mesure de l'ATP), on réalisa périodiquement un frottis de celle-ci sur boîte Pétri contenant le milieu AAM gélosé à 1%. Après une période d'incubation d'environ deux semaines, une colonie algale isolée provenant de ce milieu semi-solide était transférée aseptiquement dans une fiole conique contenant du milieu AAM stérile. Lorsqu'une croissance visible se manifestait après quelques jours d'incubation, la procédure de repiquage en boîte Pétri et de transfert dans le milieu liquide AAM était répétée deux autres fois. On se servait alors de la dernière culture d'algues en milieu liquide AAM pour un repiquage final sur un certain nombre de géloses AAM à 1% inclinées en éprouvettes. Après incubation, ces croissances algales étaient conservées à 4°C. Mensuellement, une de ces éprouvettes était utilisée pour repartir une nouvelle souche d'entretien.

Les conditions d'incubation des algues dans leur milieu synthétique s'apparentaient à celles de Miller et al. (1978):

inoculum: 1 000 cellules.mL⁻¹ pour les CI50-8 jours
20 000 cellules.mL⁻¹ pour les CI50-4 jours
1 000 000 cellules.mL⁻¹ pour les CI50-4 heures

éclairage: 5380 lux en continu

température: 24 ± 2°C

agitation manuelle: 2 fois par jour (test classique seulement)

Toutes les fioles coniques utilisées pour l'entretien des cultures ou pour le test classique ont subi le procédé de nettoyage requis afin d'éliminer tout problème de contamination. Les différentes étapes de cette procédure de lavage ont été décrites, entre autres, par USEPA (1971), Miller et al. (1978) et Couture (1981).

1.2.c Test algal "classique"

La réalisation du test "classique" suivait des procédures proposées par Greene et al. (1975), Miller et al. (1978) et Joubert (1980a) pour déterminer l'inhibition de la croissance des algues placées en conditions écotoxiques. Elle tenait compte de la teneur en substances nutritives (N ou P) qui contrôle la croissance algale (Shiroyama et al., 1975), laquelle teneur provient de l'échantillon testé et de l'ajout nutritif; ce dernier assure la présence de macro et de micro-éléments en quantités suffisantes pour permettre la croissance des organismes. On comparait les biomasses mesurées aux biomasses théoriques (calculées) pour chaque concentration de l'essai et on calculait par la suite des pourcentages d'inhibition pour préciser la CI50.

Les concentrations de l'échantillon et du contrôle étaient préparées en triplicata dans des erlens de 125mL. Chaque erlen recevait l'apport volumétrique suivant:

AJOUT	VOLUME
Dilutions en série (100, 50, 25... jusqu'à 0,8%) de l'échantillon ou eau déminéralisée (système Millipore Super Q) pour le contrôle	39mL
Milieu AAM concentré 25 fois ¹	1mL
Inoculum ²	$\frac{0,2\text{mL}}{40,2\text{mL}}$

1. La biomasse théorique (Bt) résultant d'une croissance contrôle de 8 jours en milieu AAM normal est de 80mg.L⁻¹ (Shiroyama et al, 1975): la Bt était donc de 50mg.L⁻¹ dans ce cas puisque $80\text{mg.L}^{-1} \times 25 \times \frac{1}{40} = 50\text{mg.L}^{-1}$.
2. Les inocula introduits dans chaque erlen étaient respectivement de 1 000 et de 20 000 cellules.mL⁻¹ pour les tests de CI50-8 jours et de CI50-4 jours.

Il était nécessaire de connaître les teneurs en azote inorganique (NH₄⁺, NO₂⁻ et NO₃⁻) et en phosphore total inorganique (ortho-P+poly-P) de l'échantillon afin de déterminer la Bt. Ces analyses étaient réalisées sur appareil Technicon. La Bt se calculait

alors à partir des facteurs de rendement de biomasse établis par Greene et al. (1975):

- 430: efficacité de production pour chaque mgP.L⁻¹;
- 38: efficacité de production pour chaque mgN.L⁻¹.

La Bt de l'échantillon était établie en fonction de l'élément (P ou N) contrôlant la croissance (Miller et al., 1978) en tenant compte des deux relations précitées.

La biomasse mesurée (B) était calculée selon la relation suivante:

$$B = \left[\frac{50\text{mg.L}^{-1}}{X} \right] Y$$

50mg.L⁻¹: Biomasse théorique résultant d'une croissance contrôlée de 8 jours en milieu AAM selon nos conditions expérimentales

X : cellules.L⁻¹ (moyenne arithmétique des trois erlens = \bar{X}_3) produites dans le contrôle en milieu AAM*

Y : cellules.L⁻¹ (moyenne arithmétique des trois erlens = \bar{Y}_3) produites dans chaque concentration de l'échantillon*

* Le dénombrement cellulaire était effectué au moyen d'un compteur Coulter TALL avec une ouverture de 0,70u.

La toxicité de l'échantillon (CI50) pouvait alors être déterminée en calculant les pourcentages d'inhibition (%I) à l'aide de la formule suivante:

$$\%I = \left[100 - \frac{B}{B_t} \right] \times 100$$

B : biomasse mesurée (mg.L⁻¹) au 8ième jour d'incubation

B_t: biomasse théorique (mg.L⁻¹) pour chaque concentration de l'échantillon, selon le facteur (P ou N) limitant la croissance; pour son calcul, on tenait compte non seulement de l'échantillon mais aussi de l'ajout nutritif.

Les pourcentages d'inhibition étaient calculés à l'aide d'un programme interne (en langage BASIC) placé sur ordinateur Hewlett-Packard. Ensuite, la CI50 était évaluée graphiquement sur papier semi logarithmique (Keuffel and Esser Co., Probability X3 log cycles). Lorsque la CI50 ne pouvait être estimée graphiquement (moins de 3 valeurs de pourcentages d'inhibition pour tracer la droite de toxicité), elle était rapportée en écart de toxicité; celui-ci correspond à une fourchette (en v/v% pour les effluents et en ug.L⁻¹ pour les métaux) à l'intérieur de laquelle se trouve la CI50.

1.2.d Test algal "microplaque"

Il existe plusieurs sortes de microplaques (MP) sur le marché, lesquelles se distinguent par la composition et la qualité du plastique (polyvinyl, polystyrène, etc.), le nombre de puits (4, 6, 12, 24 et 96) et la forme (fond plat, en "V" ou en "U") de ceux-ci. Pour les travaux comparatifs, nous avons fait usage de MP ayant les caractéristiques suivantes:

<u>Composition</u>	<u>Forme des puits</u>	<u>Nombre de puits</u>	<u>Volume des puits</u>
polystyrène rigide	"U"	96	300uL

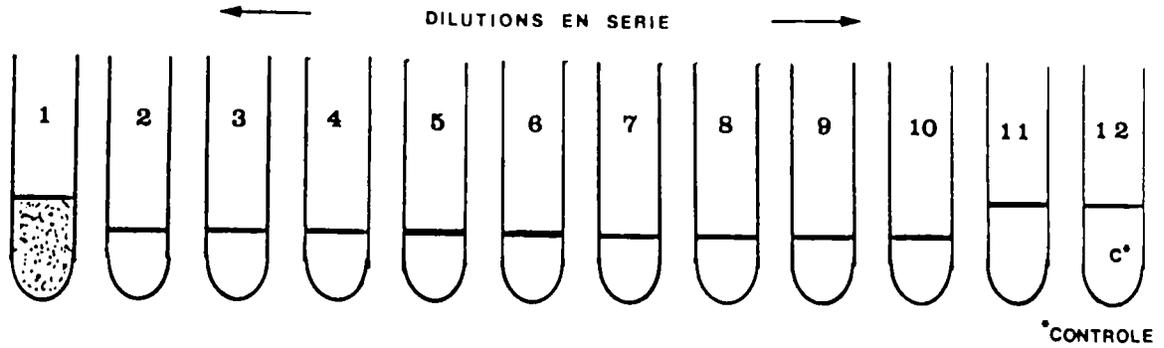
Trois marques commerciales de MP ont été utilisées pour l'élaboration du microtest algal: Nunc (# de catalogue 262162, stérile), Linbro (# de catalogue 76-242-05, stérile) et Cooke (# de catalogue 1-220-24X, non-stérile). Pour les tests de toxicité avec mesure d'ATP, on préféra celles de marque Linbro. Le coût inférieur des MP Linbro et la conception spéciale de leur toiture, laquelle assure une meilleure isolation individuelle à chacun des puits, ont justifié notre choix à cet égard.

La figure 1 schématise la technique utilisée pour les bioessais sur microplaque. Cette technique était identique, que le paramètre de mesure de toxicité soit le dénombrement ou l'ATP. Dans ce dernier cas, il fallait cependant employer des cultures axéniques d'algues et travailler en condition d'aseptie jusqu'à l'incubation.

1



10 mL FILTRES A 0,2 µ

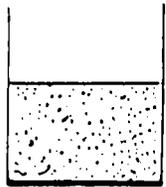


2

PIPETTE MULTIPONTE

200 µL

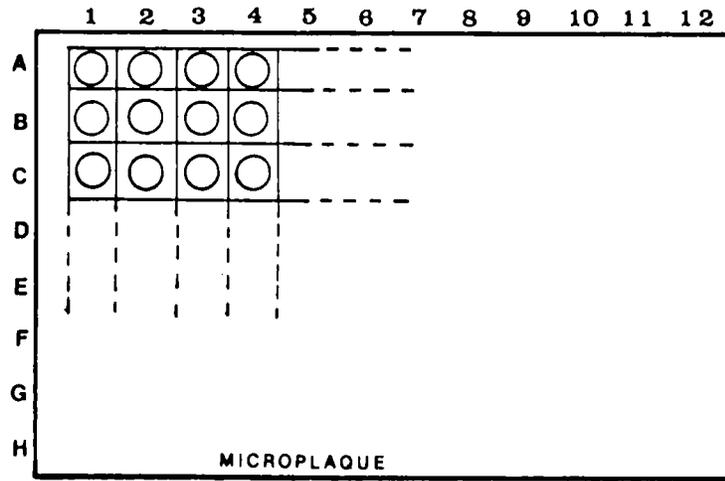
3



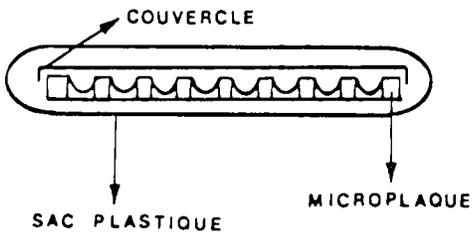
PIPETTE MULTIPONTE

20 µL

MILIEU AAM & INOCULUM ALGAL

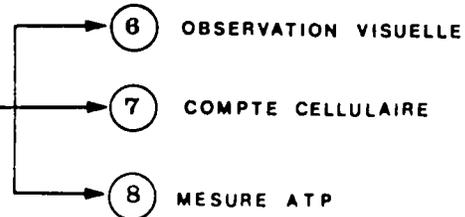


4



5

INCUBATION
4 OU 8 JOURS



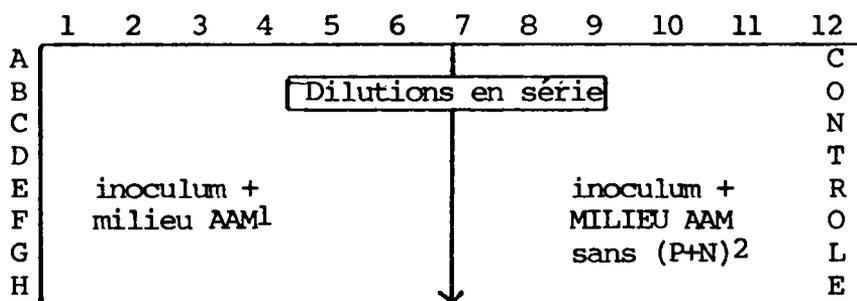
Pour cela, le traitement des échantillons fut le suivant: environ 10mL étaient stérilisés par filtration sur membrane (Gelman, GA-8; 0,2u) et des dilutions en séries étaient pratiquées dans des éprouvettes stériles (16/160mm) avec de l'eau déminéralisée (système Millipore Super Q) et autoclavée (121°C, 1,1 kg.cm⁻² de pression). Ces dilutions étaient versées tour à tour dans un réservoir stérile en plastique (réservoir Titertek, Laboratoires Flow Inc.), duquel on aspirait des parties aliquotes de 200uL qui étaient immédiatement transférées dans les puits appropriés de la microplaque au moyen d'une pipette multi-pointe (Titertek, Laboratoires Flow Inc.). Celle-ci fut utilisée pour la mise en marche de tous les tests (CI50-4 jours et 4 heures), à l'exception de la première série de tests (CI50-8 jours) où l'on employa la pipette Eppendorf à répétition. Les algues et le milieu d'enrichissement AAM étaient ajoutés ensemble de façon identique aux puits de la microplaque selon les proportions suivantes: 10uL d'inoculum (1 000, 20 000 ou 1 000 000 d'algues par mL respectivement pour les CI50-8 jours, 4 jours et 4 heures) et 10uL d'AAM concentré 13,75 fois en vue de l'obtention d'une biomasse théorique de 50mg.L⁻¹ après 8 jours de croissance. La microplaque était ensuite recouverte de son toit plastique et introduite dans un sac transparent (film en polyester, 16,5 x 20cm, Kapak Corp., St-Louis Park, Mn, U.S.A.) dont l'ouverture était scellée à la chaleur pour empêcher l'évaporation. La microplaque était finalement placée dans l'incubateur pour la période voulue dans des conditions identiques à celles du test classique. Précisons ici que le microtest, tel qu'il est présentement élaboré, représente une épargne importante au niveau du temps requis pour la

mise en marche d'un bioessai, comparativement au test classique (tableau 2). Ainsi, il est possible d'exécuter les manipulations expérimentales 2 à 3 fois plus vite en adoptant le test microplaque.

Il y a plusieurs façons de répartir les différentes concentrations d'un échantillon et le contrôle pour la réalisation des tests de toxicité sur MP. Nous avons opté pour l'organisation suivante dans le cas des tests avec les effluents industriels:

six répliquats en milieu AAM¹ avec 8 dilutions pour chacun;

cinq répliquats en milieu AAM sans (P et N)² avec 8 dilutions pour chacun; un contrôle dans 8 puits.



1. L'ajout correspond à une Bt de 50mg.L⁻¹.
2. L'ajout ne contribue pas à une production de Bt, mais assure plutôt une présence suffisante de micro-éléments afin que le potentiel en P et N de l'échantillon pour la croissance algale puisse être précisé (B).

TABLEAU 2. EFFORT-TEMPS COMPARATIF REQUIS POUR LA MISE EN MARCHE D'UN BIOESSAI ALGAL SELON LES TESTS CLASSIQUE (TC) ET MICROPLAQUE (MP)

Opérations	Temps requis (en minutes)		
	TC	MP-12	MP-23
Préparation des dilutions en série et distribution ¹	30	15	10
Ajout du milieu AAM et de l'inoculum d'algues	5	3	1
	<u>35</u>	<u>18</u>	<u>11</u>

1. Préparation de 11 dilutions plus 1 contrôle réalisé en série de 3 pour TC et de 8 pour MP.
2. Temps établi en utilisant la pipette répétitive Eppendorf.
3. Temps établi en utilisant la pipette multipointe Titertek.

Pour les biotests de 4 jours réalisés avec les métaux en solution et pour ceux de 4 heures réalisés avec les effluents ou métaux en solution, le potentiel de croissance dû à l'échantillon (B) n'était pas pris en considération; la disposition des dilutions en série fut alors horizontale (voir figure 1) et chacune de celles-ci, ainsi que le contrôle, étaient présents en 8 réplicats (exemple: la concentration X se trouve dans les puits A1, B1, ...H1 et le contrôle se trouve dans les puits A12, B12, ...H12).

A la fin de la période d'incubation, le contenu des puits de la MP était remis en suspension avec un appareil Rotatiter (Dynatech Produits Inc.). Pour le dénombrement cellulaire, on retirait, à l'aide d'une micropipette, 100uL de chaque puits pour le calcul de la CI50. Ce volume était ensuite versé dans une accuvette contenant 9mL d'une solution électrolyte (Isoton, Coulter Electronics) pour le dénombrement des algues au Coulter.

Pour la détermination de l'ATP, une suspension algale de 100uL était transférée dans des éprouvettes (Micronic PPN tubes 45x8,8cm, Laboratoires Flow Inc.) renfermant chacune 400uL de diméthylsulfoxyde (DMSO: Anachemia, AC-6180); ce composé était destiné à extraire l'ATP (Jakubczak et Leclerc, 1980). Le mélange d'extraction était ensuite homogénéisé pendant quelques secondes. On pouvait alors procéder au dosage de l'ATP après un délai de 20 minutes ou entreposer les éprouvettes capuchonnées à -80°C (Revco, Ultra-low freezer, ULT 385A) pour dosage ultérieur.

La mesure de l'ATP s'est faite par bioluminescence (Karl, 1980; Leach, 1981; Vasseur et al., 1981). Les émissions de photons (unités relatives de lumière = URL) ont été captées par un luminomètre Lumac/3M (Bio-compteur Modèle M2010). Tous les produits et matériel nécessaires pour déterminer les URL et pour effectuer le dosage de l'ATP proviennent de la firme Lumac: "Lumit PM" (réactif luciférase - luciférine de mouche à feu), tampon Lumit à pH 7,75, étalons d'ATP et "lumacuvettes". Certaines expériences ont de plus requis l'utilisation du tampon MOPS (4-morpholino-propyl-sulfonate: Aldrich Chemical Co.). Pour effectuer la mesure des URL d'une suspension algale, on préparait une lumacuvette contenant le mélange suivant:

10uL du mélange homogénéisé à doser (voir plus haut)

100uL de tampon Lumit à pH 7,75 avec 10mM de KCl

100uL de Lumit PM dispensé automatiquement par le luminomètre

Le calcul de la teneur de l'ATP a été effectué à l'aide de la technique de standardisation interne (Bulletin de la Firme Lumac sur la standardisation interne). On déterminait tout d'abord les URL émises par une dilution appropriée de l'échantillon (URL_e) et, ensuite, les URL émises par un réplikat de l'échantillon auquel on avait ajouté 10uL d'une concentration étalon d'ATP (URL_e+ATP étalon). Ceci permettait de quantifier le contenu d'ATP de l'échantillon (ATP_e) selon l'équation suivante:

$$ATP_e \text{ (ug.L}^{-1}\text{)} = \frac{ATP \text{ étalon (ug.L}^{-1}\text{)}}{URL_{e+ATP \text{ étalon}} - URL_e} \times URL_e$$

Pour préciser les pourcentages d'inhibition, on comparait, par rapport au témoin, les croissances cellulaires, les URL ou les teneurs en ATP obtenues aux diverses concentrations de l'échantillon. Tel qu'indiqué en annotation plus haut (voir page 22), il fallait tenir compte de la biomasse (B) résultant des teneurs de l'échantillon en N et P (lorsqu'il y avait supplément en milieu AAM sans N & P) et de la biomasse théoriquement produite (Bt) par l'ajout du milieu AAM complet. Dans ces deux cas, B et Bt étaient fonction de la toxicité qui pouvait se manifester aux diverses concentrations de l'échantillon. Il était donc nécessaire, pour le calcul de la CI50, de retrancher, à chaque concentration considérée, la biomasse (B) résultant exclusivement du potentiel de croissance de l'échantillon à celle (B+Bt) qui résultait de l'ajout du milieu AAM complet. Ainsi, la biomasse résultante, Bt, était celle qu'on comparait à la Bt du témoin pour le calcul de la CI50. La toxicité des échantillons a été calculée à partir des pourcentages d'inhibition (%I) par rapport à l'échantillon témoin selon la formule suivante:

$$\%I = 100 - \left[\frac{Bt \text{ (échantillon)}}{Bt \text{ (témoin)}} \right] \times 100$$

Bt (échantillon): dénombrement cellulaire (cellules.mL⁻¹), émission photonique (URL) ou teneur en ATP (ug.L⁻¹ ou fg. cellule⁻¹) de l'échantillon

Bt (témoin); mêmes paramètres chez le témoin

Les pourcentages d'inhibition étaient déterminés à l'aide d'un programme placé sur ordinateur Apple IIE. Dans le cas du dénombrement cellulaire, par exemple, on spécifiait tout d'abord la moyenne arithmétique de B. Celle-ci était ensuite retranchée de chacune des valeurs B+Bt pour chaque concentration de l'échantillon. Chaque valeur de dénombrement Bt résultante servait à calculer une moyenne arithmétique pondérée Bt. Tout comme pour le test classique, la CI50 était alors évaluée graphiquement et rapportée, selon les résultats obtenus, en valeur unique ou en écart de toxicité.

Notons finalement que le cheminement choisi pour obtenir la CI50 par différence entre B et Bt constitue un autre avantage du microtest puisqu'il s'avère exclusivement biologique et élimine le besoin d'un support chimique, alors que celui-ci est requis pour le test classique.

1.3 Résultats et discussion

1.3.a Facteurs reliés au test algal microplaque

(i) Facteur "évaporation"

Pour la standardisation de la technique microplaque, il était important d'estimer la perte volumétrique sous les conditions expérimentales précédemment décrites. Pour ce faire, 220uL d'eau

déminéralisée furent introduits dans chacun des puits d'une microplaque, laquelle fut ensuite scellée et placée dans l'incubateur. Après 8 jours, on retira au moyen d'une micropipette, le contenu de 48 des 96 puits de la microplaque. Chacun de ces contenus fut ensuite pesé sur une balance électronique ultra-sensible (Mettler AE 160). Concomitamment, 24 erlens, contenant chacun 40mL d'eau minéralisée, furent soumis aux mêmes conditions expérimentales. Le volume restant fut ensuite estimé en versant chaque contenu dans un cylindre gradué. Les résultats de cette expérience apparaissent au tableau 3. La perte volumétrique moyenne, dans les deux cas, était inférieure à 10% et ne présentait pas de différence significative entre un puits de microplaque ou un erlen. Notons qu'il est essentiel de sceller les microplaques, sans quoi la perte volumétrique après 8 jours est énorme (>50%).

(ii) Facteur "température"

Le scellage des microplaques suscita la crainte d'un "effet de serre" auquel les algues pouvaient être soumises durant la période d'incubation. Pour vérifier ceci, un suivi thermographique (appareil: Rustrak, Modèle 2133, Gulton Industries, U.S.A.) de 8 jours fut effectué dans l'incubateur d'algues. A cette fin, une sonde thermique fut tout d'abord placée dans un erlen de 125mL contenant 40mL d'eau déminéralisée. De plus, après avoir rempli une microplaque avec de l'eau déminéralisée (220uL par puits) et l'avoir ensuite scellée sans couvercle, une deuxième sonde fut introduite dans l'un des puits de la microplaque en trouant le film plastique

TABLEAU 3. PERTE VOLUMÉTRIQUE D'ÉCHANTILLON DUE A L'ÉVAPORATION
LORS DES TESTS CLASSIQUE ET MICROPLAQUE DURANT 8 JOURS

Méthode	Nombre de fioles ou de puits	Perte de volume moyen en %	Ecart-type
Classique*	24	7,2	<u>+</u> 2,8
Microplaque**	48	8,7	<u>+</u> 2,7

* 40mL d'échantillon pour chaque fiole conique de 125mL.

**220uL d'échantillon pour chaque puits de 300uL.

directement au dessus du puits. Le suivi de la température du contenu aqueux respectif de l'erlen et de la microplaque a donné les résultats suivants:

<u>Contenant</u>	<u>Température (°C)</u>	
	<u>Minimale</u>	<u>Maximale</u>
Erlen	24	30
Puits	26	32

Ces valeurs indiquent qu'un effet de serre ne s'est pas manifesté. Par ailleurs, Haaland et Knutson (1973) ont rapporté que les températures minimale et maximale pour la croissance de S. capricornutum se situent à 10 et 35°C respectivement. Les variations de température que nous avons observées se trouvent donc à l'intérieur de la zone de tolérance. De leur côté, Reynolds et al. (1975) ont constaté des cycles cellulaires maximaux de 1,36, 1,99, 1,39 et 1,27 jours à 20, 24, 28 et 33°C respectivement pour S. capricornutum. Il semble donc que la température de croissance optimale pour cette espèce avoisine 24°C.

(iii) Facteur "volume d'échange gazeux"

La proportion volumétrique E/C entre échantillon (E) et contenant (C) est importante afin d'éviter le problème d'une limitation en CO₂ durant la période de croissance des algues. Cette proportion est fixée à 0,20, selon les recommandations apportées par Miller et al. (1978). Nonobstant cette valeur, nous avons évalué

quatre rapports E/C supérieurs à celle-ci (0,27 à 0,73) pour les microplaques à l'aide de croissances-contrôles incubées avec un ajout de milieu AAM complet sous les mêmes conditions expérimentales (tableau 4). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence marquée entre les dénombrements cellulaires obtenus après 8 jours d'incubation pour ces rapports E/C. Ceci s'explique peut-être par le fait que le volume d'air du contenant comprend non seulement celui de chaque puits d'une microplaque mais aussi celui contenu sous le film plastique scellant la microplaque entière, ce qui porterait le rapport E/C facilement en deça de la valeur repère de 0,20 suggérée ci-haut. Les similarités des dénombrements nous ont portés à retenir le rapport E/C de 0,73 (i.e. 220uL d'échantillon dans 300uL d'un puits de microplaque) lors de l'établissement de la technique microplaque, à la fois pour des raisons pratiques (plus grande facilité et précision pour la dispense de microvolumes) et rentables (plus grande disponibilité en biomasse algale pour les mesures paramétriques ultérieures).

Signalons toutefois ici que les dénombrements obtenus sur microplaque étaient significativement inférieurs à celui obtenu d'une croissance-contrôle réalisée en erlen sous des conditions identiques. Une telle différence pourrait provenir d'un effet de paroi car le polystyrène des microplaques aurait des radicaux de plastique non polymérisé capables de chélater des éléments essentiels à la croissance des algues (Laboratoires Flow Inc., données non publiées).

TABLEAU 4. DÉNOMBREMENTS CELLULAIRES (DC) OBTENUS APRÈS 8 JOURS DE CROISSANCE (INOCULUM: 1000 ALGUES.ML⁻¹) EN MILIEU AAM SELON DIFFÉRENTES PROPORTIONS VOLUMÉTRIQUES D'ÉCHANTILLON PRÉSENTES DANS LE CONTENANT EXPÉRIMENTAL

Procédure ¹	Volume:		E/C	N ³	DC (x10 ⁶ .mL ⁻¹)		C.V. ⁴
	échantillon (E)	contenant (C)			Moyenne + écart-type		
MP	220uL	300uL ²	0,73	5	2,26	+ 0,07	3,1
MP	150uL	300uL	0,50	5	2,36	+ 0,07	2,9
MP	120uL	300uL	0,40	5	2,28	+ 0,03	1,5
MP	90uL	300uL	0,27	5	2,37	+ 0,02	1,0
TC	40mL	125mL	0,32	3	4,26	+ 0,32	7,4

1. Microplaque (MP) et test classique (TC) sur fiole conique.
2. Volume total d'un puits de microplaque.
3. Réplicats considérés pour le calcul du dénombrement cellulaire.
4. Coefficient de variation (C.V.)= $\frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$.

(iv) Facteur "EDTA"*

La possibilité pré-énoncée de chélation nous a incités à vérifier l'évolution de la croissance algale avec et sans EDTA par tests classique et microplaque (figure 2). On a appliqué une analyse de variance (test de Bartlett-Box, selon Nie et al., 1975) pour les quatre séries de dénombrements cellulaires (A, B, C et D) obtenus aux jours 4, 5, 6, 7 et 8. Pour chaque période de temps, on a respectivement démontré des valeurs F de 130, 286, 803, 329 et 124, lesquelles sont significativement différentes (avec probabilité de 99%), ce qui démontre un effet spécifique à chacune des séries. Le test de Sheffe (1959) appliqué a posteriori a montré que chaque série donnait des valeurs moyennes significativement différentes d'une autre avec probabilité de 95%.

Les numérations cellulaires se classaient dans l'ordre suivant: $D < C < B < A$ (la seule différence non significative fut obtenue entre A et B après 4 jours). Cet ordre démontre que:

- le test classique donne des dénombrements significativement plus élevés que le test microplaque;
- l'ajout d'EDTA augmente significativement la croissance pour les deux méthodes.

*EDTA: Ethylène Diamine Tétracétate reconnu comme agent chélateur de métaux bivalents.

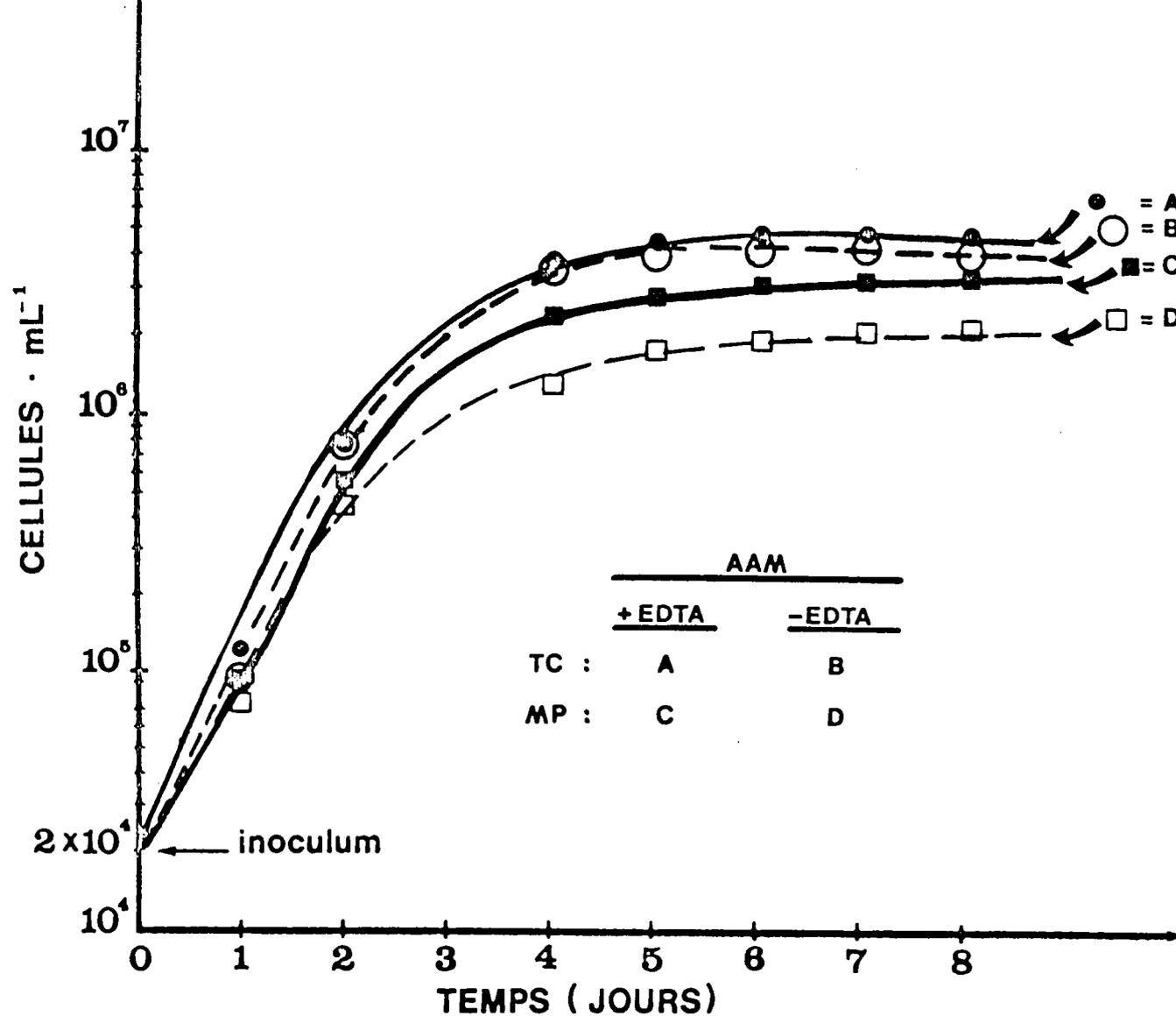


FIGURE 2. EVOLUTION DE LA CROISSANCE ALGALE EN MILIEU AAM AVEC ET SANS EDTA SELON LES TESTS CLASSIQUE (TC) ET

Dans le cas du test classique, la plus forte croissance obtenue en présence du milieu AAM & EDTA peut être due à la capacité de ce ligand synthétique à assurer une meilleure disponibilité de certains micro-éléments pour les algues (Miller et al., 1978). Sur ce point, l'EDTA est surtout utile afin de stabiliser la solubilité du Fe et du Mn, en réduisant leur tendance à précipiter à pH légèrement basique, ce qui favorise leur disponibilité pour supporter la croissance des algues. Dans le cas des microplaques, l'EDTA joue sans doute aussi un tel rôle et son absence expliquerait la production plus modeste constatée pour la biomasse. En plus, il est possible que l'EDTA empêche également une adhésion de certains éléments sur les parois plastiques (polystyrène) des puits de la microplaque; des problèmes d'adhésion de ce genre ont été rapportés par Batley et Gardner (1977). Ainsi, ces différentes propriétés de l'EDTA augmenteraient sensiblement la biomasse-contrôle obtenue lors de la réalisation de tests avec microplaque. Dans le cadre de nos travaux, nous avons donc opté pour l'utilisation du milieu AAM avec l'EDTA. Ce choix était également justifié par le fait que l'on travaillait avec des biomasses d'algues relativement modestes pour le test microplaque et que l'on désirait réduire le risque d'une résolution insuffisante lors des mesures paramétriques.

(v) Facteur "marque de microplaques"

Nous avons suivi l'évolution de la croissance de Sele-nastrum sur trois marques de microplaque différentes, soit Nunc, Cooke et Linbro. Trois microplaques de chaque marque ont servi pour cette expérience. Les nuages de points, représentant chacun la moyenne du dénombrement obtenu pour chaque microplaque selon le jour d'incubation, paraissent à la figure 3. Les réponses de croissance, quelque peu éparpillées lors des dénombrements effectués aux jours 1 et 2, se concentraient davantage à partir du jour 4 au delà duquel elles présentaient un portrait assez homogène sans égard à la marque de microplaque utilisée. L'intérêt pour la réalisation de tests de toxicité de 4 et 8 jours nous a portés à regarder plus attentivement les données comparatives obtenues à ces deux périodes d'incubation (figure 4). A ces deux jours, il n'était pas possible de distinguer une tendance marquée, en terme de rendement de biomasse, pour une marque de microplaque. Ceci semble indiquer que la qualité et l'intensité lumineuse qui parvenait aux algues dans les puits de ces trois types de microplaques n'étaient pas dissimilaires. En outre, les trois marques de microplaques n'apparaissaient pas occasionner une toxicité quelconque liée à leur procédé de fabrication.

(vi) Autres facteurs

Il faut également envisager que le pH ait pu exercer une limitation en CO₂ dans le cas des biotests sur microplaque. En effet, ceux-ci étant incubés sans agitation, leur pH avait tendance à

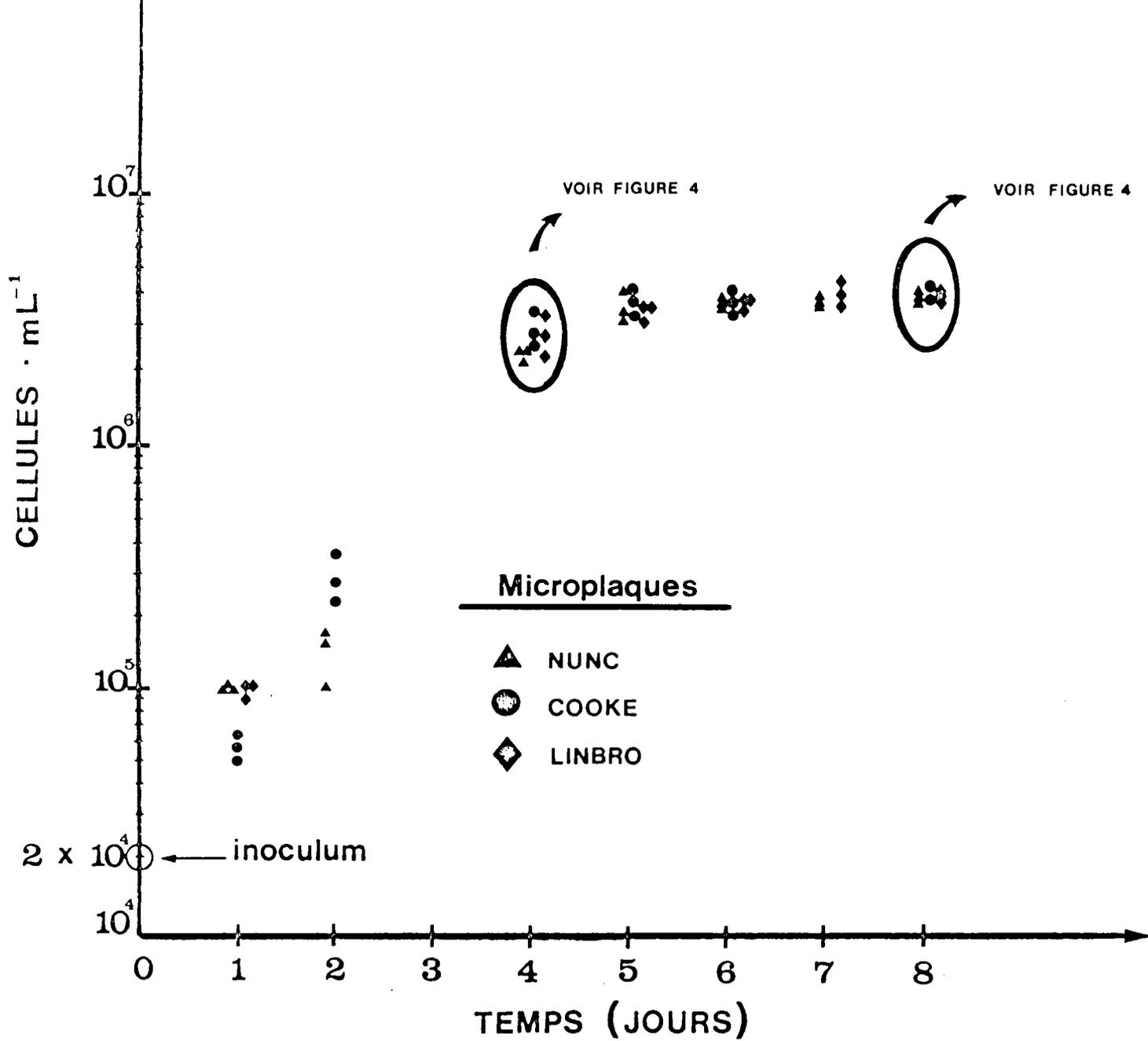


FIGURE 3. EVOLUTION DE LA CROISSANCE ALGALE EN

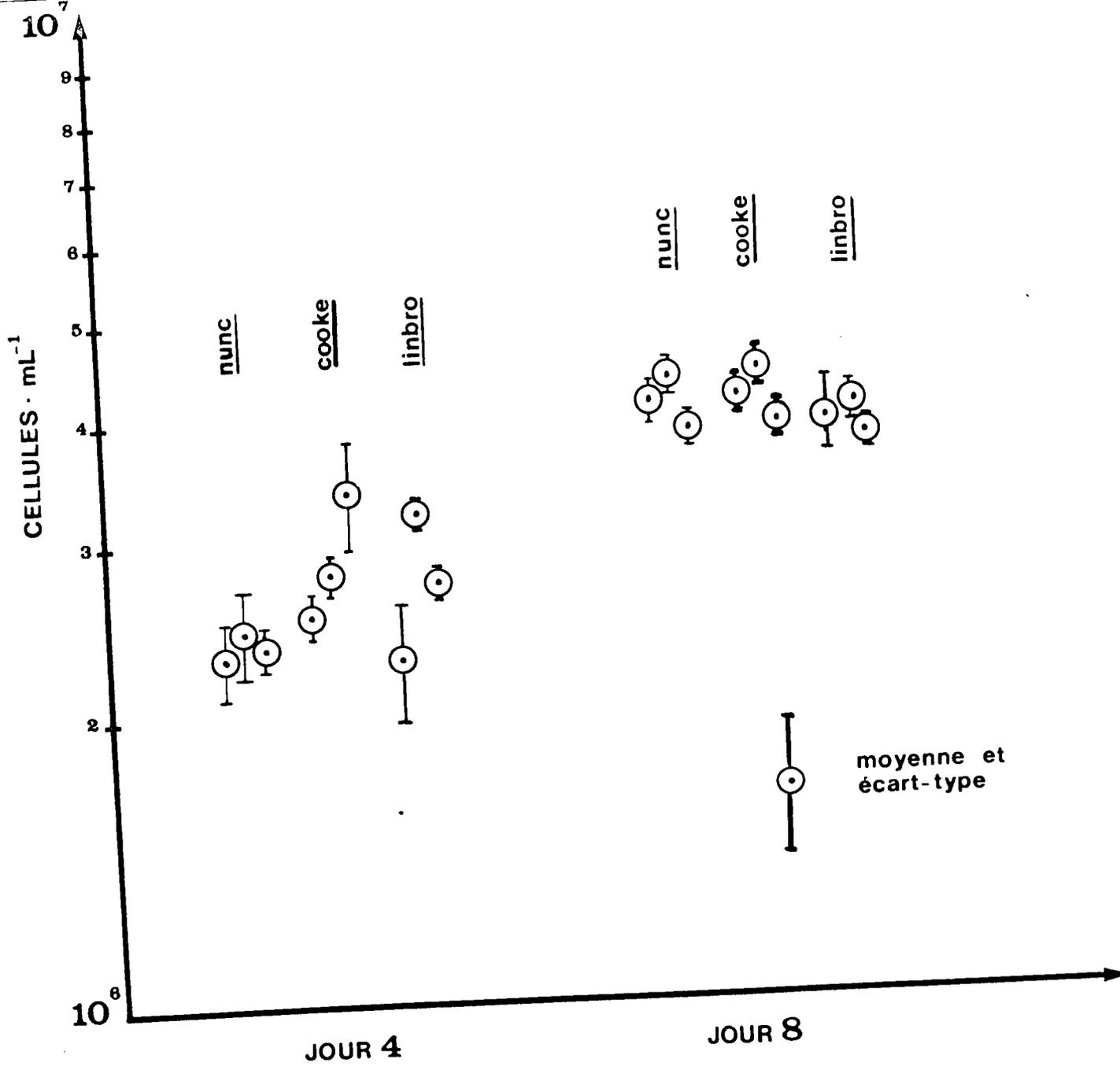


FIGURE 4. DENOMBREMENTS CELLULAIRES APRES 4 ET 8 JOURS SUR DIFFERENTES MARQUES

s'élever progressivement jusqu'à 10 tandis que celui du test classique avec agitation bi-quotidienne ne dépassait généralement pas 8 à 9 en fin d'incubation; or, pour assurer une pleine disponibilité en CO₂, le pH doit rester en deça de 8,5 selon Miller et al. (1978).

L'incubation statique des microplaques occasionnait aussi une sédimentation des algues au fond des puits, ce qui pouvait rendre les cellules des couches inférieures moins accessibles pour l'assimilation des éléments nécessaires à la croissance. Il n'est pas assuré, non plus, que les algues croissant dans les puits d'une microplaque reçoivent la même quantité et qualité de rayons lumineux que celles croissant en erlen à cause des propriétés particulières du toit plastique de la microplaque. Ces différents facteurs peuvent également quelque peu contribuer à des différences au niveau des résultats de toxicité obtenus avec les deux méthodes. Certes, les réponses à ces questions n'ont pu être abordées dans le présent travail car l'objectif principal de celui-ci était d'évaluer les chances de réussite d'un test algal microplaque. Il n'empêche qu'il faudra approfondir les connaissances relatives à ces questions.

1.3.b Paramètre ATP pour le test algal microplaque

La commodité, la rapidité et la simplicité de la méthode au DMSO comme agent d'extraction de l'ATP amènent à choisir cette méthode de préférence aux autres (Jakubczak et Leclerc, 1980). Des premiers essais au DMSO nous ont montré que ce composé extrait bien

l'ATP de S. capricornutum (tableau 5). La proportion du mélange d'extraction proposée par Jakubczak et Leclerc (1980) s'appliquant aux bactéries, nous avons cherché à la modifier afin d'obtenir une sensibilité luminométrique accrue du photomètre pour l'ATP algal. Ceci était désirable parce que les volumes de 100uL prélevés dans les puits des microplaques à la fin des 4ième ou 8ième jours d'incubation contenaient une biomasse qui ne pouvait être concentrée davantage (par exemple, la numération cellulaire des puits-contrôles après 4 et 8 jours d'incubation se situait respectivement à 2,8 et 4,5 x 10⁵ algues. 100uL-1). Dans la méthode d'extraction/dosage que nous recherchions, il nous fallait tenter de diminuer la proportionalité du DMSO dans le mélange du dosage afin de réduire son "quenching" qui atténue l'émission de lumière. Le tableau 5 présente les 6 proportions du mélange d'extraction qui ont été essayées pour tenter d'augmenter la sensibilité des mesures. Nous avons retenu, pour les expériences subséquentes, la proportion de l'essai No 5 qui réduit le facteur de division de l'essai No 1 (considéré comme référence à partir des données de Jakubczak et Leclerc, 1980) de 60 à 50 tout en augmentant, parallèlement, le rendement en URL.

Le tableau 6 élucide le pourquoi de ce choix. Trois principales raisons sont en cause:

1. Il y a moins de DMSO dans le mélange du dosage, ce qui réduit le quenching;

Il y a plus d'échantillon dans le mélange du dosage et, donc, plus d'ATP;

Le réactif enzymatique est moins dilué; ceci amplifie l'émission photonique puisqu'elle est fonction de la concentration du réactif (Luminescence Review, Bulletin 202, 1981).

TABLEAU 5. ESSAIS D'EXTRACTION DE L'ATP D'UNE CULTURE DE *Selenastrum capricornutum*¹ APRÈS 8 JOURS D'INCUBATION DANS LE MILIEU AAM

	MELANGE D'EXTRACTION (ECHANTILLON/DMSO/MOPS)	MELANGE DU DOSAGE ³	F.D. ⁴	URL ⁵	C.V. ⁶
1	(0,1mL/0,9mL/5mL) ²	100uL + 100uL T-A	60	176 060	4,9
2	(0,1mL/0,5mL/5mL)	100uL + 100uL T-A	56	199 808	1,2
3	(0,1mL/0,4mL/5mL)	100uL + 100uL T-A	55	185 827	3,1
4	(0,1mL/0,4mL/3mL)	100uL + 100uL T-A	35	173 635	0,6
5	(0,1mL/0,4mL/ —)	10uL + 100uL T-A	50	<u>224 233</u>	1,0
6	(0,1mL/0,5mL/ —)	10uL + 100uL T-A	60	217 180	5,9

1. Les algues (4×10^6 cellules.mL⁻¹, étaient transférées dans une solution de Na HCO₃ (15mg.L⁻¹) ajustée à pH 7,5 après leur incubation dans le milieu AAM.
2. Proportions dans le mélange d'extraction (lors de l'essai No 1, on a utilisé celle recommandée par Jakubczak et Leclerc, 1980).
3. 100uL ou 10uL du mélange d'extraction + 100uL de T-A (tampon Lumit à pH 7,75 avec 10mM de KCl).
4. Facteur de division (F.D.) entre le mélange d'extraction et sa portion prise pour le dosage.
5. Unités relatives de lumière (URL) mesurées par le photomètre.
6. Coefficient de variation (C.V.) des URL exprimé en pourcentage pour les dosages effectués en triplicata.

$$C.V. = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$$

TABLEAU 6. COMPARAISON DES VOLUMES DU DMSO ET DE L'ÉCHANTILLON DANS LE MÉLANGE DU DOSAGE (MD) POUR LA MESURE DE L'ATP AVEC DEUX PRÉPARATIONS DIFFÉRENTES

ESSAI	MÉLANGE D'EXTRACTION (ME) (ÉCHANTILLON/DMSO/MOPS)	VOLUME PRIS DU ME POUR LE MD	VOLUME TOTAL DU MD	VOLUME DU DMSO DANS MD	VOLUME DE L'ÉCHAN- TILLON DANS MD
J + L1	(100uL/900uL/5 000uL)	100uL	300uL ³	15uL	1,67uL
Modifiée ²	(100uL/400uL/ —)	10uL	210uL ⁴	8uL	2,0uL

1. Essai rapporté par Jakubczak et Leclerc (1980).
2. Essai modifié pour le travail avec S. capricornutum (voir essai No 5 du tableau 5).
3. Contient 100uL du ME, 100uL de T-A (tampon Lumit à pH 7,75 avec 10mM KCl) et 100uL de réactif enzymatique Lumit PM.
4. Contient 10uL du ME, 100uL de T-A et 100uL de réactif enzymatique Lumit PM.

Une expérience subséquente fut entreprise afin de déterminer le contenu cellulaire en ATP d'une culture d'algues en comparant la méthode d'extraction au DMSO décrite dans la littérature (Jakubczak et Leclerc, 1980) et notre version modifiée de cette méthode. A l'examen du tableau 7, on voit qu'il n'y a pas de différence significative entre les rendements d'extraction des deux méthodes; celles-ci permettent en effet d'obtenir un contenu cellulaire comparable en ATP lorsque la densité cellulaire est de 4×10^6 cellules.mL⁻¹. Cette dernière est représentative de celle que l'on retrouvait dans les puits-contrôles de microplaques après 8 jours d'incubation, et donc, de la biomasse maximale à partir de laquelle l'extraction de l'ATP était effectuée.

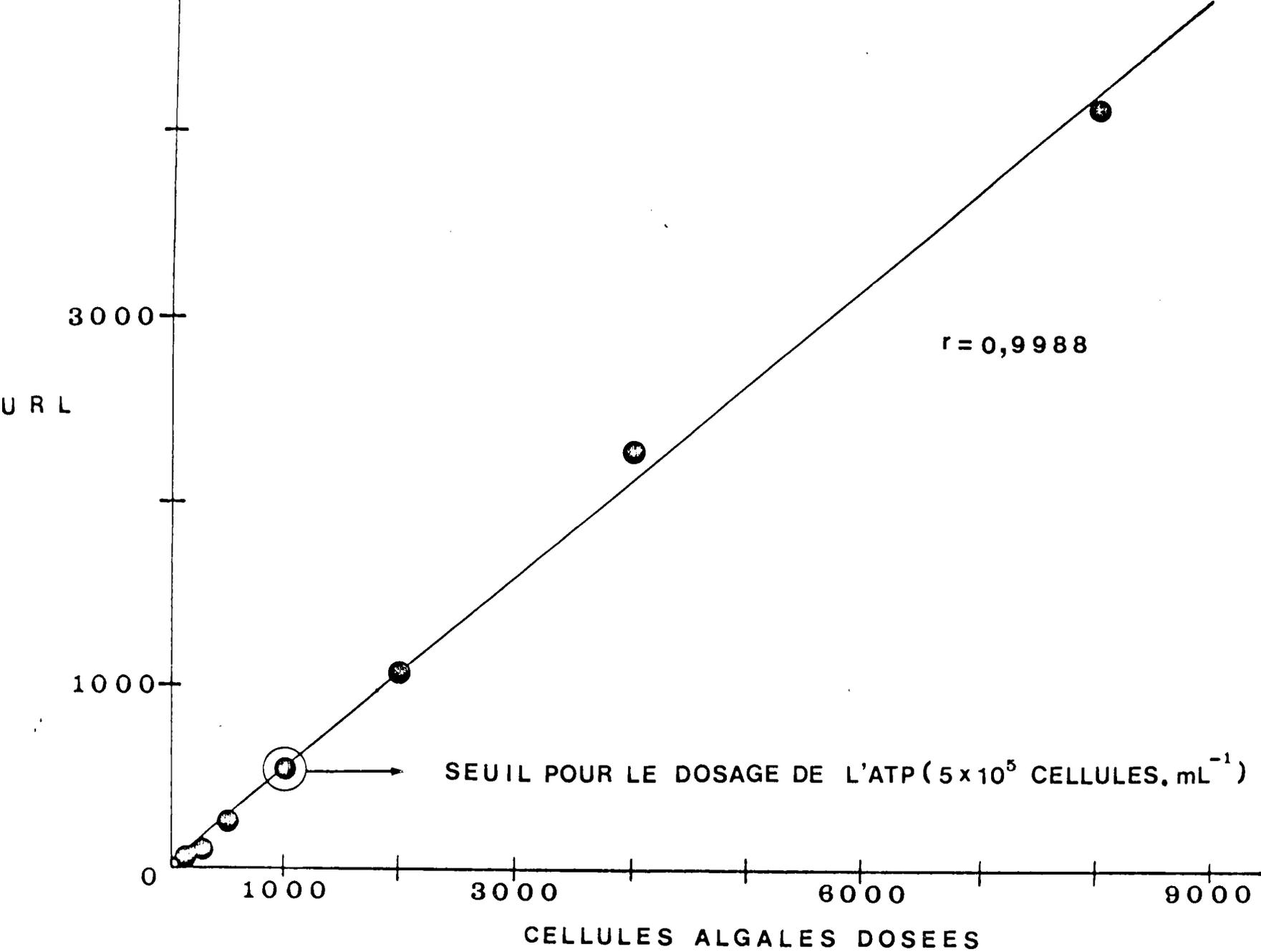
Il fallut ensuite vérifier la linéarité du rendement de l'extraction de l'ATP pour différentes concentrations cellulaires. Les figures 5 et 6 illustrent cette relation et indiquent qu'un "quenching" n'intervient pas dans le cas du plus grand nombre d'algues mesurées. Lors du dosage, nous nous sommes rendus compte qu'une sous-estimation importante de l'ATP cellulaire survenait lorsque moins de 1 000 cellules étaient présentes dans le mélange du dosage (figure 7). Cette quantité d'algues est représentative du seuil de standardisation interne (figures 5, 6 et 7), et correspond à 1 000 cellules mesurées dans le mélange du dosage, à 5×10^4 cellules.100 μ L⁻¹ présentes dans le mélange d'extraction ou à 5×10^5 cellules.mL⁻¹ présentes dans un puits de microplaque.

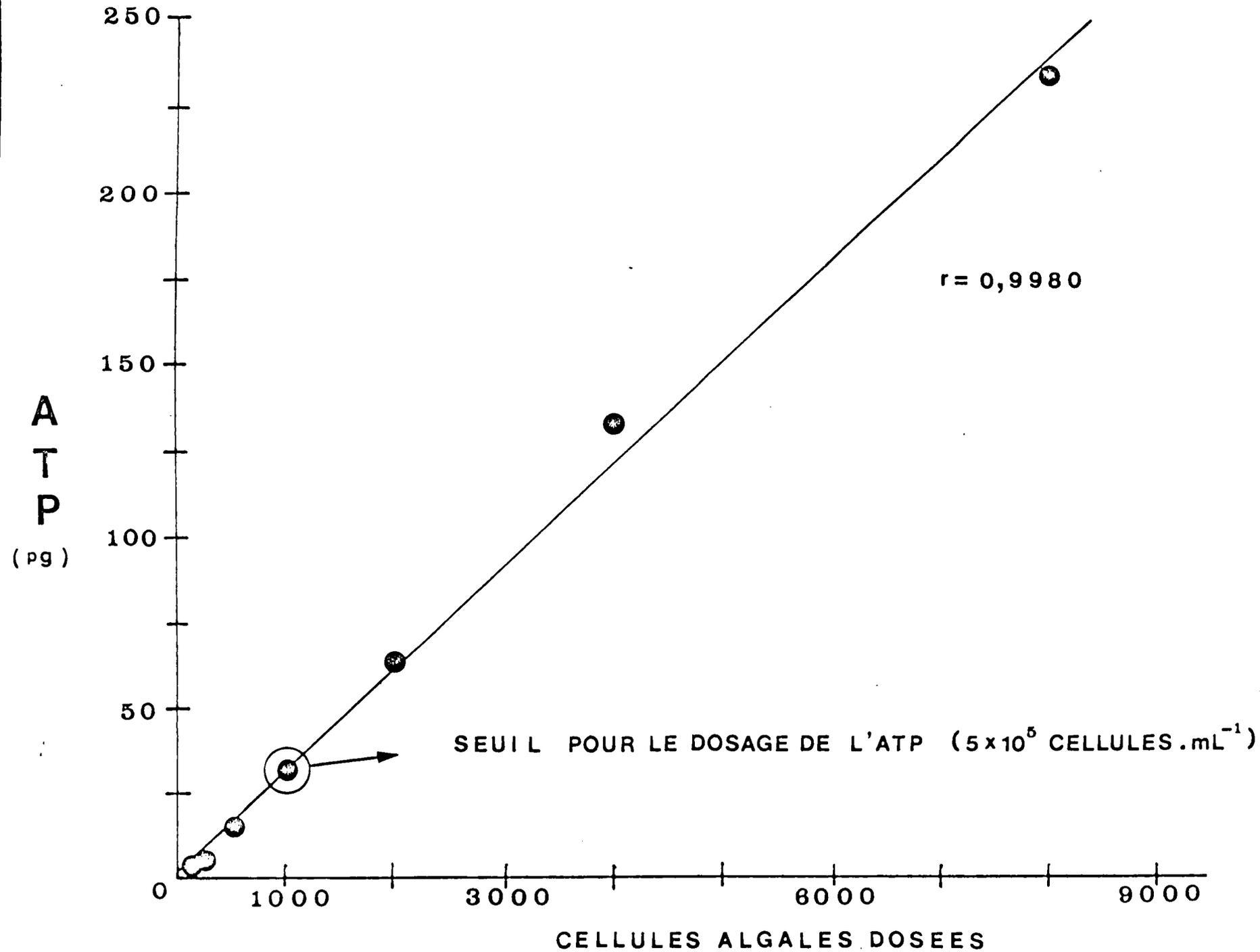
Enfin, il restait à évaluer s'il survenait un changement de pH dans le mélange du dosage lors de l'ajout du mélange d'extrac-

TABLEAU 7. DOSAGE DE L'ATP CHEZ L'ALGUE Selenastrum capricornutum¹
PAR DEUX MÉTHODES D'EXTRACTION DIFFÉRENTES

ESSAI	MELANGE D'EXTRACTION (ECHANTILLON/DMSO/MOPS)	MELANGE DU DOSAGE	ATP (fg) PAR CELLULE ⁴	C.V. ⁵
J + L ²	(0,1mL/0,9mL/5mL)	100uL + 100uL R-A	28,2 ± 1,8	6,4
MODIFIÉE ³	(0,1mL/0,4mL/ —)	10uL + 100uL R-A	30,1 ± 2,2	7,2

1. Culture de six jours à 4×10^6 cellules.mL⁻¹.
2. Méthode rapportée par Jakubczak et Leclerc (1980).
3. Méthode modifiée pour le travail avec S. capricornutum.
4. Valeur moyenne des triplicata et écart-type.
5. Coefficient de variation (C.V.) exprimé en pourcentage.
C.V. = $\frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$





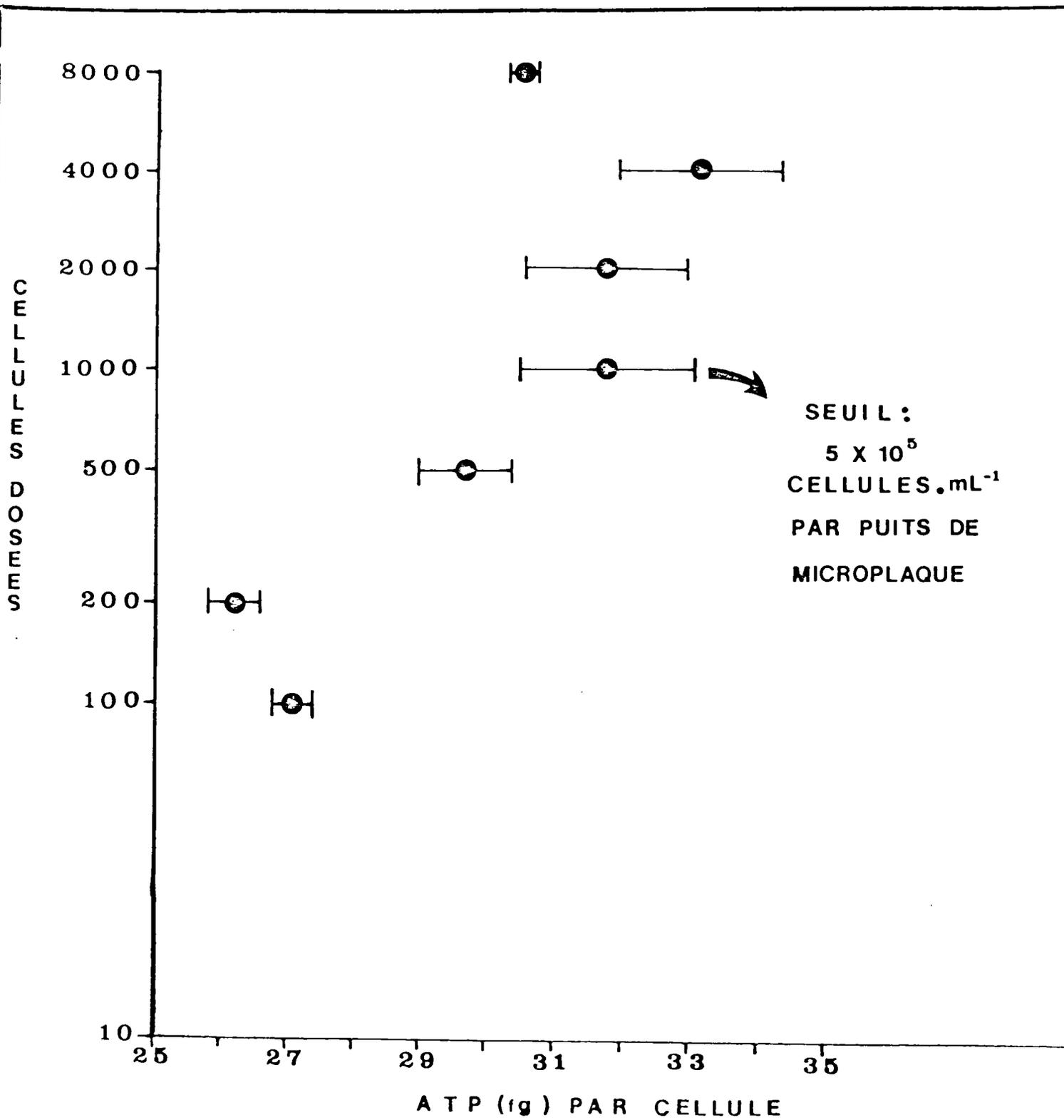


Figure 7. SEUIL DE SENSIBILITE POUR LE DOSAGE DE L'ATP CELLULAIRE ALGAL.

tion. A cette fin, nous avons préparé cinq mélanges d'extraction contenant chacun le volume requis de milieu nutritif AAM à cinq pH différents (tableau 8). On constata que des variations de pH du milieu nutritif AAM n'avaient aucun effet sur le pH final du mélange du dosage lorsque ce milieu était ajouté dans les proportions voulues à la solution de DMSO. Ceci est important car le pH dans les puits des microplaques pouvait atteindre 10 à la fin de la période d'incubation (4 ou 8 jours). Il y a également lieu de souligner que le pH final du mélange du dosage était très voisin du pH 7,75 de rendement optimal pour la réaction enzymatique avec les réactifs Lumac.

Nous avons d'ailleurs confirmé cette non-interférence du pH sur l'émission photonique en préparant des solutions de milieu AAM à différents pH, lesquelles contenaient une teneur connue d'ATP, et en soumettant celles-ci aux mesures photométriques (tableau 9). Il n'y avait pas de différence marquée, quant à l'émission d'URL, due au pH original de l'échantillon (pH entre 6 et 10).

1.3.c Précision et "reproductibilité" du test algal microplaque

Ces exigences ont été vérifiées lors de croissances-contrôles. Tout d'abord, on observa qu'après 8 jours de croissance sur microplaque, les contrôles s'avéraient assez homogènes, comme l'indiquaient leurs coefficients de variation (tableau 10). En effet, ceux-ci variaient de 4,5% à 13,9% alors que USEPA (1971) a établi la limite de précision du test AAM utilisant S. capricornutum à un coefficient de variation de 15%. Ces résultats témoignent aussi de l'adéquation de l'instrumentation utilisée et de la technique employée pour la réalisation du microtest.

TABLEAU 8. EFFET DU pH DU MÉLANGE D'EXTRACTION SUR LE pH FINAL DU MÉLANGE DU DOSAGE POUR LA MESURE DE L'ATP

MÉLANGE D'EXTRACTION ¹		pH FINAL DU MÉLANGE DU DOSAGE ²
pH DU MILIEU AAM	pH DE LA SOLUTION DE DMSO	
6,0	5,25	7,61
7,0	5,25	7,65
8,0	5,25	7,64
9,0	5,25	7,59
10,0	5,25	7,63

1. La proportion du milieu AAM au DMSO est de 1:4.
2. La proportion du mélange d'extraction au mélange final du dosage est de 1:21.

TABLEAU 9. EFFET DU pH DU MÉLANGE D'EXTRACTION
SUR L'ÉMISSION LUMINEUSE DE L'ATP

pH de l'échantillon ¹	URL ²	C.V. ³
6	1897 + 109	5,8
7	1861 ± 174	9,3
8	1773 ± 114	6,4
9	1819 ± 153	8,4
10	1792 ± 97	5,4

1. On mélange 10uL d'une solution étalon d'ATP (1 ug.mL⁻¹) à 990uL d'une solution AAM ajustée à chacun des pH considérés.
2. Valeur moyenne et écart-type des mesures d'unités relatives de lumière (URL) effectuées en triplicata selon la méthode modifiée d'extraction au DMSO (voir tableau 7).
3. Coefficient de variation (C.V.) exprimé en pourcentage.
$$C.V. = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$$

TABLEAU 10. PRÉCISION DU BIOTEST ALGAL SUR MICROPLAQUE:
COEFFICIENTS DE VARIATION (C.V.) POUR 18
MICROPLAQUES-CONTROLES

C.V.* (en %)					
4,5	5,4	6,0	6,2	6,5	6,9
7,0	7,2	7,2	7,3	7,6	8,1
8,4	9,3	9,8	11,3	11,6	13,9

* C.V. calculés à partir de dénombrements cellulaires au Coulter obtenus après 8 jours d'incubation dans des puits de microplaques (N=8 pour chaque valeur rapportée)

$$\text{C.V.} = \frac{(\text{Ecart-type}) \times 100}{\text{Moyenne}}$$

Une seconde preuve de précision du test algal est mis en évidence au tableau 11. On y rapporte les coefficients de variation des croissances-contrôles obtenus pour la totalité des divers échantillons testés. Quelque soient les considérations paramétriques (dénombrement et ATP) et la durée des tests CI50 (4 heures, 4 jours et 8 jours), ces coefficients de variation sont assez voisins.

La reproductibilité du microtest à été confirmée avec le Cu++ pour des CI50-4 jours:

<u>Paramètre</u>	<u>CI50 de Cu++ à l'essai #1</u>	<u>CI50 de Cu++ à l'essai #2</u>	<u>CI50 de Cu++ à l'essai #3</u>
dénombrement	48,4ug.L ⁻¹	44,3ug.L ⁻¹	46,4ug.L ⁻¹
ATP (URL)	54,0ug.L ⁻¹	54,0ug.L ⁻¹	53,0ug.L ⁻¹

1.3.d Comparaison entre les tests microplaque et classique pour les algues

Etant donné l'utilisation fréquente du test classique avec estimation de la toxicité CI50 par dénombrement cellulaire, il était logique de comparer, en premier lieu, les résultats de ce test avec ceux obtenus par l'entremise du test microplaque pour le même paramètre. Dans cette section, on présente les résultats de toxicité obtenus en vue de cette comparaison avec 30 échantillons (figure 8): 9 CI50-8 jours ont été déterminés pour des effluents industriels (figure 8:A), 15 CI50-4 jours pour d'autres effluents industriels (figure 8:B) et 6 CI50-4 jours pour des métaux (figure 8:C).

TABLEAU 11. PRÉCISION DU BIOTEST ALGAL SUR MICROPLAQUE: COEFFICIENTS DE VARIATION (C.V.) DES CROISSANCES-CONTROLES POUR LES DIVERS ÉCHANTILLONS COMPARÉS

Paramètre	CI50	C.V.* (en%)														
Dénombrement cellulaire	4 jours	1,2	2,4	2,9	3,4	3,5	4,2	4,3	4,4	4,8	5,2	6,2	6,6	7,0	7,3	
"	8 jours	7,3	8,2	8,2	8,9	9,4	10,7	12,7	16,4	18,7						
ATP	4 jours	1,1	2,1	2,9	2,9	2,9	3,0	3,8	7,1	7,4	12,6					
"	8 jours	2,1	3,0	3,1	4,0	4,2	4,9	6,4	6,8	7,1	7,3	7,4	7,5	8,3	9,2	9,6
"	4 heures	9,9	10,3	12,8	16,7											
"	8 jours	1,0	3,1	3,1	4,7	5,0	5,3	5,8	6,2	15,4						
"	4 heures	1,9	2,3	3,1	4,7	4,7	5,7	7,1	7,7	9,2	9,2					

* (N=3 pour chaque valeur rapportée)

$$C.V. = \frac{\text{Ecart-type} \times 100}{\text{Moyenne}}$$

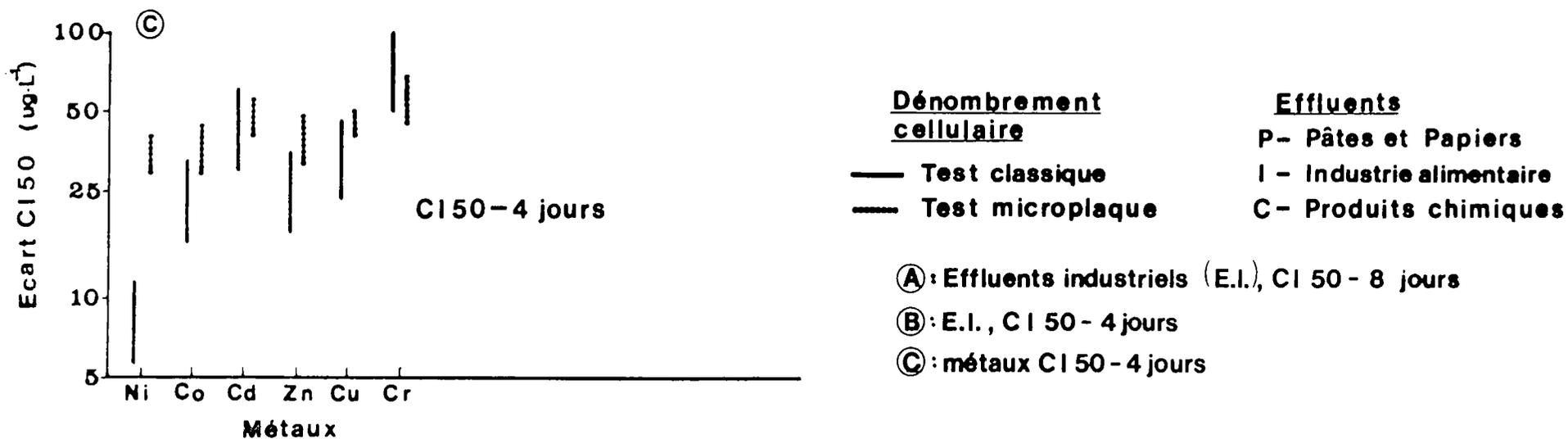
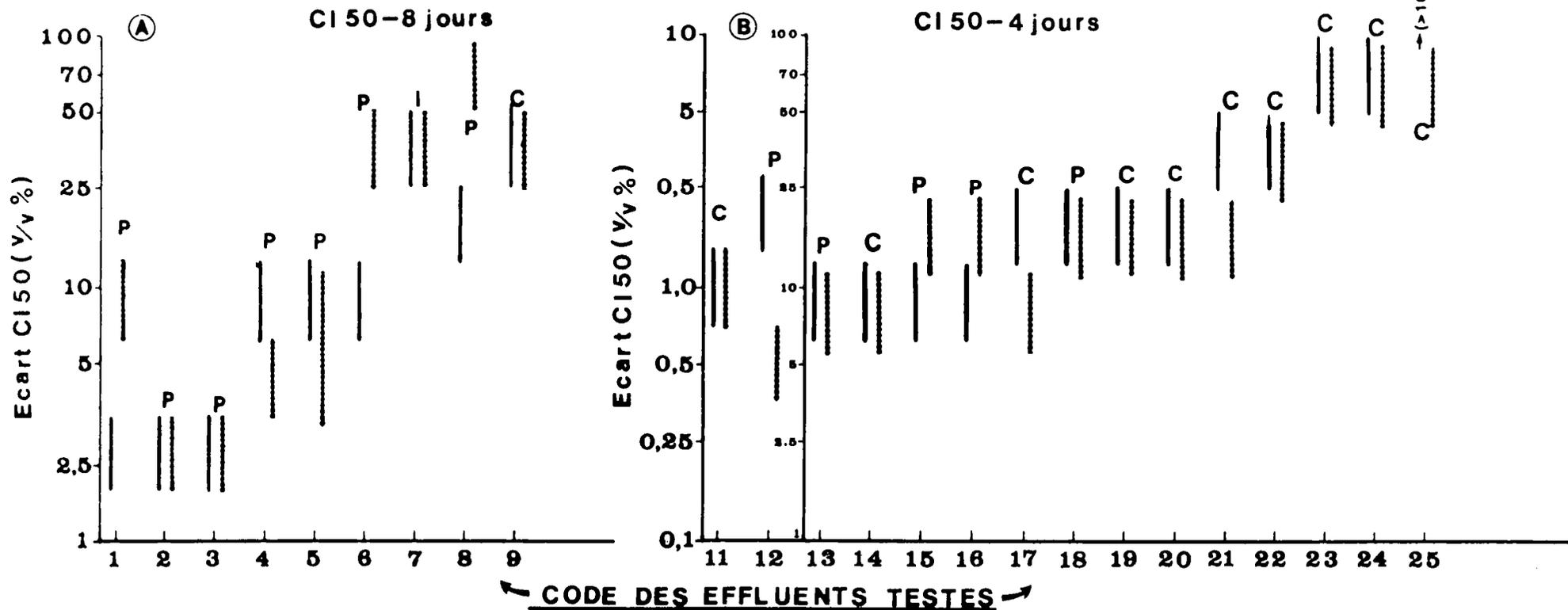


Figure 8. COMPARAISON DE TOXICITE PAR DENOMBREMENT CELLULAIRE ENTRE LES TESTS CLASSIQUE

Ces différentes CI50 sont rapportées sous forme d'écart où les valeurs inférieures et supérieures représentent les concentrations expérimentales les plus voisines de celle ayant pu entraîner une inhibition de 50% (exemple, figure 8:A, effluent No. 1, test classique: CI50=1,56-3,13 v/v%; test microplaque: CI50=6,30-12,5 v/v%). A la lumière des résultats présentés à la figure 8, on constate qu'il existe une concordance relativement bonne entre les deux méthodes comparées. Tout d'abord, à la section A, on se rend compte que les réponses toxiques obtenues par les deux méthodes tombent généralement dans le même écart ou dans un écart de toxicité immédiatement adjacent, bien que deux résultats fassent exception à cette règle (effluents 1 et 6). Dans la section B, le portrait comparatif de toxicité entre les deux méthodes est très semblable à celui constaté à la section A. Quant à la section C qui concerne les métaux, la concordance entre les méthodes s'avère également similaire à celle observée pour les effluents; seuls les écarts de CI50 précisés pour le Ni ne se chevauchent pas.

1.3.e Comparaison entre paramètres pour le test algal microplaque

Nous présentons maintenant, d'une façon similaire à la précédente section, une comparaison de résultats de toxicité obtenus lors de tests effectués sur microplaques en fonction de trois mesures paramétriques, soit le dénombrement cellulaire, l'ATP et l'observation visuelle. Cette comparaison a été effectuée entre les 3 paramètres à partir de 9 effluents industriels testés pendant 8 jours,

11 autres effluents testés pendant 4 jours et 6 métaux testés pendant 4 jours. La figure 9 expose les fourchettes de CI50 obtenues (par exemple, section 9:A, effluent No. 1; 1: dénombrement cellulaire: CI50=6,25-12,5 v/v%; 2: ATP: CI50=12,5-25 v/v%; 3: observation visuelle: CI50=6,25-12,5 v/v%). En supplément aux paramètres du dénombrement cellulaire et de l'ATP, l'observation visuelle directe de la turbidité des microplaques a été ajoutée à cause de sa grande simplicité comme moyen d'examen préliminaire pour situer la toxicité de divers types de prélèvements. En considérant les résultats présentés à la figure 9, on constate une assez bonne concordance entre les trois paramètres comparés. De fait, tout d'abord à la section A, on se rend compte, tout comme on l'avait observé dans le cas des comparaisons entre les méthodes (figure 8:A), que les réponses toxiques des trois paramètres considérés tombent généralement dans le même écart de toxicité ou dans un écart de toxicité immédiatement adjacent. On note toutefois, en six occasions (effluents 1, 3, 6, 8, 9 et 10), que les écarts de toxicité précisés avec le dosage de l'ATP sont un peu plus élevés que ceux déterminés avec le dénombrement cellulaire. Une constatation analogue a été faite par Truhaut et al. (1980), lesquels ont comparé la toxicité du cadmium pour différents paramètres chez l'algue Chlorella vulgaris. Ils ont en effet obtenu une CI50 plus haute avec l'ATP qu'avec le dénombrement cellulaire (respectivement 1,50 et 0,6mg.L⁻¹). Ils ont également montré que le volume cellulaire moyen des algues augmentait en fonction de la concentration du cadmium et que la teneur en ATP d'une algue était proportionnelle à son volume. Compte tenu de ces observations, il est possible que de plus grandes cellules présentes

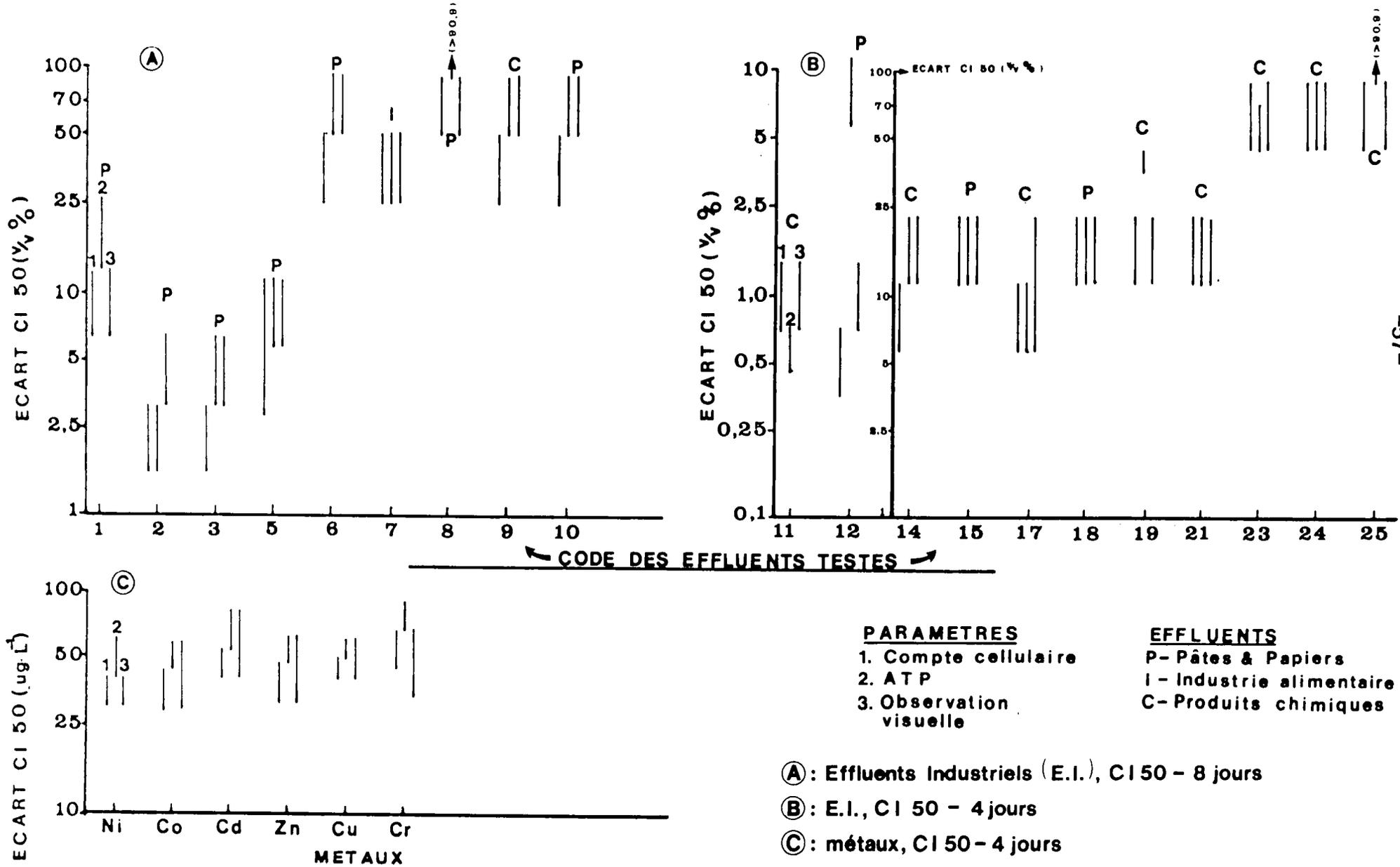


Figure 9. COMPARAISON DE TOXICITE AVEC TEST MICROPLAQUE ENTRE TROIS PARAMETRES.

dans des concentrations inhibitrices de produits testés, tout en étant moins nombreuses, puissent masquer l'effet toxique au niveau de l'ATP de cette façon. Quant au paramètre de l'observation visuelle directe des microplaques, celui-ci semble s'accorder aussi bien avec le dénombrement cellulaire qu'avec le dosage de l'ATP en ce qui concerne les écarts rapportés de CI50. Dans la section 9B, le portrait de toxicité interparamétrique apparaît semblable à celui constaté à la section 9A. La concordance interparamétrique des résultats de toxicité exposés à la section 9C pour 6 métaux est similaire à celle observée pour les effluents. Dans ce cas, on remarque également des valeurs plus élevées lorsque les écarts de CI50 sont déterminés à partir des dosages d'ATP plutôt qu'à partir des dénombrements cellulaires. En général, les CI50-4 jours rapportés pour les 6 métaux sont voisines de celles publiées par Chiaudani et Vighi (1978), lesquels ont réalisé des biotests classiques de croissance de 4 jours avec S. capricornutum.

1.3.f Comparaison entre durées pour le test algal microplaque

Complémentairement à la comparaison interparamétrique de toxicité sur microplaque, nous avons considéré le facteur durée et nous avons décidé de raccourcir celui-ci de quelques jours à quelques heures afin de vérifier s'il était possible de déceler très rapidement la toxicité sur microplaque avec un des paramètres expérimentés. Pour cela, notre choix s'est porté sur l'ATP après 4 heures du test car Vasseur et al. (1981) ont montré la valeur prédictive du dosage

de l'ATP chez l'algue Chlorella vulgaris en comparant les réponses toxiques obtenues après 2 et 6 heures d'exposition à différents produits de nature inorganique et organique.

Nos premiers essais de 4 heures sur microplaque ont été réalisés avec 4 des 11 effluents industriels qui ont servi à l'étude de comparaison interparamétrique de 4 jours (voir figure 9:B et tableau 12). L'effluent 11 fut choisi à cause de sa forte toxicité tandis que les trois autres (effluents 14, 17 et 21), l'ont été de façon aléatoire. Signalons qu'ici l'inoculum d'algues initial était de 1×10^6 cellules.mL⁻¹, comparativement à 1 000 cellules.mL⁻¹ pour les bioessais de 4 jours. Hormis cette exception, les autres conditions expérimentales furent inchangées. Les CI50 ont été déterminées en fonction des émissions d'URL des algues exposées; la CI50 de l'effluent 11 a également été précisée en fonction de la teneur d'ATP par standardisation interne. Comme l'indiquent les résultats du tableau 12, l'effluent 11, qui se révélait le plus toxique après 96 heures, parmi les 4 effluents testés, exerçait déjà une toxicité évidente sur les algues après seulement 4 heures. Mentionnons aussi que ses valeurs CI50 déterminées à partir des URL ou à partir de la teneur en ATP étaient quasi semblables (respectivement 5,4 et 6,2 v/v%). Quant aux trois autres effluents moins toxiques après 96 heures, il n'ont montré aucune toxicité mesurable après 4 heures d'exposition.

TABLEAU 12. COMPARAISON DE TESTS MICROPLAQUES DE 4 ET 96 HEURES RÉALISÉS AVEC Selenastrum capricornutum POUR QUATRE EFFLUENTS INDUSTRIELS

<u>Effluent*</u>		<u>CI50 - 96 heures¹</u>		<u>CI50 - 4 heures¹</u>	
Numéro	Type	Compte cellulaire	ATP (URL)	ATP (URL) ²	ATP (fg.cellule ⁻¹) ³
11	C	0,70	0,67	5,4	6,2
14	C	11,0	17,1	ND ⁴	-
17	C	10,9	9,2	ND	-
21	C	21,0	20,0	ND	-

1. Les CI50 sont exprimées en v/v% d'effluent.

2. CI50 calculée en fonction des unités relatives de lumières (URL) mesurées par le photomètre.

3. CI50 calculée selon la technique de standardisation interne.

4. CI50 non-détectable (>100v/v%).

* Voir figure 9B.

Nos seconds essais de 4 heures sur microplaques ont été faits avec deux métaux en solution (tableau 13). La précocité du critère ATP pour mesurer une réponse toxique à très court terme se confirmait une fois de plus puisqu'on obtenait des CI50 relativement basses après ce bref temps d'exposition. Ces essais ont eu lieu dans un milieu AAM avec EDTA et dans un milieu sans EDTA.. Dans le cas du Zn^{+2} , la CI50 n'apparaissait pas différente en présence d'EDTA (CI50=165ug.L⁻¹) ou en absence de celui-ci (CI50=175ug.L⁻¹). En revanche, l'EDTA avait eu une influence (probablement une complexation) dans le cas du Cd^{+2} , vu que l'on obtenait une CI50 située entre 210-420ug.L⁻¹ lorsque l'EDTA était absent durant l'exposition et une CI50 de 650ug.L⁻¹ lorsque l'EDTA était présent.

Ces divers résultats, bien que préliminaires, laissent entrevoir la possibilité d'exploiter la mesure de l'ATP dans des microtests algaux de courte durée; ceci permettrait de dépister rapidement les rejets susceptibles de produire des effets nocifs marqués envers les populations de production végétale primaire des cours d'eau récepteurs.

1.3.g Etude statistique

Avant de tirer des conclusions, nous avons voulu confirmer statistiquement les principales indications fournies par nos résultats. L'approche adoptée à cette fin consista, d'une part, à effectuer une comparaison des valeurs moyennes par un test t de

TABLEAU 13. COMPARAISON DE TESTS MICROPLAQUES DE 4 ET 96 HEURES RÉALISÉS AVEC Selenastrum capricornutum POUR DEUX MÉTAUX

Métal	<u>CI50 - 96 heures</u> ¹		<u>CI50 - 4 heures</u> ¹	
	Dénombrement cellulaire	ATP (URL) ²	ATP (URL) ²	ATP (fg.cellule-1) ³
Zn ⁺²	44,7	55,0	175(165) ⁴	205
Cd ⁺²	50,0	54-81	210-420(650) ⁴	-

1. Les CI50 sont exprimées en $\mu\text{g.L}^{-1}$.
2. CI50 calculée en fonction des unités relatives de lumière (URL) mesurées par le photomètre.
3. CI50 calculée selon la technique de standardisation interne.
4. Les résultats entre parenthèses indiquent les CI50-4 heures obtenues pour deux biotests réalisés en milieu AAM avec EDTA: les autres CI50-4 heures ont été obtenues en milieu AAM sans EDTA.

Student et, d'autre part, en faisant appel à la régression linéaire, à étudier les corrélations entre les méthodes ou les paramètres utilisés. Ces analyses statistiques ont été faites à partir des CI50 obtenues par interpolation sur papier graphique ou, lorsque cette interpolation n'était pas possible (voir fin 1.2.c), à partir des médianes des fourchettes des CI50. Elles ont été agencées en deux paliers, soit:

- l'analyse "inter-méthode" entre les CI50 de dénombrements cellulaires obtenus avec le test classique et le test microplaque;
- l'analyse "inter-paramètre" entre les CI50 résultant du test microplaque précisées par dénombrement cellulaire avec celles précisées par mesure de l'ATP (tableau 14).

Pour ces fins comparatives, les valeurs CI50 ont d'abord été transformées en unités toxiques ($UT = 100/CI50$). Ensuite, afin de mieux respecter la normalité des distributions, les valeurs de toxicité (UT) ont été transformées en unités logarithmiques (tableau 15).

La comparaison des valeurs moyennes a été effectuée en considérant séparément les données obtenues pour 4 jours de biotest, pour 8 jours de biotest et pour l'ensemble (tableau 16). Les valeurs de t n'ont mis en évidence une différence significative que pour deux

TABLEAU 14. CI50 EMPLOYÉES POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DES BIOTESTS ALGAUX

chantillon	Test classique (8 jours)		Test microplaque (8 jours)			
	Paramètre		Paramètres			
	Compte cellulaire		Compte cellulaire		ATP(URL)	
Numéro*	Ecart**	Valeur CI50 Log-Probit***	Ecart**	Valeur CI50 Log-Probit***	Ecart**	Valeur CI50 Log-Probit***
1	1,57(47,1) - 3,13(87,7)	1,2	6,25(11,4) - 12,5(60,7)	11,0	12,5(16,8) - 25(91,7)	-
2	1,57(25,4) - 3,13(82,2)	2,0	1,57(48,9) - 3,13(84,8)	1,8	1,57(35,2) - 3,13(53,6)	2,4
3	1,57(28,8) - 3,13(53,2)	2,7	1,57(35,4) - 3,13(51,4)	-	3,13(35,3) - 6,25(95,7)	-
4	6,25(44,7) - 12,5(90,0)	5,8	3,13(22) - 6,25(64,4)	5,2	-	-
5	6,25(44,9) - 12,5(66,5)	7,2	2,85(21,7) - 11,4(75,7)	5,9	5,7(15,7) - 11,4(59,3)	6,1
6	6,25(36,8) - 12,5(60,8)	9,0	25(9,7) - 50(51,1)	40,0	50(0) - 90,9(98,0)	-
7	25(44,7) - 50(74,6)	29,0	25(0) - 50(78,5)	-	25(0) - 50(70,3)	-
8	12,5(17) - 25(51)	31,0	50(0) - 90,9(56,6)	-	>90,9(12,9)	-
9	25(7,8) - 50(61,1)	45,0	25(30,9) - 50(90)	30	50(12,1) - 90,9(97,1)	-
10	-	-	25(19) - 50(55)	46	50(38,9) - 90,9(60)	70

Échantillon	Test classique (4 jours)		Test microplaque (4 jours)			
	Paramètre		Paramètres			
	Compte cellulaire		Compte cellulaire		ATP (URL)	
Numéro*	Ecart**	Valeur CI50 Log-Probit***	Ecart**	Valeur CI50 Log-Probit***	Ecart**	Valeur CI50 Log-Probit***
11	0,7(10) - 1,4(59,6)	1,2	0,7(42,5) - 1,4(90)	0,7	0,45(24,8) - 0,72(53,8)	0,67
12	1,4(45,6) - 2,8(61,4)	1,7	0,36(43) - 0,7(55)	0,54	5,7(49,8) - 11,4(75,2)	4,2
13	6,25(45) - 12,5(76,1)	8,5	5,7(16) - 11,4(52,5)	11,4	-	-
14	6,25(34,2) - 12,5(64,2)	9,0	5,7(15) - 11,4(53,7)	11,0	11,4(48,5) - 22,7(57,5)	-
15	6,25(0) - 12,5(71,3)	-	11,4(34,7) - 22,7(78,8)	15,0	11,4(36,3) - 22,7(91)	13,0
16	6,25(14,4) - 12,5(58,6)	13,0	11,4(33,3) - 22,7(71)	15,0	-	-
17	12,5(48,3) - 25(60,9)	15,5	5,7(33,9) - 11,4(50,2)	10,9	5,7(22,3) - 11,4(79,2)	9,2
18	12,5(5,4) - 25(70)	22,5	11,4(0) - 22,7(61,1)	-	11,4(17,8) - 22,7(61,4)	19,0
19	12,5(5,2) - 25(67,5)	23,0	11,4(25,1) - 22,7(66,1)	18,0	36(37,3) - 45(58)	42,0
20	12,5(2,4) - 25(71,2)	24,0	11,4(37,2) - 22,7(81)	14,0	-	-
21	25(42,3) - 50(93,2)	27,0	11,4(7) - 22,7(65,3)	21,0	11,4(44,1) - 22,7(58,8)	20,0
22	25(43,2) - 50(57,3)	37,0	22,7(36) - 45,45(53,1)	35,5	-	-
23	50(44,9) - 100(80,2)	50,0	45,45(31,3) - 90,9(68,2)	58,0	45,45(47,5) - 72(60,6)	54,0
24	50(43,1) - 100(82,4)	55,0	45,45(47,2) - 90,9(86,7)	56,0	45,45(31,9) - 90,9(72,5)	-
25	>100 (N.D.)	>100	45,45(45,4) - 90,9(54,1)	-	>90,9(36,3)	>90,9

Échantillons précités aux figures 8 et 9.

* L'écart dénote la fourchette de toxicité (en v/v%) pour les effluents dans laquelle se trouve la CI50; le pourcentage d'inhibition (%) obtenu aux deux extrémités de la fourchette est indiqué.

** Lorsque possible, la valeur CI50 fut déterminée sur papier graphique.

TABLEAU 15. VALEURS LOGARITHMIQUES DES UNITÉS TOXIQUES EMPLOYÉES POUR L'ANALYSE STATISTIQUE DES BIOTESTS ALGAUX

Echan- tillon*	Durée (jours)	Test classique		Test microplaque			
		Compte cellulaire		Compte cellulaire		ATP	
		A	B	A	B	A	B
1	8	1,92	-	0,96	1,05	—	0,75
2	8	1,70	1,65	1,74	1,65	1,62	1,65
3	8	1,57	1,65	—	1,65	—	1,35
4	8	1,24	1,05	1,28	1,35	—	—
5	8	1,14	1,05	1,23	1,24	1,21	1,09
6	8	1,05	1,05	0,40	0,45	—	0,17
7	8	0,54	0,45	—	0,45	—	0,45
8	8	0,51	0,75	—	0,17	—	—
9	8	0,35	0,45	0,52	0,45	—	0,17
10	8	—	—	0,34	0,45	0,15	0,17
11	4	1,92	2,00	2,15	2,00	2,17	2,24
12	4	1,77	1,70	2,27	2,30	1,38	1,09
13	4	1,07	1,05	0,94	1,09	—	—
14	4	1,05	1,05	0,96	1,09	—	0,79
15	4	—	1,05	0,82	0,79	0,89	0,79
16	4	0,89	1,05	0,82	0,79	—	—
17	4	0,81	0,75	0,96	1,09	1,04	1,09
18	4	0,65	0,75	—	0,79	0,72	0,79
19	4	0,64	0,75	0,74	0,79	0,38	0,40
20	4	0,62	0,75	0,85	0,79	—	—
21	4	0,57	0,45	0,68	0,79	0,70	0,79
22	4	0,43	0,45	0,45	0,49	—	—
23	4	0,30	0,15	0,24	0,19	0,27	0,24
24	4	0,26	0,15	0,25	0,19	—	0,19
25	4	—	—	—	0,19	—	—

* Echantillons précités aux figures 8 et 9.

A: valeurs calculées à partir des CI50 déterminées par interpolation sur papier log-probabilité.

B: valeurs calculées à partir des CI50 équivalant aux médianes de l'écart de toxicité.

TABLEAU 16. VALEURS t DE COMPARAISON POUR LES RÉSULTATS DE TOXICITÉ OBTENUS (1) PAR DÉNOMBREMENT CELLULAIRE A PARTIR DU TEST CLASSIQUE ET DU TEST MICROPLAQUE (TC_{DC} vs MP_{DC}) ET (2) PAR LE TEST MICROPLAQUE A PARTIR DU DÉNOMBREMENT CELLULAIRE ET DE L'ATP (MP_{DC} vs MP_{ATP})

Durée des biotests (jours)	Technique	TCDC vs MPDC		MPDC vs MPATP	
		Nombre de mesures	t	nombre de mesures	t
8	A	6	1,08	3	2,18
8	B	8	0,74	8	4,26**
4	A	12	1,62	7	1,10
4	B	14	1,30	10	1,25
8 et 4	A	18	0,18	10	1,46
8 et 4	B	22	0,31	18	2,44*

A : CI50 déterminée par interpolation sur papier graphique.

B : CI50 déterminée à partir de la médiane de l'écart de toxicité.

* : différence significative avec 95% de probabilité.

** : différence significative avec 99% de probabilité.

des six comparaisons réalisées entre les données de toxicité de MPDC* et celles de MPATP*.

En conclusion, cette première analyse statistique confirme que le test microplaque apporte des résultats significativement similaires à ceux du test classique et que, pour le test microplaque, l'utilisation de l'ATP au lieu du compte cellulaire peut donner parfois des valeurs de toxicité significativement différentes et plus faibles (voir tableaux 16 et 15).

Nous avons poursuivi l'étude statistique entre les deux méthodes ou les deux paramètres en procédant à une analyse de régression linéaire. On a calculé les coefficients de corrélation (r) entre chacune des séries présentées plus haut (voir tableau 15). Les résultats de ces calculs apparaissent au tableau 17. On constate que les valeurs de r sont toutes supérieures à 0,8 à l'exception de la corrélation MPDC versus TCDC (8 jours, technique A) où celle-ci est égale à 0,6.

La présentation graphique de ces données est exposée à la figure 10. On note que sur les graphiques montrant MPDC en fonction de TCDC ainsi que MPATP en fonction de MPDC pour une durée de 4 jours (techniques A et B), la distribution des valeurs est

*MPDC: Test microplaque par dénombrement cellulaire.

MPATP: Test microplaque par mesure de l'ATP.

TABLEAU 17. SOMMAIRE DES RELATIONS LINÉAIRES OBTENUES ENTRE
DIFFÉRENTES MÉTHODES DE MESURE DE LA TOXICITÉ ALGALE

Y	X	Durée (jours)	Technique	Nombre de mesures	Coefficient de corrélacion	Equation de régression
MPDC	TCDC	8	A	6	0,600*	-
MPDC	TCDC	8	B	8	0,842	$Y = 1,097 X - 0,186$
MPDC	TCDC	4	A	12	0,973	$Y = 1,185 X - 0,075$
MPDC	TCDC	4	B	14	0,925	$Y = 1,041 X + 0,042$
MPDC	TCDC	8 et 4	A	18	0,837	$Y = 0,893 X + 0,091$
MPDC	TCDC	8 et 4	B	22	0,884	$Y = 1,033 X - 0,012$
MPATP	MPDC	8	A	3	-	-
MPATP	MPDC	8	B	8	0,975	$Y = 1,046 X - 0,241$
MPATP	MPDC	4	A	7	0,887	$Y = 0,744 X + 0,138$
MPATP	MPDC	4	B	10	0,803	$Y = 0,689 X + 0,151$
MPATP	MPDC	8 et 4	A	10	0,910	$Y = 0,812 X + 0,073$
MPATP	MPDC	8 et 4	B	18	0,864	$Y = 0,810 X + 0,006$

* : coefficient de corrélation non significatif à 95% de probabilité.

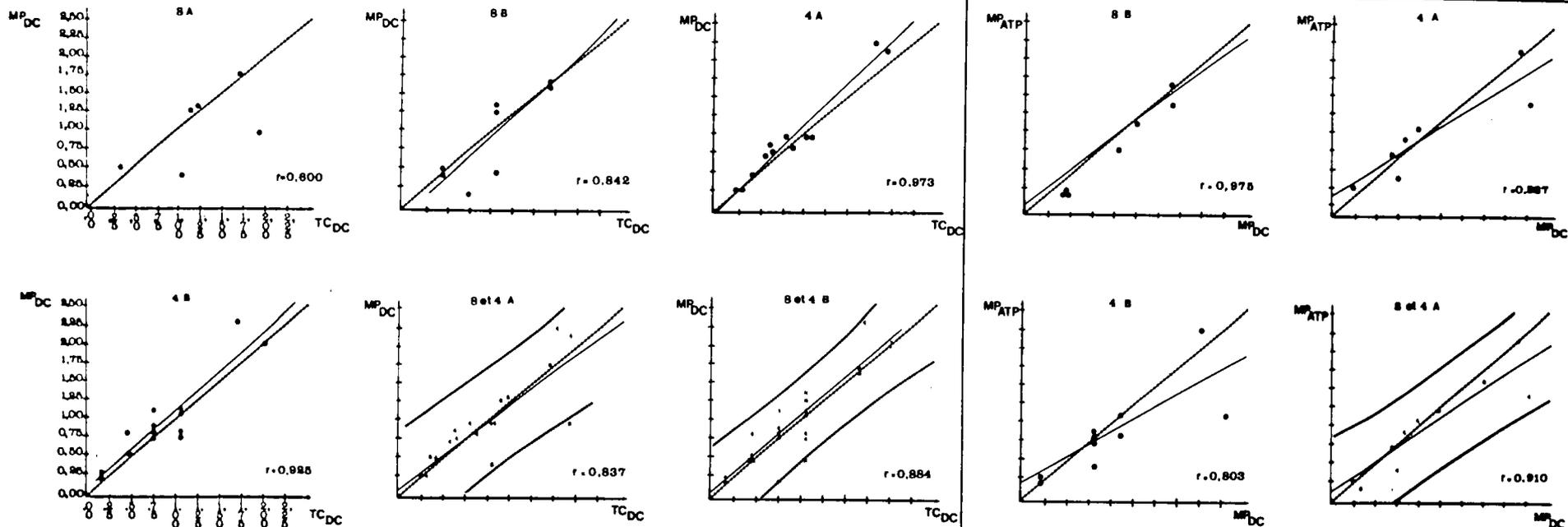
MP : test sur microplaque.

TC : test classique.

DC : dénombrement cellulaire.

A : CI50 déterminée par interpolation sur papier log-Probit.

B : CI50 déterminée à partir de la médiane de l'écart de toxicité.



CODE :

4, 8 CI 50 DE 4 OU 8 JOURS

A, B CALCULS SELON TECHNIQUE A OU B (voir tableau 15)

M P TEST MICROPLAQUE

T C TEST CLASSIQUE

D C DENOMBREMENT CELLULAIRE

— DROITE D'EQUIVALENCE

— DROITE DE REGRESSION

— INTERVALLE DE CONFIANCE A 95%

r COEFFICIENT DE CORRELATION

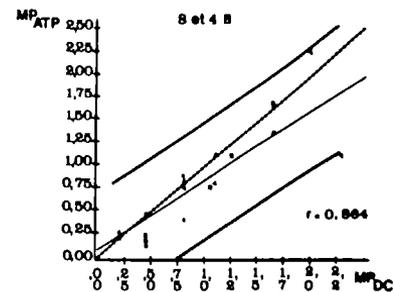


FIGURE 10. COMPARAISON DES DROITES DE REGRESSION LINEAIRE OBTENUES ENTRE DIFFERENTES METHODES DE MESURE DE TOXICITE ALGALE.

quelque peu asymétrique, deux points se retrouvant plutôt éloignés du nuage de points. Bien que ces deux points influencent le calcul du coefficient de corrélation, leur position par rapport aux autres points ne modifie guère la relation linéaire. L'examen graphique de l'ensemble des résultats obtenus pour 4 et 8 jours de biotests montre également que les relations entre les méthodes de mesure de bioessais ne sont pas changées par la durée d'incubation.

Les équations significatives de régression linéaire (voir tableau 17) pouvant servir pour estimer la valeur d'une variable par rapport à une autre, nous avons voulu vérifier si le modèle choisi $Y = aX + b$ est différent du modèle théorique $Y = X$, ce qui revient à vérifier si "a" est significativement différent de 1,0 et si "b" est significativement différent de zéro. Pour vérifier cette hypothèse, on calcule les intervalles de confiance (à 95%) de ces paramètres a et b (Nie et al., 1975).

Ces intervalles de confiance sur les pentes (a) et sur les ordonnées à l'origine (b) sont présentés respectivement aux tableaux 18 et 19. Dans tous les cas, on observe que la valeur unitaire pour la pente et la valeur nulle pour l'ordonnée à l'origine tombent à l'intérieur des intervalles de confiance à 95%. On constate donc qu'on peut déterminer directement la valeur de Y à partir de la valeur de X et que, par conséquent, il y a concordance entre les différentes séries comparées.

TABLEAU 18. INTERVALLES DE CONFIANCE A 95% SUR LES PENTES DES ÉQUATIONS DE RÉGRESSION POUR DIFFÉRENTES MÉTHODES DE MESURE DE LA TOXICITÉ ALGALE

Y	X	Durée (jours)	Technique	Nombre de mesures	Pente a	Ecart-type Sa	t à 95%	Intervalle de confiance à 95%
MPDC	TCDC	8	B	8	1,097	0,287	2,447	0,395 à 1,799
MPDC	TCDC	4	A	12	1,185	0,0895	2,228	0,986 à 1,384
MPDC	TCDC	4	B	14	1,041	0,123	2,179	0,773 à 1,309
MPDC	TCDC	8 et 4	A	18	0,893	0,146	2,120	0,583 à 1,203
MPDC	TCDC	8 et 4	B	22	1,033	0,122	2,086	0,778 à 1,287
MPATP	MPDC	8	B	8	1,046	0,0971	2,447	0,808 à 1,284
MPATP	MPDC	4	A	7	0,744	0,173	2,571	0,299 à 1,189
MPATP	MPDC	4	B	10	0,689	0,181	2,306	0,272 à 1,106
MPATP	MPDC	8 et 4	A	10	0,812	0,131	2,306	0,510 à 1,114
MPATP	MPDC	8 et 4	B	18	0,810	0,118	2,120	0,560 à 1,060

N.B. Voir tableau 17 pour la légende des abréviations.

TABLEAU 19. INTERVALLES DE CONFIANCE A 95% SUR LES ORDONNÉES A L'ORIGINE DES ÉQUATIONS DE RÉGRESSION POUR DIFFÉRENTES MÉTHODES DE MESURE DE LA TOXICITÉ ALGALE

Y	X	Durée (jours)	Technique	Nombre de mesures	Ordonnée à l'origine b	Ecart-type S_b	t à 95%	Intervalle de confiance à 95%
MPDC	TCDC	8	B	8	-0,186	0,317	2,447	-0,962 à 0,590
MPDC	TCDC	4	A	12	-0,075	0,089	2,228	-0,273 à 0,123
MPDC	TCDC	4	B	14	0,042	0,123	2,179	-0,226 à 0,310
MPDC	TCDC	8 et 4	A	18	0,091	0,164	2,120	-0,257 à 0,439
MPDC	TCDC	8 et 4	B	22	-0,012	0,127	2,086	-0,277 à 0,253
MPATP	MPDC	8	B	8	-0,241	0,103	2,447	-0,493 à 0,011
MPATP	MPDC	4	A	7	0,138	0,231	2,571	-0,456 à 0,732
MPATP	MPDC	4	B	10	0,151	0,216	2,306	-0,347 à 0,649
MPATP	MPDC	8 et 4	A	10	0,073	0,172	2,306	-0,324 à 0,470
MPATP	MPDC	8 et 4	B	18	0,006	0,134	2,120	-0,278 à 0,290

N.B. Voir tableau 17 pour la légende des abréviations.

En conclusion, la seconde analyse statistique explicite qu'il existe une bonne concordance entre les méthodes classique et microplaque pour le dénombrement cellulaire ainsi qu'entre le compte cellulaire et la mesure de l'ATP pour le test microplaque. Dans les deux relations étudiées, le niveau de corrélation linéaire est élevé, que l'on considère les tests de 4 jours, de 8 jours ou l'ensemble des tests ou que les CI50 soient obtenues par interpolation graphique ou par la médiane de l'écart de toxicité.

1.4 Sommaire

Les travaux réalisés pour le développement d'un test algal "microplaque" ont démontré ses divers avantages. Simple, rapide et pratique au niveau de sa réalisation expérimentale, ce microtest s'avère polyvalent, quant au choix de la durée de l'exposition toxique et du paramètre de mesure de la toxicité. Lorsqu'on le compare au test classique, il y a une bonne concordance des résultats de toxicité entre les deux méthodes pour des CI50 de 4 ou 8 jours par dénombrement cellulaire. Une bonne concordance est également observée après des durées semblables de biotests entre les CI50 obtenues par dénombrement cellulaire et celles obtenues par mesure de l'ATP pour le test microplaque. L'utilisation d'un microtest algal de 4 heures, faisant appel au dosage de l'ATP comme mesure de toxicité, semble également prometteur quant à son utilité à mettre rapidement en évidence une écotoxicité flagrante de rejets liquides envers le phytoplancton.

1.5 Perspective

Nous sommes enclins à penser qu'un tel test miniaturisé offre des perspectives d'avenir pour la réalisation de biotests algaux de dépistage dont les résultats pourront, selon le besoin et la rigueur requise, être ensuite confirmés par d'autres bioessais. Nos travaux sont, assurément, loin d'être complets, car il existe la possibilité de considérer d'autres paramètres de mesure de toxicité en plus de ceux déjà utilisés. Par exemple, l'absorbance et la fluorescence, pour lesquels des instruments peuvent effectuer la lecture dans les puits des microplaques, permettraient d'automatiser davantage le microtest et d'éliminer virtuellement tout traitement ultérieur des données grâce à une interface avec un micro-ordinateur. Enfin, il est possible d'appliquer la méthode des microplaques à d'autres bioessais avec d'autres types d'organismes pour évaluer la qualité du milieu aquatique.

CHAPITRE 2:

EXPÉRIMENTATION DU PARAMÈTRE ATP DES POISSONS POUR ÉVALUER
L'ÉCOTOXICITÉ SUBLÉTALE

2.1 CONTEXTE

Lors de réunions scientifiques récentes (Leclerc et Dive, 1982; McKay, 1983, Persoone et al., 1984), on a souventes fois souligné la nécessité de mettre en oeuvre des stratégies écotoxicologiques incluant des espèces indicatrices importantes pour les évaluations des niveaux létal, sublétal et chronique afin de prévoir les répercussions des agressions toxiques sur le milieu aquatique. Par exemple, l'OCDE recommande l'application de trois biotests standardisés avec algues, daphnies et poissons pour étudier les produits chimiques (OCDE, 1981a). Au Canada, bien que certains types d'effluents industriels soient réglementés ou surveillés par des bioessais de létalité aiguë à court terme normalisés pour la truite arc-en-ciel (Environnement Canada, 1980a), il y a une carence de méthodes de prévision pour préciser les concentrations d'eaux résiduelles qui ne présentent pas de danger sublétal.

Malgré qu'il soit impératif que des tests de toxicité létale aiguë à court terme, comme la détermination de la CL50* chez les poissons, soient maintenus afin de fournir un indice minimal pour formuler des lignes directrices ou pour s'assurer de la conformité des effluents industriels aux règlements établis, ceci ne constitue que la toute première étape de mesure de protection environnementale. Alors que les individus morts constituent un paramètre facile à mesurer,

*CL50: Concentration létale pour 50% des individus pendant une durée précise.

tous les survivants des épreuves de toxicité létale sont considérés de façon erronée comme appartenant à une seule catégorie. En effet, tous les survivants n'ont pas un état physiologique identique après une exposition à un agent toxique. Compte tenu de ceci, il faut avoir recours à une mesure expérimentale permettant de mieux définir l'état de santé réel des survivants de cette "zone grise". Les tests sublétaux du type éthologique (par exemple, évitement et capacité natatoire) ont certes une valeur indéniable quant à la précision qu'ils apportent pour prédire les concentrations non bio-civives d'effluents déversés dans des cours d'eaux (Hadjinicolaou, 1983; Thellen, 1983). Ces tests, cependant, n'indiquent pas si la réaction éthologique, face à une agression sublétales quelconque, est nécessairement accompagnée d'un véritable état de stress chez l'organisme soumis à l'exposition toxique. Nous avons dès lors pensé que l'utilisation d'un critère de mesure direct du stress chez le poisson serait un important complément d'information s'ajoutant aux données de létalité aiguë.

Afin de déterminer l'état physiologique d'organismes divers exposés à un stress environnemental, différents paramètres biochimiques peuvent être étudiés. Entre autres, la mesure des nucléotides adénylates est recommandée à cette fin (Karl, 1980). Leur présence ubiquiste à l'intérieur de toute cellule vivante ainsi que leur participation dans la plupart des réactions anaboliques et cataboliques en font des composés de choix (Karl, 1980).

L'exploitation paramétrique des adénylates pour démontrer l'effet d'une quelconque agression toxique se trouve davantage justifiée par le fait que ceux-ci constituent le pool énergétique de la cellule. Ainsi, toute modification des teneurs individuelles normales (AMP, ADP ou ATP) des nucléotides adénylates ou de la somme de celles-ci reflète un changement dans l'énergie métabolique disponible au niveau cellulaire et, donc, un niveau altéré de vitalité. Tout changement dans les proportions des nucléotides adénylates est également indicatif d'une répercussion sur le plan cellulaire. Pour cela, on étudie la charge énergétique des adénylates (CEA), laquelle quantifie l'énergie disponible dans le pool énergétique cellulaire et est définie par l'équation suivante (Atkinson, 1977):

$$CEA = \frac{ATP + \frac{1}{2} ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

Généralement, les valeurs CEA se maintiennent à l'intérieur d'une plage variant entre 0,87 et 0,94 chez les organismes non stressés et descendent en dessous de ces valeurs en conditions de stress (Atkinson, 1977). Plusieurs études récentes font état de l'emploi de un ou plus des cinq paramètres (AMP, ADP, ATP, somme de AMP + ADP + ATP et CEA) qu'offrent les nucléotides adénylates pour déterminer des effets toxiques sublétaux chez des organismes variés. Ces études ont été faites avec des bactéries (Karl, 1980; Martin et al., 1980), des algues (Jeanjean, 1976; Couture et al. 1981, Vasseur et al., 1981, Blaise et al., 1984), du microplancton marin (Romano et Daumas, 1981; Fitzwater et al., 1983), des mollusques (Rainer et al., 1979; Ivanovici, 1980), des crustacés (Haya et al., 1983a) et des

poissons (Driedzic et Hochachka, 1976; Jorgensen et Mustafa, 1980; MacFarlane, 1981; Vetter et Hodson, 1982; Haya et al., 1983b).

En ce qui concerne les adénylates chez les poissons, Vetter et Hodson (1982) ont signalé l'effet de l'hypoxie sur certains adénylates et sur la CEA dans le muscle blanc de 11 espèces estuariennes. De fait, leurs données montrent clairement que l'hypoxie entraîne une diminution de la respiration et, subséquemment, une baisse importante de l'ATP dans le muscle blanc des poissons. Si l'hypoxie produit un tel effet, nous avons supposé que, parmi la gamme d'agents toxiques dans les différents effluents industriels, il y en a probablement plusieurs qui peuvent induire une inhibition semblable des taux d'ATP dans le muscle blanc de la truite. En choisissant ce paramètre sub-cellulaire représentatif, nous avons cherché à montrer le stress physiologique auquel la truite arc-en-ciel est soumise lors d'une exposition de 96 heures (court terme) à plusieurs effluents industriels. Nous n'avons retenu que l'ATP parmi les adénylates susceptibles de révéler un effet de stress chez le poisson car il fallait assurer, tout d'abord, la réussite méthodologique de ce travail expérimental. D'autre part, certaines études suggèrent que l'ATP peut être aussi sensible (Vetter et Hodson, 1982) et même plus sensible (Driedzic et Hochachka, 1976) que la CEA pour repérer des conditions de stress dans le muscle blanc chez le poisson. Dans ce chapitre, nous exposons la recherche méthodologique que nous avons réalisée en vue d'évaluer la concentration du seuil de stress pour des

effluents industriels. Nous indiquons les résultats obtenus lors de ce travail et nous proposons des utilisations et applications possibles de cette méthode pour les activités en rapport avec la protection de l'environnement.

2.2 Matériel et méthodes

2.2.a Echantillons

Sept effluents industriels ont fait l'objet de l'étude présente: cinq de ceux-ci étaient originaire de l'industrie des pâtes et papiers, alors que les deux autres provenaient de technologies liées à la production chimique (pigments de peinture, polymères, munitions, etc.).

2.2.b Protocole général

Pour préciser le seuil de stress chez la truite arc-en-ciel, nous avons voulu viser une simplicité méthodologique. En réalisant le bioessai standardisé de toxicité létale aiguë de 96 heures pour déterminer la CL50, nous réalisons, concurremment, l'évaluation du stress car ce sont les survivants du biotest CL50 qui servent à mesurer les taux d'ATP.

De plus, nous avons choisi d'évaluer l'effet de stress dans le tissu musculaire blanc pour les quatre raisons qui suivent:

- (i) d'importantes fluctuations en concentrations d'adénylates peuvent s'y manifester à cause de la nature active d'un tel tissu contrairement, par exemple, à un tissu adipeux (Vetter et Hodson, 1982);

- (ii) les teneurs d'ATP y sont plus élevées qu'ailleurs (par exemple, il y a respectivement 1,07 et 7,76 umoles ATP.g⁻¹ de poids frais dans le foie et le muscle chez les tacons de Salmo salar selon Haya et al, 1983b); ceci devrait favoriser une bonne sensibilité de mesure; notons, en plus, que le muscle est le tissu le plus important, sur le plan quantitatif, du métabolisme énergétique (Van den Thillart et al., 1980);

- (iii) la dissection s'avère plus aisée pour prélever du tissu musculaire que du tissu interne; ceci se révèle déterminant car la rapidité d'exécution est critique à cette étape de la procédure afin de ne pas occasionner des modifications des teneurs en ATP;

- (iv) la constance inter-spécifique des teneurs des adénylates dans le muscle blanc est une caractéristique qui favorise leur emploi en tant qu'indicateurs de stress chez les poissons (Vetter et Hodson, 1982).

Les différentes étapes de la procédure méthodologique sont décrites de façon schématique à la figure 11.

2.2.c Bioessai de toxicité létale aiguë

Nous avons utilisé la méthode normalisée recommandée par Environnement Canada (1980a) pour des bioessais statiques de CL50-96 heures avec des alevins de truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri Richardson). Les bioessais ont été effectués dans des contenants renfermant un volume d'échantillon de 60L et 10 poissons (taille; de 5,0 - 7,5 cm, poids; 1,6 - 4 g) pour chaque concentration. L'oxygène dissous, la température et le pH ont été mesurés à des intervalles donnés pour s'assurer que la létalité et le stress étaient réellement induits par les concentrations de l'effluent et non par ces trois paramètres.

2.2.d Mesure du seuil de stress

(i) Transfert des poissons

Soixante-douze heures après le début du bio-test (CL50-96 heures), une sélection aléatoire de cinq poissons est faite dans les concentrations du bioessai qui n'avaient causé aucune mortalité. Chaque poisson est individuellement transféré dans un béccher en polyéthylène rigide d'une capacité de 5L qui contient 2L d'effluent (ou d'eau-contrôle) provenant de chacun des volumes de 60L utilisés

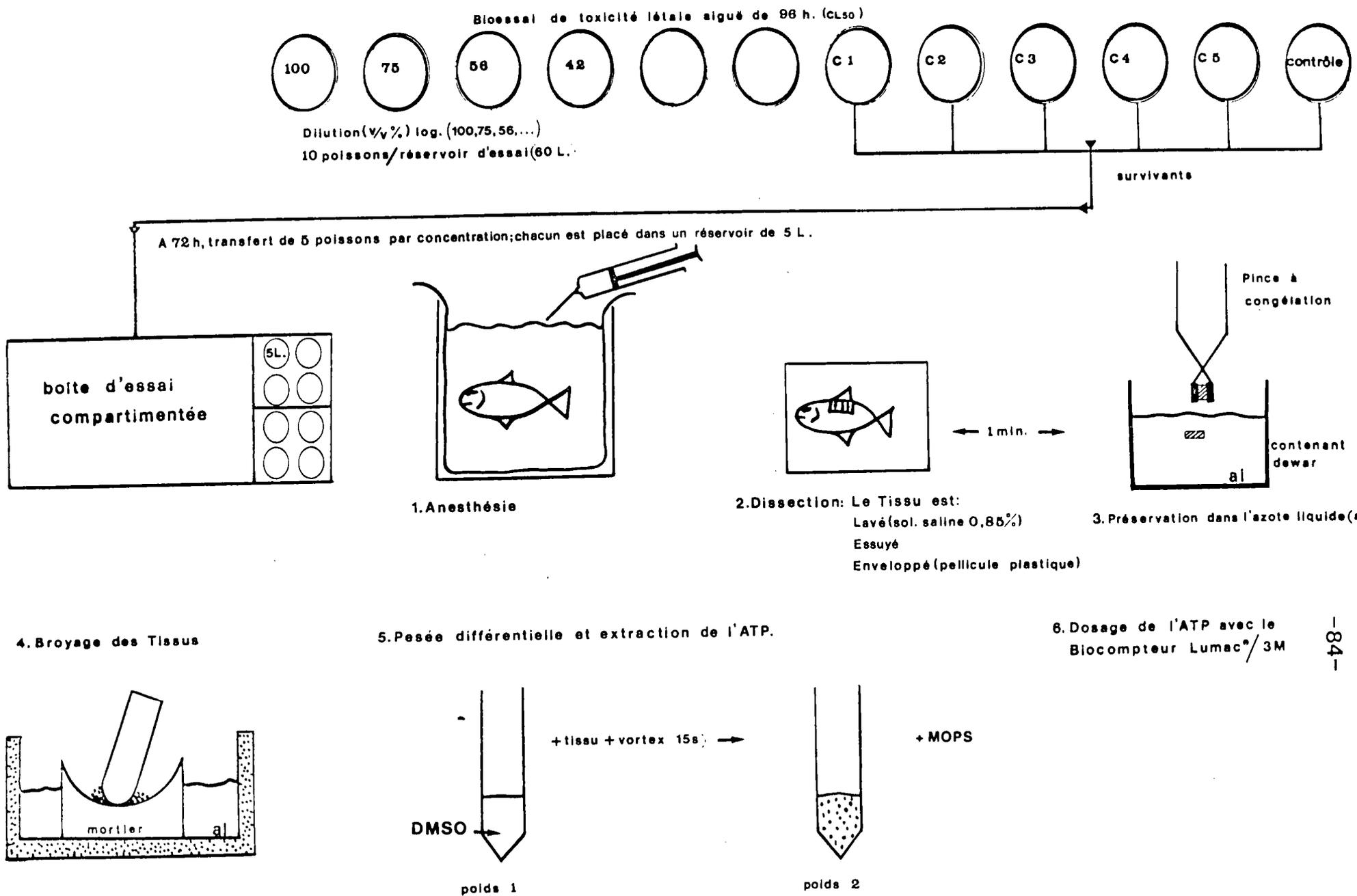


FIGURE 11. VUE SCHEMATIQUE DE LA PROCEDURE POUR MESURER L'ATP DANS LE MUSCLE BLANC CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL.

pour le biotest CL50 aux diverses concentrations sublétales. Chaque b cher de 5L est en fait un modèle réduit des réservoirs d'essai de 60L et est doublé d'un sac de polyéthylène transparent, également d'une capacité de 5L. Dans ce dernier, il y a un cylindre en plastique Vexar (Dupont)   filet maillé (avec couvercle) conçu pour 1) faciliter les observations des poissons, 2) reproduire un milieu aquatique plus sombre et par conséquent plus réaliste et 3) confiner les poissons. Chaque réservoir de 5L est ensuite placé dans des boîtes compartimentées dans lesquelles les contrôles de l'aération, de la température et du pH sont assurés comme précédemment (voir 2.2.c). L'attribution de compartiments individuels aux poissons survivants après 72 heures est essentielle pour éliminer le stress indésirable qui autrement se manifesterait lors de la capture séquentielle après les 96 heures du bioessai CL50. Selon notre procédure, les poissons transférés sont effectivement soumis au choc du transfert à 72 heures; ils ont cependant 24 heures pour récupérer du stress induit par cette courte manipulation.

(ii) Anesthésie

A la fin du biotest CL50, on anesthésie chaque poisson à l'aide de 30mL d'une solution de 10g/L de m thylsulfonate de tricaine (MS222, Sandoz) introduite dans chaque b cher au moyen d'une seringue dont l'extrémité est prolongée par un tube en plastique souple de 60cm (Tygon). La solution de MS222 est dispensée quelques centimètres au-dessus de l'échantillon d'effluent ou de la solution témoin en un

seul mouvement continu de façon à reproduire une averse ou l'effet d'une chute d'eau. De cette façon, les poissons ne sont pas perturbés et sont en général anesthésiés en l'espace de 30 à 60 secondes.

(iii) Dissection

Environ 100mg de muscle blanc dorso-latéral sont prélevés sur le côté droit de chaque poisson. Le tissu disséqué est immédiatement lavé dans une solution physiologique (0,85 % de NaCl), essuyé brièvement, enveloppé dans une pellicule plastique de type Saran (5 x 5cm), placé dans une pince à congélation (instrument "freeze-clamp" selon les spécifications du Dr Vinay, Tipal Instruments Ltd., Montréal) refroidie au préalable à -190°C au moyen d'azote liquide et soumis à une pression d'environ $100\text{kg}/\text{cm}^2$. Tout ce travail est effectué en général en 60 ± 10 secondes. Tous les tissus de poisson traités de cette façon sont ensuite temporairement entreposés dans un récipient Dewar de 2L contenant de l'azote liquide.

(iv) Broyage des tissus

Chaque échantillon ainsi congelé est ensuite pulvérisé en une fine poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon en porcelaine gardés constamment dans un bain d'azote liquide.

(v) Mesure du poids des tissus et extraction de l'ATP

Chaque échantillon de muscle pulvérisé est introduit par la suite dans un tube à centrifugation de polystyrène (Corning) stérile de 15mL préalablement pesé (balance Mettler AE 160) avec 2mL de DMSO* (pureté de 99,8%) pour l'extraction de l'ATP. Chaque tube est ensuite agité au vortex pendant 15 s et pesé de nouveau: on obtient alors, par différence, le poids frais en mg de muscle blanc qui sera soumis au dosage. On rajoute ensuite 8mL de tampon MOPS** à chaque tube. Tous les tubes sont capuchonnés, agités pendant 20 s et entreposés dans un congélateur (-20°C) lorsque les dosages d'ATP ne peuvent pas être effectués le même jour. Notons que les proportions de DMSO et de tampon MOPS utilisées pour l'extraction de l'ATP des truites sont les mêmes que celles rapportées par Jakubczak et Leclerc (1980) pour l'extraction de l'ATP bactérien.

(vi) Dosage de l'ATP

Les émissions de photons (unités relatives de lumière = URL) ont été mesurées avec un luminomètre Lumac/3M (Bio-compteur Modèle M2010). Tous les réactifs et le matériel nécessaire pour déterminer les URL et pour effectuer le dosage de l'ATP proviennent de la firme Lumac (Réactif Lumit PM Luciférase-Luciférine, tampon Lumit, étalons d'ATP,

* DMSO: Diméthylsulfoxyde

** Le tampon MOPS contient du 4-morpholinopropylsulfonate à 0,2%, du NaOH à 0,03% et du MgSO₄ à 0,006%: l'ajustement du pH est à 7,4.

lumacuvettes). Le contenu du mélange d'extraction pré-décrit à la section (v) est, si nécessaire, décongelé et ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 1 900g (centrifugeuse Damon/IEC, modèle HN S II). Afin de réduire au maximum le "quenching" et de situer les mesures dans un intervalle d'URL sans artéfact (entre 500 et 5 000 URL), le mélange d'extraction est dilué deux fois de suite pour donner un mélange de dosage destiné à la luminométrie, tel qu'indiqué ci-dessous.

Dilution de 200 500x menant à la mesure luminométrique

<u>Mélange d'extraction</u>	<u>Mélange intermédiaire</u>	<u>Mélange de dosage</u>	<u>Luminométrie**</u>
Tissus (x mg) DMSO (2mL) MOPS (8mL)	Mélange d'extraction (25uL) MOPS 10mL	Mélange intermédiaire (20uL) Tampon A (200uL)*	Addition de 100uL de réactif Lumit PM et intégration en mode pic durant 10s.

* Tampon A; tampon Lumit avec 10 mM KCl.

** La perte d'ATP pendant toute la dilution n'excède pas 5% comme nous l'avons vérifié en ajoutant des concentrations connues d'ATP à des mélanges d'extraction.

Les mesures d'URL ont été effectuées en duplicata à partir du mélange d'extraction de chaque tissu étudié. Lorsque l'écart entre les deux mesures d'URL était supérieur à 10%, un troisième échantillon était analysé pour valider l'une des deux mesures enregistrées. Quand le dosage de l'ATP était fait comme tel, on utilisa la technique de standardisation interne (Bulletin de la firme Lumac sur la standardisation interne et voir 1.2.d).

(vii) Traitement des données

Les URL ont été rapportées en URL.mg⁻¹ de poids frais de muscle blanc et leurs valeurs chez les poissons exposés aux effluents ont été comparées à celles des poissons-contrôles sur une base de pourcentages. Lors de ces calculs, nous avons déterminé les écarts-type de ces pourcentages. De cette façon, une concentration minimale de stress (CMS) a été estimée pour chaque échantillon d'effluent étudié; lorsque la CMS ne pouvait être atteinte, nous avons rapporté une valeur indéterminée, soit CMS plus petite ou plus grande qu'une concentration donnée. La CMS était comparée à la valeur correspondante de la CL50 et les rapports CL50/CMS ont été calculés. Quand le dosage de l'ATP fut réalisé par standardisation interne, sa teneur fut exprimée en umole d'ATP.g⁻¹ de muscle. L'exemple suivant permet de suivre le cheminement de ce calcul:

Données expérimentales

URL (échantillon)	:	4922
URL (échantillon + 10 ⁻³ ug ATP)	:	11605
Poids du muscle dans le mélange d'extraction	:	53,3mg
Poids moléculaire de l'ATP	:	507,2
Facteur de dilution du mélange de dosage en fonction du mélange d'extraction	:	200 500X

a) Poids du muscle dosé

$$\frac{(53,3 \times 10^{-3})g}{200 \ 500} = 2,7 \times 10^{-7}g$$

b) Relation (ATP)/URL selon standardisation interne

$$\frac{10^{-3}ug \text{ ATP}}{(11 \ 605 - 4922)'URL} = 1,5 \times 10^{-7}ug \text{ ATP.URL}^{-1}$$

c) (ATP) dans l'échantillon

$$\frac{1,5 \times 10^{-7} \text{ug ATP}}{\text{URL}} \times 4922 \text{ URL} = 7,36 \times 10^{-4} \text{ug ATP}$$

d) (ATP) en ug.g⁻¹ de muscle

$$\frac{7,36 \times 10^{-4} \text{ug ATP}}{2,7 \times 10^{-7} \text{g}} = 2\,727,76 \text{ug ATP.g}^{-1}$$

e) umole d'ATP.g⁻¹ de muscle

$$\frac{2\,727,76 \text{ug ATP.g}^{-1}}{507,2 \text{ug}} = 5,4 \text{umole ATP.g}^{-1}$$

2.3 Résultats et discussion

2.3.a Vérifications préalables pour la mesure de l'ATP

Pour vérifier la relation entre le poids du muscle et les URL, une expérience a été faite avec dix-huit poissons-contrôles dont les poids frais de tissu musculaire variaient de 14,5 à 40,3mg. La relation poids (mg) versus URL est illustrée à la figure 12:A; celle-ci montre que l'ATP est extrait selon un rendement identique indépendant du poids de muscle dosé. Nous avons répété cette expérience avec dix autres poissons-contrôles en variant davantage le poids de muscle dosé (de 15,8 à 96,3mg). La relation poids (mg) versus URL se trouve reconfirmée, comme la démontre la figure 12:B. Les résultats de ces deux premières expériences indiquaient donc la fiabilité des techniques d'extraction et de dosage retenues pour quantifier l'émission lumineuse d'ATP du tissu musculaire. Rappelons ici qu'il existe un facteur de dilution important (=200 500x) entre le mélange d'extraction et le mélange du dosage afin de pouvoir réaliser les mesures d'URL à l'intérieur d'une fourchette appropriée (voir 2.2.d vi). Ce facteur de

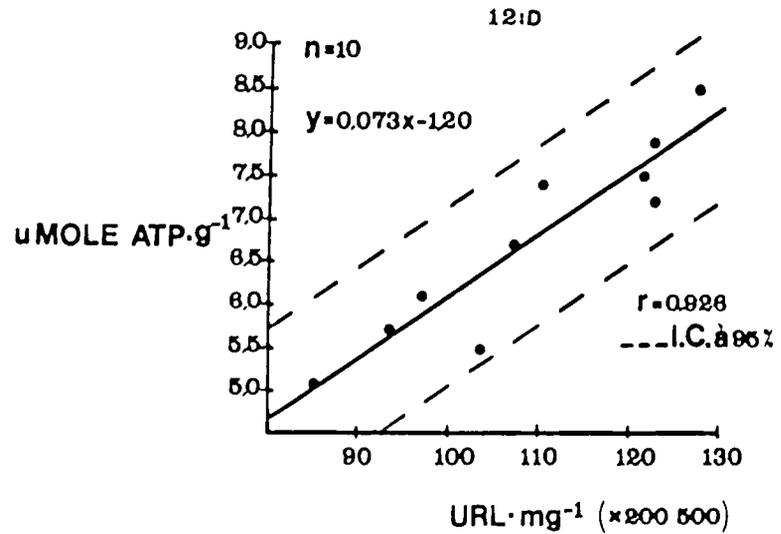
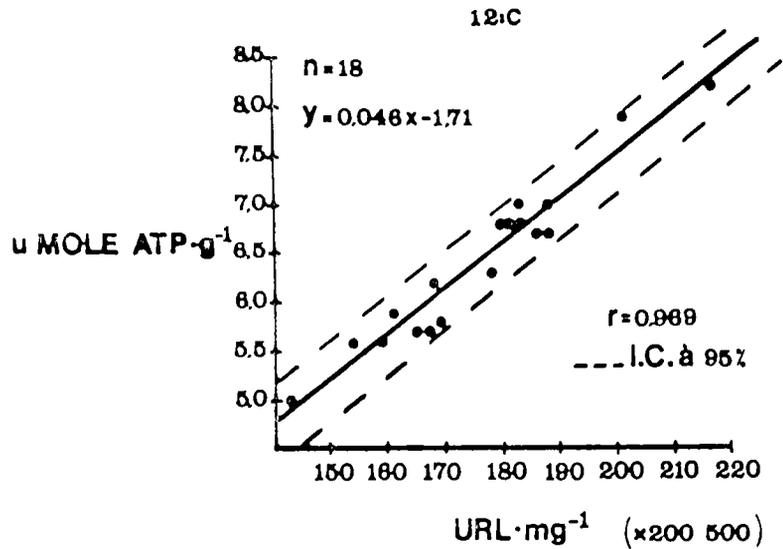
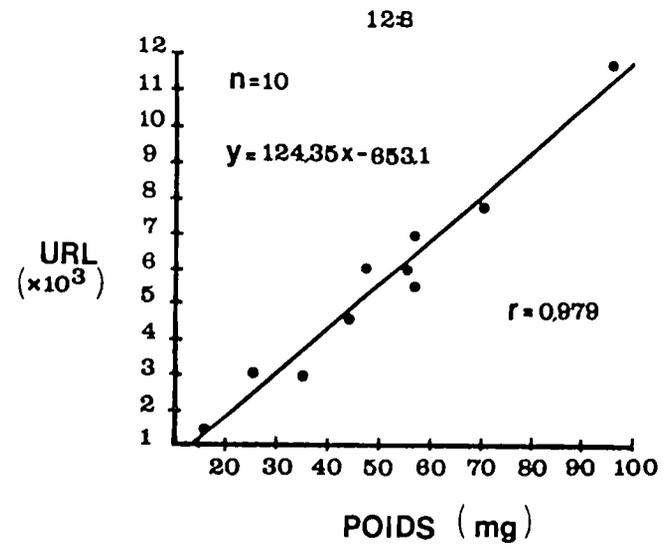
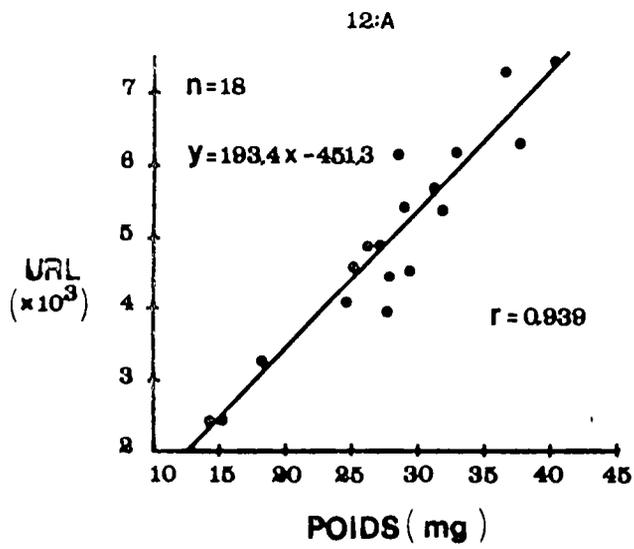


FIGURE 12. RELATION POIDS (mg) VS URL ET URL · mg⁻¹ VS u MOLE ATP · g⁻¹ LORS DU DOSAGE DE L'ATP DU MUSCLE

dilution présente sans doute l'avantage d'éliminer virtuellement tout "quenching" pour la réaction lumineuse. En résumé, la linéarité entre lumière émise vs poids (mg) est très forte, ainsi que l'indique le récapitulatif statistique suivant:

Expérience	r	r ²	t	Probabilité
1 (figure 12:A)	0,939	0,88	10,96	99,9%
2 (figure 12:B)	0,980	0,96	13,82	99,9%

Pour les deux expériences décrites à la section précédente, nous avons également établi les teneurs d'ATP du tissu musculaire en umole ATP.g⁻¹ par standardisation interne. Il nous est apparu opportun d'effectuer une comparaison entre les URL.mg⁻¹ et les umoles d'ATP.g⁻¹ pour le muscle blanc en vue d'éviter de recourir à la standardisation interne afin de calculer les teneurs exactes d'ATP. De cette façon, on simplifierait les manipulations expérimentales liées au dosage des prélèvements et on bénéficierait d'une économie importante du réactif enzymatique Lumit. Les droites de régression linéaire obtenues pour cette comparaison se trouvent illustrées à la figure 12:C et D, laquelle met bien en évidence la relation existant entre les données comparées. Le bilan statistique suivant confirme, d'ailleurs, la relation existant entre la lumière émise exprimée en URL.mg⁻¹ et le dosage de l'ATP exprimé en umole ATP.g⁻¹:

Expérience	r	r ²	t	Probabilité
1 (figure 12:C)	0,969	0,94	15,80	99,9%
2 (figure 12:D)	0,926	0,86	6,93	99,9%

On remarque également que les intervalles de confiance à 95% (figure 12:C et D) montrent la précision et la fiabilité de la prédiction des valeurs d'ATP à partir des rapports URL.mg⁻¹. Par exemple, à un tel niveau de confiance, une valeur de 140 URL.mg⁻¹ se traduit en une valeur ATP comprise entre 4,30 et 5,21 umole ATP.g⁻¹ en ce qui concerne la figure 12:C.

Ces divers résultats nous permettaient de procéder directement à la mise en évidence d'un stress chez la truite à partir des rapports URL.mg⁻¹.

2.3.b Précision et "reproductibilité" de la mesure de l'ATP

A l'aide d'une seule expérience, on a pu s'assurer de la précision et la "reproductibilité" de la méthode de mesure de l'ATP en les évaluant à partir de sous-échantillons de tissu musculaire entreposés à -20°C pendant des durées différentes. La précision ressort lorsqu'on examine les coefficients de variation obtenus qui se situent entre 0,9 et 7,9% (tableau 20). Il y a stabilité de l'ATP dans les mélanges d'extraction entreposés à -20°C pour une période d'au moins 37 jours car les dosages réalisés aux jours 0, 12 et 37

TABLEAU 20. TENEURS D'ATP ($\mu\text{mole.g}^{-1}$) DOSÉES DANS LE MUSCLE BLANC DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL¹

Poisson	Dosage ² au jour 0			Dosage ³ au jour 12			Dosage ³ au jour 37		
	Poids du tissu (mg)	\bar{X} ($\mu\text{mole ATP.g}^{-1}$)	C.V. ⁴	Poids du tissu (mg)	\bar{X} ($\mu\text{mole ATP.g}^{-1}$)	C.V. ⁴	Poids du tissu (mg)	\bar{X} ($\mu\text{mole ATP.g}^{-1}$)	C.V. ⁴
1	22,3	6,5(0,3) ⁵	4,6	28,0	6,2(0,2) ⁵	2,5	18,9	6,1(0,5) ⁵	7,7
2	20,3	6,5(0,1)	1,8	23,7	6,5(0,1)	0,9	16,0	6,2(0,5)	7,9
3	14,6	6,3(0,2)	2,7	29,5	6,1(0,2)	2,5	13,7	6,1(0,2)	2,8
4	26,9	6,3(0,3)	4,2	21,6	6,2(0,2)	3,3	19,9	6,5(0,2)	2,4
5	17,5	6,9(0,2)	3,0	26,6	6,9(0,5)	6,9	14,4	6,7(0,3)	5,2

1. Les dosages ont été réalisés en triplicata pour chacun des 5 poissons par série.
2. Le jour 0 correspond à la journée de l'extraction de l'ATP du tissu.
3. Le dosage a eu lieu après 12 ou 37 jours de congélation à -20°C .
4. Coefficient de variation exprimé en pourcentage ($=\text{Ecart-type} \times 100/\bar{X}$).
5. La valeur entre parenthèse est celle de l'écart-type pour $n=3$ dans tous les cas.

pour les cinq poissons analysés ne présentaient pas de différences significatives (test t pairé avec 95% de probabilité). En plus de nous indiquer l'avantage de ne pas avoir à réaliser la mesure de l'ATP la journée même de son extraction, cette constatation de stabilité témoigne de la "reproductibilité" de la méthode.

2.3.c Comparaison des teneurs d'ATP du muscle obtenues chez la truite arc-en-ciel avec celles d'autres poissons

En tout, 36 poissons-contrôles ont servi pour le calcul des teneurs en ATP ($\mu\text{mole.g}^{-1}$) présentes dans le tissu musculaire blanc chez la truite arc-en-ciel. Le bilan statistique se rapportant à ces données est détaillé ci-après:

<u>Poissons testés</u>	<u>Moyenne</u>	<u>Ecart-type</u>	<u>Valeurs extrêmes de l'écart-type</u>	<u>Valeurs extrêmes pour n=36</u>	<u>C.V.³</u>
36	6,52	0,9	5,6 - 7,4	5,0 - 8,5	13,8%

1. Voir figures 12:C (n=18), 12:D (n=10) et 13:A'(n=3) et tableau 20 (n=5 au jour 0).

2. Teneurs d'ATP en $\mu\text{mole.g}^{-1}$ de muscle blanc.

3. Coefficient de variation en pourcentage.

Nous avons voulu vérifier la représentativité de ces données obtenues pour le muscle blanc chez la truite arc-en-ciel en les comparant avec celles rapportées pour d'autres espèces ichthyennes. A cette fin, nous présentons un sommaire des principales données dont fait état la littérature à ce sujet:

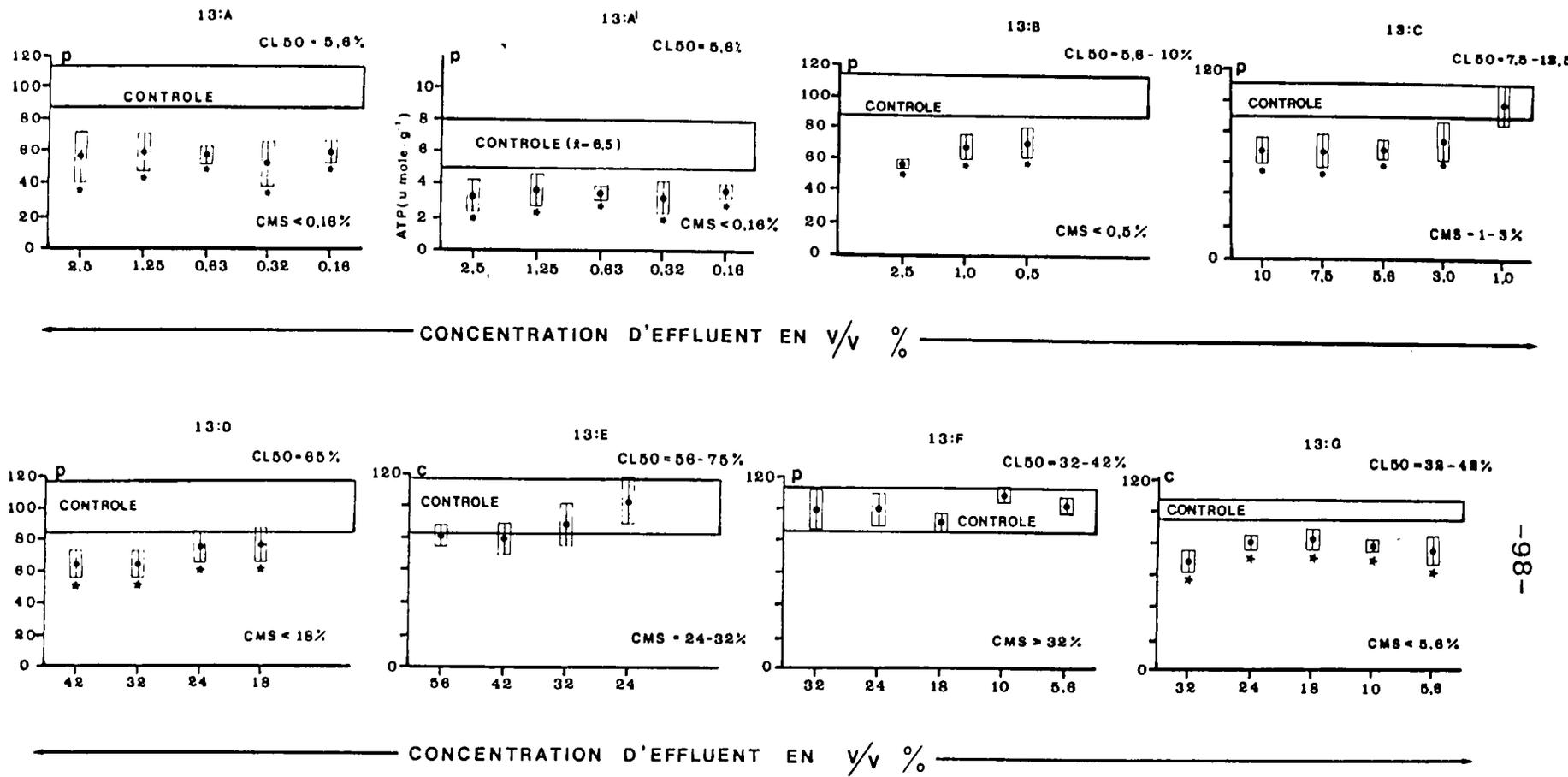
<u>Espèce(s) étudiée(s)</u>	<u>umole ATP.g⁻¹</u>	<u>Remarques</u>	<u>Références</u>
<u>Cyprinus carpio</u> (carpe)	4,12	-	Driedzic et Hochachka, 1976.
<u>Salmo salar</u> (saumon de l'atlantique)	7,76 (n=6)	tacons avec poids moyen de 32,7 g	Haya <u>et al.</u> , 1983b.
<u>Gadus morhua</u> (morue)	5,34	-	Jones et Murray, 1960.
<u>Platichthys flesus</u> (plie)	4,63	-	Jorgensen et Mustafa, 1980.
11 espèces de poissons d'estuaires	3,91 à 6,59	poissons de 4-11cm	Vetter et Hodson, 1982.
<u>Salvelinus fontinalis</u> (omble de fontaine)	6,05 + 0,32 (n=10)	poissons acclimatés 10 semaines à 24°C	Walesby et Johnston, 1980.
<u>Carassius auratus</u> (poisson rouge)	5,46 + 0,56 (n=4)	poissons acclimatés 2 mois à 20°C (poids: 118 + 14,5 g)	Van den Thillart, 1980.

On constate que les teneurs que nous avons obtenues pour le muscle blanc chez la truite arc-en-ciel se retrouvent à l'intérieur de la plage de valeurs rapportée dans la littérature pour un tissu identique chez des espèces ichthyennes différentes. Plus précisément, nos données se rapprochent davantage de celles précisées pour des espèces dont l'activité natatoire est élevée (Par exemple: 7,76 chez Salmo salar selon Haya et al., 1983b; 6,59 chez Peprilus alipidotus selon Vetter et Hodson, 1982 et 6,05 chez Salvelinus fontinalis selon Walesby et Johnston, 1980). Nous en concluons donc que les teneurs rapportées pour la truite arc-en-ciel sont représentatives en fonction de celles existant dans la littérature. Ceci est également un argument d'appui supplémentaire pour la validité de la procédure expérimentale développée à cette fin.

2.3.d Mise en évidence du stress ATP causé par des effluents industriels

La figure 13 illustre le stress causé au niveau de l'ATP chez des poissons exposés à des concentrations sublétales de sept échantillons d'effluents industriels pendant une période de 96 heures. Les valeurs déterminées ou plages de CL50 et de CMS y sont indiquées pour fins de comparaison. Signalons tout d'abord que l'emploi du rapport URL.mg-1 ou de la mesure de l'ATP en umole.g-1 donne une réponse de stress virtuellement identique (figure 13:A et A'), ce qui confirme la relation URL.mg-1 vs umole ATP.g-1 mise en évidence plus tôt (voir 2.3.a). Lors de l'expérimentation, différentes réactions ont été observées allant d'une absence de stress (figure 13:F) jusqu'à l'obtention d'un seuil de stress très élevé (figure 13:A, CMS < 0,16%). Entre ces deux extrêmes, il y a des réactions intermédiaires (figures 13:E, 13:D, 13:G, 13:C et 13:B, par ordre croissant de stress). Dans quatre cas, le seuil de stress n'a pas été atteint aux concentrations sublétales étudiées (figure 13:A, B, D et G). Remarquons aussi qu'à la figure 13:E, certains individus recourent la zone-contrôle et que d'autres restent à l'extérieur de celle-ci. Ainsi, les groupes de poissons (n=5) à certaines concentrations ne sont pas significativement différents du groupe-contrôle bien que certains individus plus susceptibles le soient (par exemple: 2 poissons sur 5 à 56 v/v% et 3 poissons sur 5 à 42 v/v%). Ceci indique qu'un stress est toujours présent à ces concentrations si l'on tient compte de cette variation intra-groupe.

ATP (ur/mg) EXPRIME EN % DES POISSONS - CONTROLES



\star : Significativement différent du contrôle avec une probabilité $\geq 95\%$.
 c: Effluents d'usines de produits chimiques.
 p: Effluents d'usines de pâtes et papiers.

FIGURE 13. STRESS CAUSES PAR SEPT EFFLUENTS INDUSTRIELS AU NIVEAU DE L'ATP CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL.

La plus forte réduction dans les teneurs d'ATP de poissons stressés a été obtenue avec un effluent de pâtes et papiers (figure 13:A) à la concentration 0,3 v/v% où l'on observe jusqu'à 62% de moins d'ATP dans les poissons par rapport aux poissons-contrôles. Cette réduction s'approche vraisemblablement du seuil de viabilité. En effet, Vetter et Hodson (1982), lors d'expériences en condition d'hypoxie avec cinq espèces d'estuaires, ont rapporté des baisses en teneurs d'ATP atteignant 72%. Il est probable qu'une telle réduction extrême soit représentative du seuil de viabilité des espèces étudiées car, selon ces chercheurs, certains poissons ainsi affectés exhibaient des taux de ventilation rapide, une perte d'équilibre et même de conscience. Nous n'avons pas cependant observé de symptômes semblables parmi les poissons qui ont servi à nos expériences.

Les données de CL50 et de CMS pour les sept échantillons d'effluents étudiés ont été converties en unités toxiques ($UT=100\%$ divisé par les valeurs respectives de CL50 et de CMS) et ces dernières sont présentées sous forme de "pyramide de stress" pour faciliter la visualisation des résultats (figure 14). Il est intéressant de noter que les rapports entre unités toxiques sublétales et létales ont tendance à augmenter de façon marquée à mesure que la toxicité létale augmente. Ceci révèle l'importance de l'aspect sublétal qu'il faut considérer lors de l'évaluation des effluents industriels.

EFFLUENTS TESTES (voir figure 13)

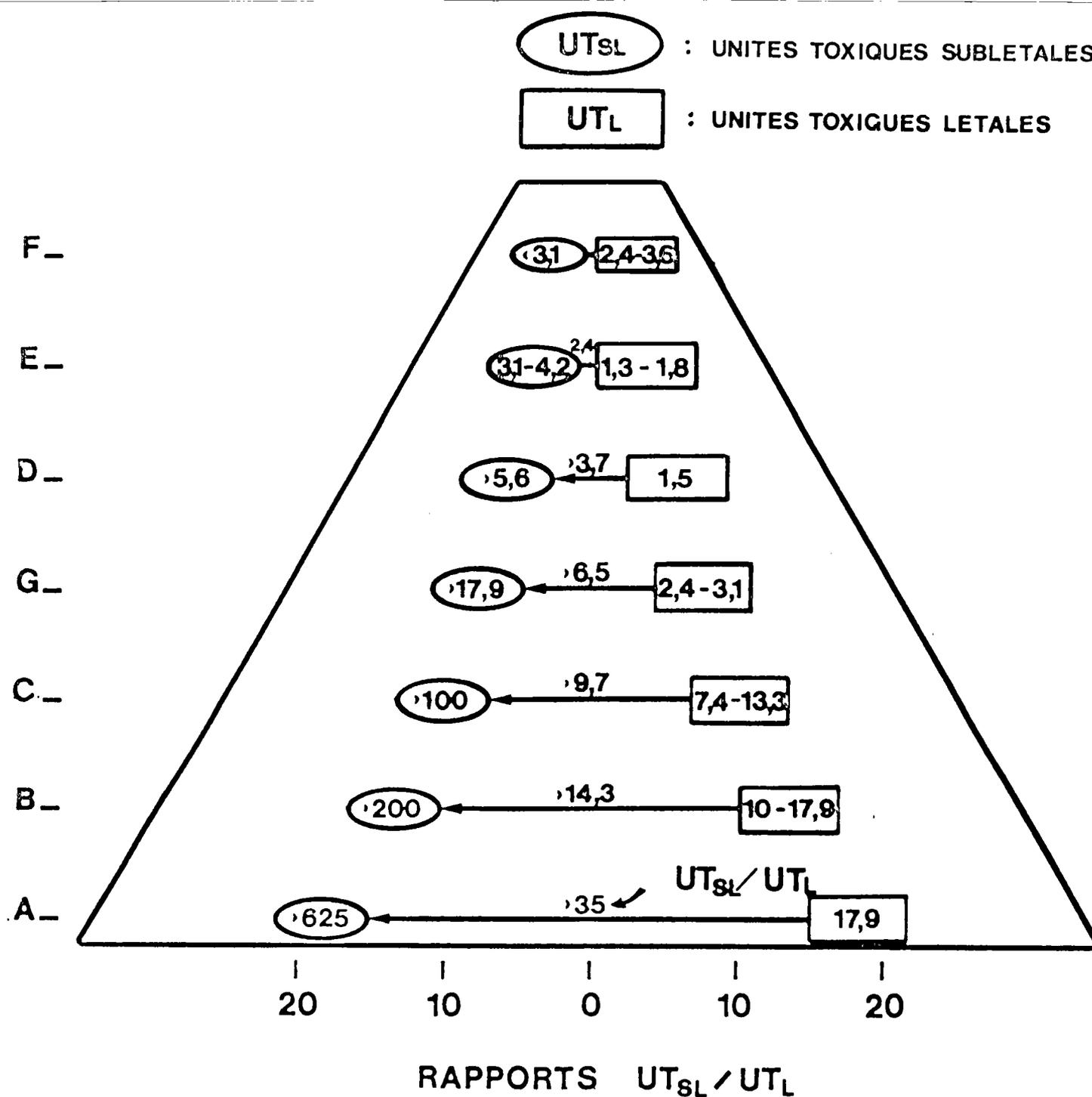


FIGURE 14. PYRAMIDE DE STRESS MONTRANT LES RAPPORTS ENTRE UNITES

Certains travaux récents (Kenaga, 1982; Slooff et Canton, 1983), d'ailleurs, ont cherché à mettre en évidence des relations entre les réponses de toxicité aiguë et chronique de divers organismes dans le but de préciser la valeur prédictive des biotests à court terme pour situer un seuil correspondant de sublétaleté ou de chronicité. L'étude de Kenaga (1982), où 84 produits chimiques (métaux, pesticides et autres produits organiques) furent bioanalysés avec 11 espèces aquatiques, révéla, entre autres, l'information suivante:

- . les rapports de toxicité chronique/toxicité aiguë (TC/TA) présentaient une plage variant de 1 à 18 000;
- . 86% des rapports TC/TA étaient inférieurs à 100;
- . les rapports TC/TA inter-espèces, pour la plupart des produits testés, ne différaient pas par plus d'un ordre de grandeur;
- . les rapports TC/TA étaient inférieurs à 25 pour 93% des produits chimiques organiques, autres que les pesticides: on préconise donc un facteur ≤ 25 afin de prédire la toxicité chronique de ces composés à partir de la toxicité aiguë.

Slooff et Canton (1983), dans leur étude comparative de 126 paires de données de toxicité aiguë et chronique pour des daphnies et des poissons, confirmèrent la constatation de Kenaga (1982) à l'effet que les

rapports TC/TA étaient inférieurs à 100. Nos rapports entre les unités toxiques sublétales et létale pour les sept effluents étudiés varient de 1 à > 35 (figure 14) et se situent donc dans les plages TC/TA rapportés par Kenaga (1982) et Slooff et Canton (1983).

Nous avons en plus effectué une régression linéaire de nos données en comparant les valeurs \log_{10} (UT sublétales) aux valeurs \log_{10} (UT létales). A cette fin, nous avons calculé des moyennes à partir des valeurs exposées à la figure 14 (par exemple, UT sublétales pour l'effluent E= $(3,1 + 4,2):2 = 3,65$, soit 0,56 en \log_{10} ; UT létales de l'effluent D=1,5, soit 0,18 en \log_{10} ; UT sublétales de l'effluent C=100, soit 2,0 en \log_{10}). La linéarité obtenue est illustrée à la figure 15 qui montre une très forte corrélation, laquelle ressort aussi dans le récapitulatif statistique ci-après:

r	r ²	t	Probabilité
0,948	0,90	6,65	99%

Il est donc possible de prédire des seuils de stress théoriques pour des effluents industriels à partir de leur valeur CL50. Cette prédiction d'un seuil de stress pour le poisson est manifestement d'intérêt en vue de la protection de l'environnement aquatique sujet à recevoir divers volumes d'eaux résiduaires. En effet, alors que l'on applique bien souvent des facteurs de sécurité

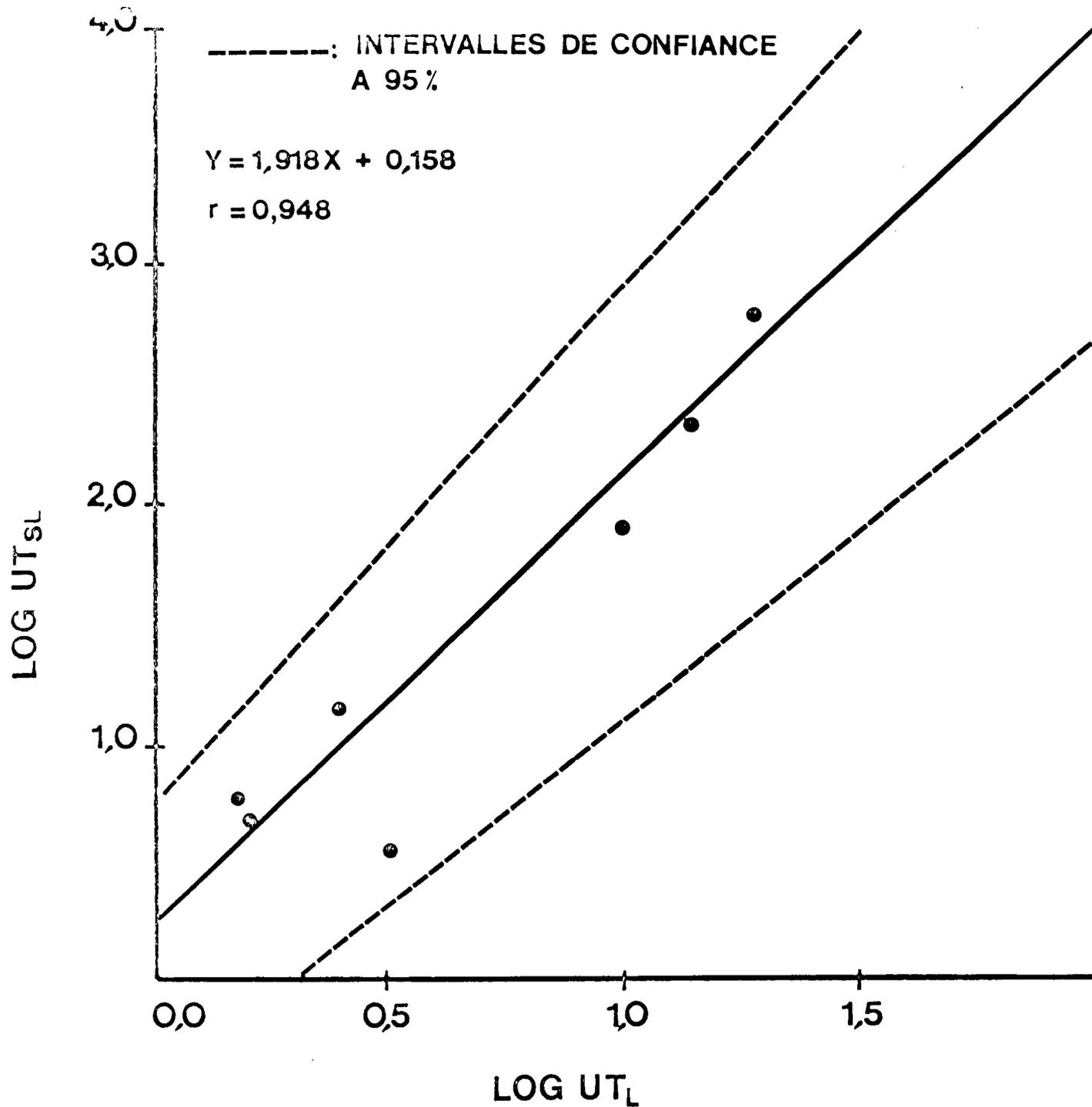


FIGURE 15. CORRELATION ENTRE UNITES TOXIQUES SUBLETALES (UT_{SL}) ET LETALES

subjectifs (i.e. CL50/valeur arbitrairement choisie) pour prédire des concentrations "sans danger" à partir d'une concentration de toxicité létale aiguë (Sprague, 1971), la corrélation suggérée par l'équation de régression établie entre les valeurs CL50 et CMS offre une alternative plus réaliste à prédire effectivement de tels seuils pour les effluents.

Dans cette optique, nos données (figure 15) ont été comparées avec celles des travaux de McLeay et Howard (1977). Ces chercheurs ont étudié les toxicités létale aiguë (CL50-96 heures) et sub-létale aiguë (7 différents paramètres) d'un effluent de fabrication de papier kraft blanchi envers de jeunes saumons coho (Oncorhynchus kisutch). Les principaux résultats de ces travaux sont les suivants:

<u>paramètre écotoxique</u>	<u>résultat</u>
1. <u>toxicité létale aiguë</u> (CL50-96 heures)	15,8 v/v%
2. <u>toxicité sublétale aiguë</u> (CI50*)	
2.1 augmentation du taux de glycémie	0,04 CL50
2.2 diminution du nombre de globules rouges	0,6 CL50
2.3 diminution du nombre de globules blancs	0,1 CL50
2.4 abaissement du seuil critique des températures maximales permettant la survie des poissons	0,3 CL50

<u>paramètre écotoxique</u>	<u>résultat</u>
2.5 réduction de l'oxygène consommé: essais réalisés avec de fortes densités de poisson par volume de solution d'essai	0,9 CL50
2.6 réduction de l'oxygène consommé: essais réalisés avec de faibles densités de poisson par volume de solution d'essai	0,4 CL50
2.7 affaiblissement de capacité natatoire	0,5CL50

* On calcule d'abord la CI50 pour chaque paramètre sublétal: chaque résultat est ensuite exprimé en valeur décimale en fonction de la CL50 de l'effluent (McLeay et Howard, 1977).

Si l'on calcule la CMS à l'aide de notre équation de régression (figure 15) à partir de la CL50 de 15,8 v/v% pour l'effluent étudié par McLeay et Howard (1977), nous obtenons une CMS égale à 0,13 CL50. Celle-ci se situe dans la fourchette des valeurs sublétales (0,04 à 0,9 CL50) rapportées par ces auteurs; de plus, elle s'avère inférieure à 5 de ces 7 paramètres. Ces constatations soulignent que les seuils de sublétalité mis en évidence pour la truite arc-en-ciel à partir de l'ATP sont représentatifs.

De 1975 à 1978, nous avons évalué la toxicité létale aiguë de 194 effluents industriels de la province de Québec avec la truite arc-en-ciel. Il est intéressant d'extraire de ce bilan bio-analytique (Legault, 1979) les valeurs extrêmes de toxicité létale aiguë pour chacun des secteurs industriels considérés et de calculer les valeurs correspondantes de CMS à l'aide de l'équation de régression:

<u>Secteur industriel</u>	<u>Nombre d'effluents évalués</u>	<u>Valeur extrême d'unités toxiques létales(96 heures)</u>	<u>Rapport entre unités toxiques sublétales et létales</u>
Alimentaire	48	200	187
chimique	36	200	187
minier	57	100	98,7
pâtes et papiers	33	100	98,7
textiles	11	50	52,3
raffineries	9	2,6	3,5
	<u>194</u>		

Ce portrait des rapports entre unités toxiques sublétales et létales soutient que l'on retrouve les CMS à une concentration 50 à 200 fois inférieure à la valeur de la CL50 pour les effluents industriels exhibant une flagrante nocivité létale. Ces effluents devraient donc être considérablement dilués si l'on veut éviter un effet de stress envers les truites. Les comparaisons entre les toxicités chronique et létale de Kenaga (1982) et Slooff et Canton (1983), effectuées pour des classes de produits chimiques (voir plus haut), ne peuvent être appliquées qu'avec prudence à nos constatations portant sur la valeur prédictive de seuils de stress à partir de données de létalité aiguë pour des effluents. En effet, à moins d'être assuré que les effets écotoxiques occasionnant la létalité et la sublétalité sont identiques (ce qui est le cas pour un composé chimique mais n'est pas évident pour des effluents complexes), une prédiction d'un seuil de stress à partir d'un résultat de létalité reste, à un certain

degré, aléatoire (Warner, 1964). Nonobstant cette considération, une telle prédiction constitue une source d'information valable afin de situer un seuil relatif de toxicité sublétales aiguë pour le poisson.

2.3.e Conséquence du stress ATP sur le plan environnemental

Afin de mieux comprendre la représentativité écologique des CMS, une expérience a été menée en exposant, à deux composés toxiques, des poissons stressés et d'autres non stressés. Les détails et les résultats de cette expérience figurent au tableau 21. Après 48 heures d'exposition au Cu^{++} et au LSS, le pourcentage de mortalité était plus élevé chez les poissons qui avaient séjourné dans une concentration sublétales d'effluent que chez les poissons non stressés. Les résultats de cette expérience prouvent la plus grande vulnérabilité des poissons stressés lorsqu'ils sont exposés à des toxiques supplémentaires.

2.4 Sommaire

L'utilisation d'indicateurs biochimiques peut s'avérer profitable pour démontrer des perturbations sublétales chez divers organismes exposés à des conditions adverses. Dans ce cadre, on peut exploiter les nucléotides adénylates, ce qui nous a amenés à développer une procédure expérimentale pour détecter le stress ATP à court terme (96 heures) chez la truite arc-en-ciel exposée à des concentrations sublétales d'effluents industriels. La méthode d'extraction

TABLEAU 21. MORTALITÉ COMPARATIVE DE POISSONS PRÉALABLEMENT STRESSÉS ET NON STRESSÉS ET ENSUITE EXPOSÉS A DEUX COMPOSÉS TOXIQUES

Composé Toxique ¹	Conditions expérimentales ²	Mortalité observée en triplicata	% de mortalité
Cu ⁺⁺ (0,3mg.L ⁻¹)	poissons non stressés	3/10, 0/10, 1/10 (=4/30)	23
	poissons stressés	4/10, 9/10, 2/10 (=15/30)	↓ 50
LSS (5,6mg.L ⁻¹)	poissons non stressés	0/10, 0/10, 0/10 (=0/30)	0
	poissons stressés	3/10, 0/10, 5/10 (=8/30)	↓ 27

1. Cu²⁺ (CuSO₄); LSS (Lauryl sodium sulfate): les concentrations sélectionnées sont très proches du seuil de la létalité aiguë pour une exposition de 96 heures.
2. Les poissons non stressés sont restés dans l'eau de dilution pendant 48 heures avant d'être transférés dans des réservoirs d'essai contenant le produit toxique tandis que les poissons stressés ont été d'abord exposés à une concentration sublétales de 2,5% de l'effluent B (voir figure 13) pendant 48 heures avant d'être transférés dans les réservoirs d'essai contenant le produit toxique.

de l'ATP du muscle blanc des truites est relativement simple à entreprendre et fiable. Les teneurs en ATP que l'on retrouve dans le tissu musculaire de la truite arc-en-ciel ($\bar{X} = 6,5 \text{ umole ATP.g}^{-1}$) se comparent avec celles rapportées dans la littérature pour d'autres espèces ichthyennes dont l'activité natatoire est similaire (de 6,05 à 7,76 umole ATP.g⁻¹). Ceci tend à confirmer l'adéquation du rendement de notre technique au DMSO pour extraire l'ATP du muscle blanc. Divers degrés de stress ATP ont été observés en présence de sept effluents industriels et les valeurs représentatives d'un seuil de stress sublétal (CMS=concentration minimale de stress) ont été comparées aux valeurs de létalité aiguë (CL50) correspondantes. En général, les résultats ont indiqué que plus la toxicité létale d'un effluent est forte, plus sa CMS est élevée; ceci soutient que l'on peut prédire une CMS à partir des données CL50 pour des effluents industriels.

2.5 Perspective

Ce travail nous porte à croire que les dosages d'ATP peuvent être utilisés pour signaler des effets sublétaux d'effluents sur les poissons et donc promouvoir la protection environnementale en estimant des concentrations sans danger pour les différentes eaux résiduelles. Nous croyons que ce genre de méthodes a plusieurs applications utiles possibles (tableau 22) pour répondre aux intérêts environnementaux du gouvernement et de l'industrie.

TABLEAU 22. APPLICATIONS POSSIBLES DES TESTS
DE STRESS ADÉNYLATES

- détermination des seuils de stress chez le poisson à court, moyen ou long terme pour diverses substances altérageènes (produits purs, effluents) afin de connaître leur impact potentiel vis à vis des eaux réceptrices;
- expériences d'intoxication additive (exposition simple et multiple de produits chimiques et d'effluents à des organismes) pour évaluer le synergisme, l'antagonisme, etc., afin de mieux comprendre les mécanismes d'actions toxiques et de mieux prévoir les dangers pour l'environnement;
- applications d'un test semblable à divers types d'organismes représentatifs des différents niveaux trophiques du milieu aquatique en utilisant les paramètres adénylates pour évaluer l'état de santé général des populations de l'écosystème aquatique;
- application à des études de terrain comme outil d'évaluation pour un réseau de "biomonitoring" en vue de détecter précocement des problèmes potentiels de contamination.

CHAPITRE 3:

COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ DE TROIS BIOESSAIS D'ÉCOTOXICITÉ

3.1 Contexte

Plusieurs règlements normatifs ont été institués afin d'assurer une qualité d'eau résiduaire acceptable pour divers procédés industriels, notamment pour ceux de l'industrie des pâtes et papiers (Environnement Canada, 1971 et 1972). Dans le cadre de travaux de surveillance relative à ces règlements faisant appel aux bioanalyses avec la truite, il nous a paru intéressant d'ajouter une dimension multi-trophique en y greffant deux autres types de biotests. Dès les débuts de ces travaux en 1976, nous avons adjoint un test avec algues aux essais ichthyens, et, plus tard en 1980, il fut possible de réaliser, en parallèle, un test bactérien lorsque le système Microtox (Compagnie Beckman, U.S.A.), exploitant les propriétés bioluminescentes de Photobacterium phosphoreum, fut commercialement disponible. L'intérêt d'effectuer ces deux bioessais supplémentaires était basé sur les deux questions suivantes:

- . quelle est la sensibilité relative des trois biotests utilisés pour démontrer la toxicité des eaux résiduaires des fabriques de pâtes et papiers?

- . des bioessais rapides et/ou moins onéreux (tests "Microtox" et "algues") que le biotest réglementaire (test avec truite) peuvent-ils servir de tests de dépistage ("screening") pour ce dernier, se substituer à celui-ci et/ou enrichir le portrait écotoxique d'un rejet à l'étude?

En 1981, l'industrie des pâtes et papiers comptait quelques 150 usines à travers le Canada (dont 55 étaient situées au Québec), procurait 83 000 emplois et atteignait une production annuelle d'environ 12 milliards de dollars, ce qui s'avère capital pour l'économie canadienne (Environnement Canada, 1984). Malgré que des fonds importants (plus de 660 millions de dollars durant la période 1969 - 1980) aient été consacrés à la dépollution des rejets de cette industrie, le nombre d'usines conformes aux normes physico-chimiques et toxique établies par la réglementation reste encore minoritaire (Environnement Canada, 1980b). En plus de la toxicité létale aiguë des effluents de cette industrie, plusieurs problèmes d'ordre sublétaux sont dommageables à l'environnement, surtout si l'on considère les volumes d'eaux usées considérables rejetés dans les eaux réceptrices (Walden et Howard, 1977). Couillard (1980) précise les conséquences de ces apports à l'environnement aquatique, lesquelles sont principalement imputables aux facteurs suivants: fortes teneurs de matières en suspension, charge élevée de la demande biochimique en oxygène (réduction de l'oxygène dissous du milieu) et nocivité des acides résineux et dérivés. Différentes recherches réalisées au niveau sublétaux ont confirmé les effets insidieux de cette source industrielle pour les poissons aux plans biochimique, physiologique et éthologique (McLeay et Howard, 1977; Miettinen et al., 1982 et Thellen, 1983). Ces derniers effets n'étant que rarement considérés dans des évaluations routinières d'effluents, une responsabilité énorme se trouve alors liée aux résultats d'un test de létalité, lequel, s'il s'avère négatif, n'assure nullement

l'innocuité envers l'environnement. Afin d'éviter l'écueil d'une fausse interprétation écotoxique, il faut donc avoir recours, dans une évaluation bien souvent ponctuelle et unique d'un effluent, à certains biotests mesurant des paramètres sublétaux.

En 1973, Jones affirmait qu'il était futile de vouloir estimer la nocivité d'effluents de composition complexe et inconnue en réalisant uniquement des analyses chimiques suivies d'une recherche littéraire pour connaître la toxicité de chacune de ses composantes: les phénomènes d'antagonisme et d'additivité notoires pour les effluents et les mélanges de substances chimiques (Anderson, 1981) ne permettent tout simplement pas que soit considérée une telle approche. Face à cela, certains suggèrent que l'estimation de la toxicité déterminée par l'analyse chimique pour les effluents devrait être considérée comme un supplément aux mesures directes de bioessais (Chung et al., 1979) et quelques-uns prétendent même que seule l'évaluation bioanalytique de rejets complexes peut être fiable (Miettinen et al., 1982). Quoiqu'il en soit, le dénominateur commun pour évaluer les effets toxiques des effluents est devenu le biotest appliquant le concept de la concentration létale, c'est à dire, une concentration donnée provoquant 50% de mortalité des organismes exposés pour un temps spécifié. Malgré les lacunes inhérentes à ce test, lorsqu'il est utilisé seul sans un support complémentaire d'autres biotests, il permet néanmoins de présumer la toxicité des effluents, tout en ne constituant qu'une toute première mesure de celle-ci. Les biotests létaux avec truite, et plus généralement avec

salmonidés, sont maintenant bien enracinés dans plusieurs laboratoires de recherche ou de réglementation en Amérique du Nord. La popularité des salmonidés pour la réalisation de tests standardisés afin d'évaluer les dangers de rejets ou de substances toxiques sera vraisemblablement maintenue durant plusieurs années. L'énorme travail déjà fait avec ces poissons dans les domaines pathologique, physiologique et toxicologique argumente aussi en faveur de leur utilité (Wells et Moyses, 1981).

Le test de létalité aiguë avec truite ne peut toutefois suffire à définir adéquatement l'écotoxicité aquatique et l'on a vu apparaître, à partir des années 1970, une abondance de biotests visant à combler cette lacune. Ces essais de "deuxième génération" accordèrent une importance marquée à la détection des effets plus sournois de l'écotoxicité, soit ses conséquences sublétales, chroniques et génotoxiques. Dans ce contexte, on mita beaucoup sur les essais microbiologiques (algues, protozoaires, bactéries, cultures cellulaires, etc.) à cause des avantages offerts par ceux-ci (Maciorowsky et al., 1980). Désireux d'étendre des capacités bioanalytiques, nous avons retenu un test avec algues (Selenastrum capricornutum) et un autre test avec bactéries Photobacterium phosphoreum (système "Microtox") à cette fin.

Les bioessais d'écotoxicité avec algues, plus particulièrement ceux avec Selenastrum capricornutum, ne sont plus à justifier ainsi qu'expliqué précédemment (voir 1.1). Renchérissons,

cependant, en ajoutant que ces organismes sont les piliers de la chaîne trophique aquatique et que la stabilité de la biomasse des niveaux supérieurs à celle-ci dépend de l'équilibre phytoplanctonique (Christensen et Scherfig, 1979). La phytotoxicité (réduction de productivité primaire) est d'ailleurs considérée comme l'un des effets écotoxiques les plus néfastes (Neuhold et Ruggerio, 1976). Ainsi, les algues répondent fort bien aux critères du biomonitoring en tant que palier trophique pour assurer un portrait représentatif de la qualité du milieu (Philipps, 1977). Que ce soit pour détailler des effets stimulateurs ou inhibitifs de l'écotoxicité, les tests avec algues unicellulaires font l'objet d'une utilisation sans cesse croissante, comme l'ont récemment signalé Couture et al., 1981 et Van Coillie et al., 1983b. Leur emploi en tant qu'indicateurs permettant de préciser les répercussions écotoxiques des effluents de l'industrie des pâtes et papiers s'avère très utile (Rainville et al., 1975; Stockner et al., 1975; Moore et Love, 1977; Ghosh et Konar, 1980; Eloranta et Laitinen, 1982; Eloranta et al., 1984).

Le test "Microtox" récemment mis au point par la Compagnie Beckman, lequel exploite les propriétés bioluminescentes de la bactérie marine Photobacterium phosphoreum, s'est révélé un indicateur efficace pour estimer la toxicité aiguë de polluants aquatiques, depuis sa commercialisation en 1979 et l'apparition des premiers articles publiés à ce sujet (Bulich, 1979; Bulich et al., 1981). Conçu pour répondre au besoin grandissant de bioanalyses

rapides et peu coûteuses, le test "Microtox" a fait l'objet de plusieurs applications environnementales, tel que résumé dans le récapitulatif ci-après:

Contexte de l'application

Références

1. Estimations comparatives de la toxicité aiguë:

d'effluents;

Joubert, 1980b.
Bulich et al., 1981.
Bulich, 1982.
Chang et al., 1981.
Dutka et Kwan, 1981.
Qureshi et al., 1982.
Shaul et al., 1983.
Vasseur et al., 1983.

de substances métalliques;

Qureshi et al., 1982.
De Zwart et Slooff, 1983.
Indorato et al., 1983.
McFeters et al., 1983.
Qureshi et al., 1983.

de substances organiques;

Chang et al., 1981.
Curtis et al., 1982.
Neiheisel et al., 1982.
De Zwart et Slooff, 1983.
Indorato et al., 1983.
Mallak et Brunker, 1983.
McFeters et al., 1983.
Qureshi et al., 1983.
Ribo et Kaiser, 1983.

d'eaux de surface et de sédiments;

Blaise, 1982.

de boues de puits de forage de pétrole;

Strosher et al., 1980.

d'eaux de procédés de l'industrie pétrolière;

Lebsack et al., 1981.

d'extraits aqueux de déchets solides;

Microtox Application
Note 105, 1982.

Contexte de l'application (suite)

d'eaux souterraines sujettes à la contamination de déchets toxiques;

de matériels bio-médicaux.

2. Estimation du temps de détoxification de produits chimiques suite à leur épandage dans les sols.
3. Estimation de la toxicité des eaux résiduelles issues des procédés de récupération du pétrole de sables bitumineux, de charbon, etc.
4. Estimation de la toxicité de mycotoxines.
5. Protection des systèmes de traitement biologique.
6. Estimation du potentiel de bioaccumulation autotrophique des effluents selon un test algues (S. capricornutum)/bactéries (P. phosphoreum).

References

Microtox Application Note 106, 1983.

Microtox Application Note M107, 1983.

Matthews, 1984.

Peake et MacLean, 1982.
Delistraty, 1984.

Yates et Porter, 1982 et 1983.

Microtox Application Note M103, 1981.

Blaise et al., 1981.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.a Echantillons

Afin d'assurer sa représentativité, chaque échantillon industriel prélevé (effluent final ou eau de procédés) fut composé pendant une période variant de 8 à 24 heures (en fonction des modalités opérationnelles des usines), selon un protocole d'échantillonnage

convenu par Environnement Canada (Vezeau, 1982). Les quelque 400L recueillis par échantillon étaient acheminés aux laboratoires dans des barils "Rubbermaid" de 60L doublés de sacs en polyéthylène. Reconstitué en laboratoire, l'échantillon était ensuite réparti pour subvenir aux besoins analytiques suivants:

Bioessais avec:	poissons	:	360L
	algues	:	2L
	bactéries	:	1L
Analyses chimiques de support		:	40L

3.2.b Bioessais réalisés

(i) Biotests avec poissons

Des essais de type statique ont été effectués avec la truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri Richardson) selon la procédure gouvernementale en vigueur (Environnement Canada, 1980a).

(ii) Biotests avec algues

La procédure classique utilisée pour l'algue Selenastrum capricornutum est décrite plus haut (voir 1.2 b et c).

(iii) Bioessai avec bactéries (système "Microtox")

Aucun pré-traitement des sous-échantillons destinés au test Microtox n'a eu lieu à l'exception d'un ajustement du pH à 7,0 lorsque celui-ci se situait à l'extérieur de la plage 6-9. Nous nous sommes servis de l'appareil Microtox Modèle 2055 (Toxicity Analyzer System; Beckman Instruments, Inc., Etats-Unis) pour les bioanalyses qui furent réalisées selon le protocole décrit par la firme Beckman (1980). Les points essentiels de ce protocole méritent d'être brièvement présentés:

Principe: le réactif Microtox consiste en une souche génétiquement apparentée à la bactérie marine luminescente Photobacterium phosphoreum. Sa bioluminescence est intimement liée aux divers processus métaboliques cellulaires. Ainsi, l'émission lumineuse est le reflet de la vitalité de cet organisme, laquelle sera atténuée face à une agression toxique quelconque. Le test Microtox permet donc l'obtention d'une mesure relative de la toxicité sub létale aiguë au niveau bactérien.

Mode opératoire: le réactif Microtox lyophilisé est réhydraté et ajouté à différentes dilutions en série de l'échantillon étudié. On fait ensuite des lectures photométriques avec l'appareil Microtox à des temps précis afin de mesurer la réduction de l'émission lumineuse ($\Delta I\%$) des bactéries selon la formule suivante:

$$\Delta I(\%) = \left[\frac{I_0 - I_5}{I_0} \right] \times 100$$

I_0 = intensité lumineuse au temps "0" lorsque le réactif bactérien, le diluant et une concentration quelconque de l'échantillon sont initialement combinés

I_5 = intensité lumineuse après 5 minutes (fin du test).

Expression des résultats: pour exprimer la toxicité, on rapporte une valeur CI50 (5 min, 15°C),

CI50 = la concentration d'un échantillon (v/v%) qui réduit de 50% l'intensité lumineuse normalement produite par le réactif Microtox.

(5 min, 15°C) = durée de l'essai (5 min) pendant lequel le réactif Microtox est exposé aux diverses concentrations de l'échantillon étudié à une température contrôlée de $15 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Calcul des résultats: chaque valeur CI50 est estimée par interpolation graphique sur papier semi logarithmique.

3.2.c Traitement des données

Les résultats de toxicité acquis avec les indicateurs truites, algues et bactéries (Microtox) ont été analysés de diverses façons afin de faire ressortir le plus de tendances possibles:

Comparaison des CI50 et CL50: après avoir rapporté sur graphique la totalité des CI50 et CL50 pour chaque indicateur considéré, il fut possible d'obtenir une première appréciation des résultats en traçant une droite d'égalité (pente=1,0) entre l'abscisse et l'ordonnée, ce qui permit d'observer la distribution des données.

Comparaison toxique versus non-toxique: en assignant un signe négatif pour les valeurs CI50 ou CL50 $> 100\%$ et un signe positif pour celles $< 100\%$, on peut estimer la concordance générale existant dans la réponse toxique entre les trois indicateurs.

Comparaison entre rangs de toxicité: cette méthode (Bulich, 1982) donne un rang de force toxique pour chaque résultat de bioessai selon l'échelle suivante:

<u>CI50 ou CL50</u>	<u>Catégorie</u>	<u>Rang</u>
< 25%	très toxique	1
25-100%	toxique	2
>100%	non-toxique	3

Ceci permet des regroupements comme l'illustre l'exemple ci-après:

<u>CI50</u>	<u>CL50</u>	<u>Rang</u>	<u>Rang</u>	<u>Différence</u>
<u>Microtox</u>	<u>Poisson</u>	<u>Microtox</u>	<u>poisson</u>	<u>entre rangs</u>
2,5	26	1	2	1
>100	80	3	2	1
15	>100	1	3	2
>100	>100	3	3	0

Comparaison entre classes log de toxicité: ce type d'examen a été préconisé par Kenaga (1978) et modifié par Bulich (1982) pour produire un système de répartition des résultats en six classes basé sur des intervalles en demi-log, tel qu'indiqué ci-dessous:

<u>Classe</u>	<u>Intervalle (v/v%) d'effluent où se situe la CI50 ou la CL50</u>	<u>Intervalle log correspondant</u>
1	≤1,0%	≤0,0
2	>1,0 - 3,2%	>0,0 - 0,5
3	>3,2 - 10%	>0,5 - 1,0
4	>10 - 32%	>1,0 - 1,5
5	>32 - 100%	>1,5 - 2,0
6	>100%	>2,0

Un exemple de ce système de classification est précisé

ici:

<u>CI50-Microtox</u>	<u>Classe</u>	<u>CL50-poisson</u>	<u>classe</u>	<u>Différence entre classes</u>
>100%	6	>100%	6	0
30%	4	23%	4	0
62%	5	>100%	6	1
75%	5	3%	2	3

Sensibilité relative des bioindicateurs: nous avons évalué celle-ci pour les effluents étudiés en déterminant:

- 1) une cote (en %) de sensibilité relative par indicateur pour l'ensemble des données;
- 2) une cote (en %) de sensibilité relative à l'intérieur de chaque groupe de deux indicateurs;

- 3) l'écart de toxicité obtenu pour chacun des trois indicateurs;
- 4) la réponse toxique globale générée par indicateur.

Evaluation de la toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers en fonction du type de procédé industriel (sans égard au type de traitement d'effluent): les usines ont été classifiées arbitrairement en six groupes différents selon le degré de similarité du procédé industriel utilisé:

<u>Groupe</u>	<u>Procédés industriels</u>
1	Papier fin
2	Pâte mi-chimique et/ou pâte thermo-chimico-mécanique
3	Pâte Kraft
4	Fibres recyclées avec désencrage
5	Pâte mécanique meule et/ou pâte thermo-mécanique
6	Pâte mécanique meule et bisulfite à bas rendement

Evaluation de la toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers en fonction du type de traitement d'effluent (sans égard au type de procédé industriel): les usines ont été réparties selon les trois catégories de traitement suivantes:

<u>Code</u>	<u>Traitement d'effluent</u>
0	aucun
1	primaire
2	primaire et secondaire (biologique)

3.3 Résultats et discussion

3.3.a Comparaison des réponses toxiques des trois indicateurs exposés aux effluents de l'industrie des pâtes et papiers

Les CI50 et CL50 obtenues ont été comparées alternativement par groupe d'indicateurs: truite versus algues, truite versus Microtox et algues versus Microtox (figure 16). En examinant la position des points sur les figures 16:A, B et C, il est possible de dégager les indications suivantes:

- une forte réponse toxique s'est généralement manifestée lors des biotests réalisés avec les échantillons des industries de pâtes et papiers, ce qui montre leur nocivité évidente, laquelle apparaît multi-trophique (i.e. à large spectre) puisque bactéries, algues et poissons sont affectés en proportions relativement égales (Algues: 54 réponses toxiques positives sur 55 (98%), Microtox: 43 sur 51 (84%), truites: 46 sur 55 (84%);
- la sensibilité relative de chacun des trois indicateurs envers les effluents des pâtes et papiers est différente. En effet, les algues apparaissent plus sensibles que les truites, les bactéries s'avèrent également plus sensibles que les truites et la réponse des algues est nettement plus prononcée que celle des bactéries.

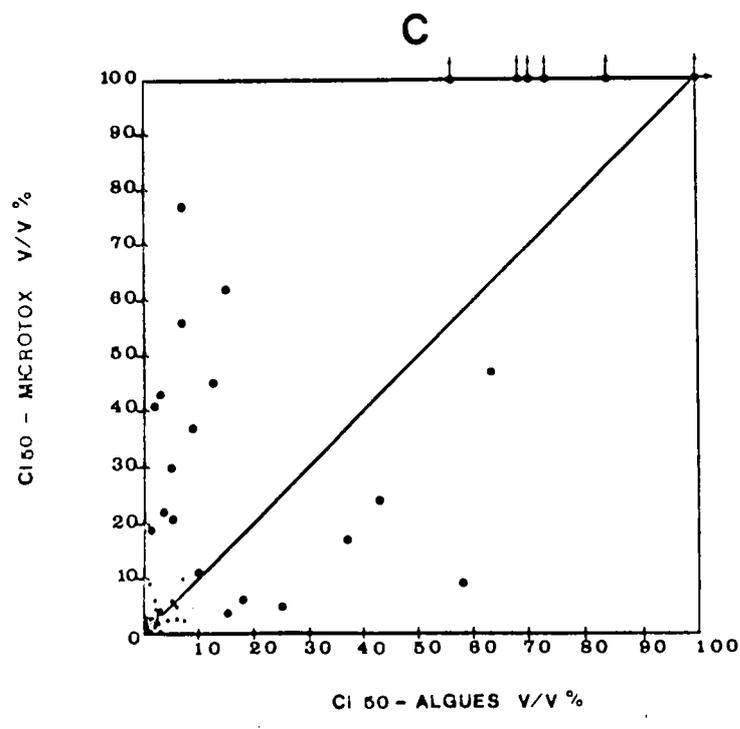
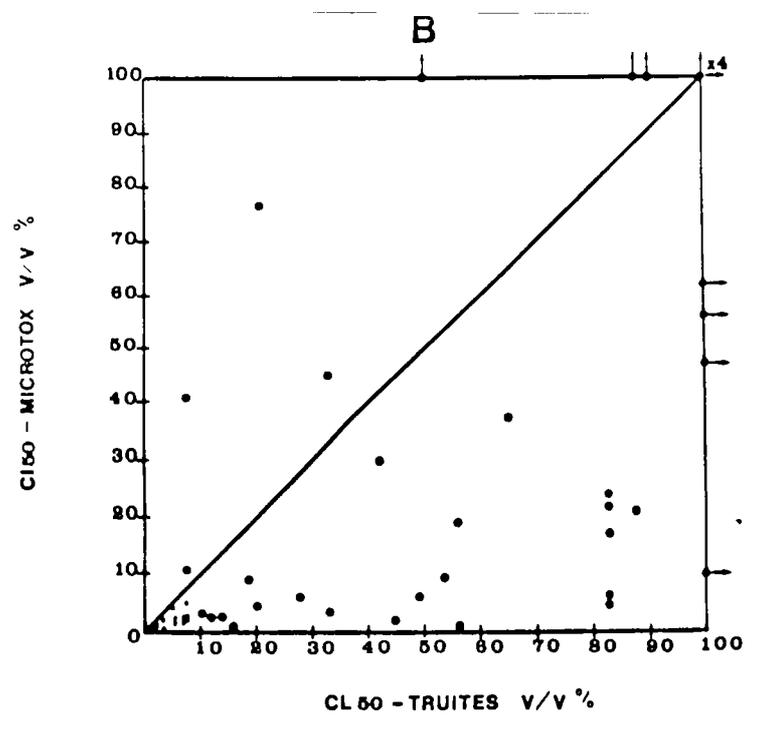
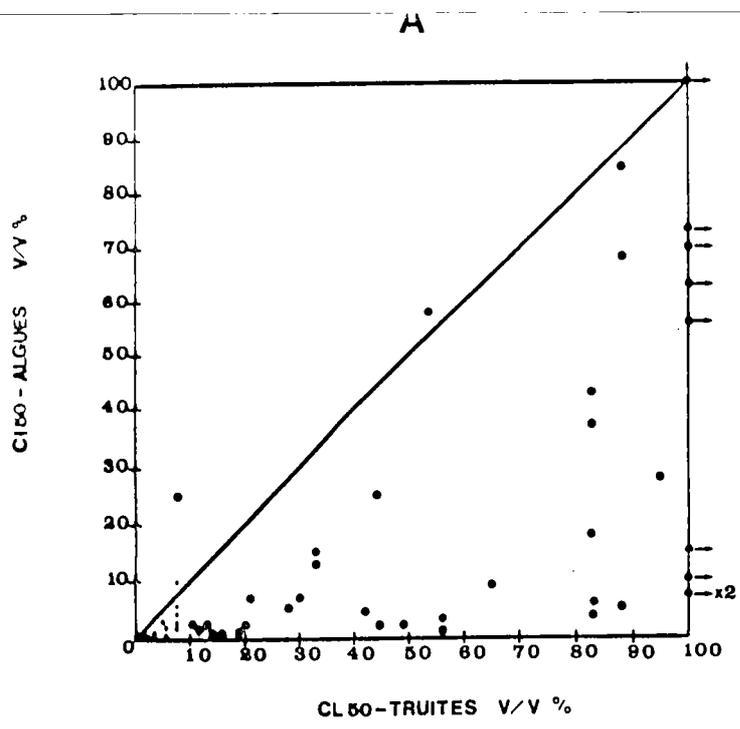


FIGURE 38 COMPARAISON DES RESULTATS CI50 ET CL50 OBTENUS POUR CHAQUE GROUPE D'INDICATEURS EXPOSES AUX

3.3.b Comparaison entre les nombres de réponses toxiques et non-toxiques

La concordance à rapporter la toxicité ou son absence entre les indicateurs fait l'objet des données présentées au tableau 23.

L'examen de ces données nous permet de constater qu'il existe une concordance relativement bonne entre les indicateurs puisque respectivement 85, 84 et 90% des groupes truite/algues, truite/Microtox et algues/Microtox fournissent une réponse toxique ou non-toxique pour ces effluents. On note également que le pourcentage de données comparatives décelant une réponse toxique est élevé, ce qui confirme une fois de plus la nocivité des effluents testés. Les résultats tendent aussi à montrer la fiabilité d'un test algues ou Microtox pour dépister une toxicité relative d'échantillons provenant d'une source industrielle de pâtes et papiers. Sans pouvoir prédire précisément le degré de l'effet toxique vis-à-vis de la truite arc-en-ciel (qui est l'espèce réglementaire pour les bioessais au Canada), il apparaît que les test algues et Microtox peuvent effectivement prévoir une présence ou absence de potentiel toxique envers cette espèce ichthyenne. On remarque, cependant, que même sur ce plan du dépistage, l'emploi exclusif du test algues ou Microtox pourrait sous ou surestimer la toxicité envers la truite. Ainsi, dans 15% des cas, le test algue démontrait une toxicité qui ne se reflétait pas chez la truite alors que, dans 8% des cas, le test Microtox sous ou surestimait une toxicité pour cette espèce (tableau 23:A et B). Si par

TABLEAU 23. COMPARAISON DES RÉPONSES TOXIQUES ET NON-TOXIQUES ENTRE BIOINDICATEURS POUR DES EFFLUENTS DE PATES ET PAPIERS

A) REPOSE TOXIQUE vs NON-TOXIQUE (TRUITE vs ALGUES)

<u>TYPE DE REPOSE</u>	<u>ECHANTILLONS</u>		
	<u>NOMBRE</u>	<u>POURCENTAGE</u>	
T(-) A(-)	1	2%	} 85%
T(+) A(+)	44	83%	
T(+) A(-)	0	0%	
T(-) A(+)	8	15%	
<u>TOTAUX</u>	<u>53</u>	<u>100%</u>	

B) REPOSE TOXIQUE vs NON-TOXIQUE (TRUITE vs MICROTOX)

<u>TYPE DE REPOSE</u>	<u>ECHANTILLONS</u>		
	<u>NOMBRE</u>	<u>POURCENTAGE</u>	
T(-) M(-)	4	8%	} 84%
T(+) M(+)	37	76%	
T(+) M(-)	4	8%	
T(-) M(+)	4	8%	
<u>TOTAUX</u>	<u>49</u>	<u>100%</u>	

C) REPOSE TOXIQUE vs NON-TOXIQUE (ALGUES vs MICROTOX)

<u>TYPE DE REPOSE</u>	<u>ECHANTILLONS</u>		
	<u>NOMBRE</u>	<u>POURCENTAGE</u>	
A(-) M(-)	1	2%	} 90%
A(+) M(+)	43	88%	
A(+) M(-)	5	10%	
A(-) M(+)	0	0%	
<u>TOTAUX</u>	<u>49</u>	<u>100%</u>	

A (ALGUES), M (MICROTOX) T (TRUITE)
ECHANTILLON TOXIQUE (+) ET NON-TOXIQUE(-)

contre on utilisait le test Microtox pour prévoir une toxicité phyto-planctonique pour les effluents étudiés, celle-ci était sous estimée dans 10% des cas (tableau 23:C). Ces constatations soulignent qu'un seul indicateur ne peut jamais parfaitement prévoir ni prédire à lui seul la toxicité susceptible de se manifester chez un autre groupe trophique, ce qui confirme le bien fondé de recourir, autant que possible, à l'utilisation d'une gamme de bioindicateurs pour estimer l'agression toxique.

3.3.c Comparaison entre rangs de toxicité

Nous avons exploité cette méthode de traitement des données afin d'obtenir un portrait additionnel du degré de concordance générale des indicateurs à rapporter la toxicité des effluents, tel qu'exposé au tableau 24.

Ces résultats indiquent les pourcentages de concordance ($\Delta = 0$) et de discordance ($\Delta \geq 1$) pour les données inter-groupes. Nous obtenons un degré de concordance correspondant à des pourcentages de 57, 53 et 65 pour les groupes T-A, T-M et A-M respectivement. Si l'on cumule concordance et faible discordance ($\Delta = 1$), on retrouve la grande majorité des données pour les groupes T-A (93%) et T-M (98%) et leur totalité pour le groupe A-M (100%). Mentionnons que Bulich (1982) employa ce système avec une échelle de toxicité semblable pour comparer les résultats de tests poisson et Microtox réalisés sur 235 échantillons d'effluents divers: 86% des données avaient une

TABLEAU 24. DIFFÉRENCES DE RANGS DE TOXICITÉ POUR
DES EFFLUENTS DE PATES ET PAPIERS

Différences de Rangs* (Δ)	POURCENTAGES DE CONCORDANCE OU DISCORDANCE		
	T-A	T-M	A-M
0	57%	53%	65%
1	36%	45%	35%
2	7%	2%	0%

- T (TRUIITE), A (ALGUES), M (MICROTOX)
- 53, 49 et 49 PAIRES DE DONNÉES COMPARATIVES POUR
T-A, T-M ET A-M RESPECTIVEMENT

* RANG 1: CI ou CL50 < 25% (TRÈS TOXIQUE)
RANG 2: CI ou CL50 ENTRE 25-100% (TOXIQUE)
RANG 3: CI ou CL50 > 100% (NON-TOXIQUE)

différence de rangs de toxicité ≤ 1 . Cette différence a été observée dans 98% des cas pour le groupe T-M lors de notre expérimentation avec les effluents de l'industrie des pâtes et papiers. Il est également intéressant de constater qu'il existe une concordance de toxicité légèrement plus marquée pour la série A-M (65%) comparativement à la série T-M (53%). Cette concordance supérieure des données pour le groupe A-M pourrait être associée au rapprochement phylogénique entre ces deux indicateurs. Un lien entre la réponse toxique et le rapprochement phylogénique des espèces a d'ailleurs été rapporté par Kenaga (1978), Suter (1983) et Leblanc (1984), lesquels ont comparé les réponses toxiques inter-espèces après une exposition aiguë à différentes classes de produits chimiques (pesticides et métaux).

3.3.d Comparaison entre classes log de toxicité

Les résultats obtenus lors de cette comparaison sont présentés au tableau 25.

L'examen de ce tableau permet de constater qu'un pourcentage majoritaire des données inter-indicateurs se trouve à l'intérieur d'un écart-log de 0,5. Ce pourcentage est le plus élevé pour le groupe A-M (82%), ce qui corrobore le lien pré-énoncé (voir 3.3.c) entre la réponse toxique et le rapprochement phylogénique.

La différence log moyenne du groupe T-M (0,51) est quasi-identique à celle (0,50) rapportée par Bulich (1982) qui la

TABLEAU 25. DIFFÉRENCES DE CLASSES LOG. DE TOXICITÉ
POUR DES EFFLUENTS DE PÂTES ET PAPIERS

<u>Différences de classes log.</u>	<u>POURCENTAGES CUMULATIFS DE FRÉQUENCE</u>		
	<u>T-A</u>	<u>T-M</u>	<u>A-M</u>
0,5 LOG	60%	70%	82%
1,0 LOG	83%	92%	94%
1,5 LOG	100%	98%	98%
2,0 LOG		100%	100%
Différence Log. moyenne	0,67	0,51	0,48

- T (TRUITE), A (ALGUES), M (MICROTOX)

- 53, 49 ET 49 PAIRES DE DONNÉES COMPARATIVES POUR
T-A, T-M ET A-M RESPECTIVEMENT

calcula à partir de 235 données comparatives poisson-Microtox pour divers effluents industriels. Mentionnons aussi que, dans son étude comme dans la nôtre, 98% des données poisson-Microtox étaient comprises dans un écart-log de 1,5. Enfin, si l'on se base sur l'hypothèse de Kenaga (1978) stipulant que seul un écart-log > 1 traduit des variations significatives dans la réponse toxique d'une même espèce envers différentes substances, il apparaît que respectivement 83, 92 et 94% des données pour les groupes T-A, T-M et A-M sont assez semblables les unes par rapport aux autres. Ceci permet de croire que, pour des fins de dépistage, les tests Microtox et algues auraient une valeur certaine afin d'évaluer la toxicité d'effluents de l'industrie des pâtes et papiers car ils apportent une réponse toxique d'un ordre de grandeur semblable à celui du biotest truite.

3.3.e Sensibilité relative des bioindicateurs

La sensibilité des biotests avec truite, algues et Microtox vis-à-vis des effluents évalués a été étudiée en regroupant, de quatre façons différentes, les données de toxicité (tableau 26).

L'examen des données présentées au tableau 26 démontre la plus grande sensibilité du biotest avec algues envers les effluents analysés; en effet, la réponse toxique s'accroît selon l'ordre suivant des bioessais: truite $<$ Microtox $<$ algues. En général, la différence de sensibilité la moins marquée s'observe entre les algues et les bactéries du système Microtox. Ainsi que mentionné plus tôt, ceci

TABLEAU 26. SENSIBILITÉ RELATIVE DES 3 BIOINDICATEURS UTILISÉS ENVERS DES EFFLUENTS DE PÂTES ET PAPIERS

A) SENSIBILITÉ RELATIVE DE CHACUN DES TROIS INDICATEURS

<u>Ordre de sensibilité</u>	<u>Nombre d'effluents (pourcentages)</u>		
	<u>BIOTESTS TRUITE (T)</u>	<u>BIOTESTS ALGUES (A)</u>	<u>BIOTESTS MICROTOX (M)</u>
LE PLUS SENSIBLE	1 (2%)	27 (66%)	13 (32%)
MOYENNEMENT SENSIBLE	7 (17%)	12 (29%)	22 (54%)
LE MOINS SENSIBLE	33 (81%)	2 (5%)	6 (14%)
TOTAUX	41 (100%)	41 (100%)	41 (100%)

B) SENSIBILITÉ RELATIVE ENTRE DEUX INDICATEURS

<u>Ordre de sensibilité</u>	<u>Nombre d'effluents (pourcentages)</u>					
	<u>T*</u>	<u>A*</u>	<u>T*</u>	<u>M*</u>	<u>A*</u>	<u>M*</u>
LE PLUS SENSIBLE	3(6%)	49(92%)	8(16%)	37(76%)	33(67%)	13(27%)
EX AEQUO	1(2%)		4(8%)		3(6%)	
TOTAUX	53(100%)		49(100%)		49(100%)	

* T (TRUITE), A (ALGUES), M (MICROTOX)

TABLEAU 26. SENSIBILITÉ RELATIVE DES 3 BIOINDICATEURS UTILISÉS ENVERS DES EFFLUENTS DE PATES ET PAPIERS (suite)

C) ÉCART DE TOXICITÉ OBTENU POUR CHACUN DES TROIS INDICATEURS

<u>INDICATEUR</u>	<u>NOMBRE D'EFFLUENTS</u>	<u>ÉCART DES CL50 OU CI50 (UNITÉS TOXIQUES)</u>		<u>FACTEUR*</u>
TRUITE	55	1,7 à	> 100 (< 1 à 59)	—
MICROTOX	51	0,4 à	> 100 (< 1 à 250)	4,25 x
ALGUES	55	0,1 à	> 100 (< 1 à 1000)	4,0x(17x)**

* Facteur de différence de sensibilité entre deux indicateurs adjacents en considérant les réponses toxiques maximales.

** Facteur cumulatif de différence de sensibilité entre biotests algues et truites en considérant les réponses toxiques maximales.

D) RÉPONSE TOXIQUE GLOBALE GÉNÉRÉE PAR CHACUN DES TROIS INDICATEURS EXPOSÉS A 47 EFFLUENTS

<u>INDICATEUR</u>	<u>UNITÉS TOXIQUES</u>	<u>FACTEUR*</u>
TRUITE	400	—
MICROTOX	1 600	4,0x
ALGUES	2 900	1,8(7,3x)**

* Multiple d'augmentation de la toxicité globale entre indicateurs adjacents.

** Multiplicité cumulative de la toxicité globale entre biotests algues et truite.

peut être lié au rapprochement phylogénique existant entre ces deux indicateurs. Ceux-ci sont également représentatifs du même palier écotoxique (i.e. sublétalité), ce qui leur confère une affinité additionnelle, alors que le biotest poisson s'identifie avec le niveau létal. La réponse toxique globale de chacun des trois indicateurs confirme d'ailleurs cette nette différence existant, d'une part, entre l'étage de la létalité (truite: total de 400 unités toxiques) et celui de la sublétalité (Microtox et algues: total de 1 600 et 2 900 unités toxiques).

3.3.f Evaluation de la toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers en fonction du type de procédé industriel

A partir de nos résultats de toxicité inter-indicateurs, nous avons voulu examiner la nocivité des effluents en fonction du procédé industriel utilisé pour la production de pâtes et papier. Les résultats ont été arrangés en ordre de toxicité croissante, comme l'expose le tableau 27. Afin d'en faciliter la visualisation, ils ont également été transposés à la figure 17.

Il appert que le procédé 1 se révèle le moins toxique pour les trois indicateurs, tandis que le procédé 6 s'avère le plus toxique envers ceux-ci. Entre ces deux extrêmes, les réponses toxiques des algues et du Microtox varient.

TABLEAU 27. TOXICITÉ DES EFFLUENTS DE PÂTES ET PAPIERS
EN FONCTION DU TYPE DE PROCÉDÉ INDUSTRIEL

PROCÉDÉ*	NOMBRE D'EFFLUENTS	UNITÉS TOXIQUES/EFFLUENT			SOMME DES UNITÉS TOXIQUES PAR EFFLUENT
		T**	A**	M**	
1	3 dont 2	1,3	5,7	2,0	8
2	7 dont 6	1,7	22	13	36,7
3	14 dont 12	2,1	9,3	29	40,4
4	3 dont 2	5,4	35	2,9	43,3
5	6 dont 4	9,7	22	22	53,7
6	16 dont 14	11	110	48	169
	Total	31,2	204	115,9	

* Procédés: 1, Papier fin; 2, Pâte mi-chimique 3, Pâte Kraft; 4, Fibres recyclées avec désencrage; 5, PMM (Pâte mécanique meule), PMR (Pâte mécanique raffinée) et/ou PTM (Pâte thermomécanique); 6, PMM et bisulfite à bas rendement.

** T (TRUITE), A (ALGUES), M (MICROTOX)

UNITES TOXIQUES MOYENNES

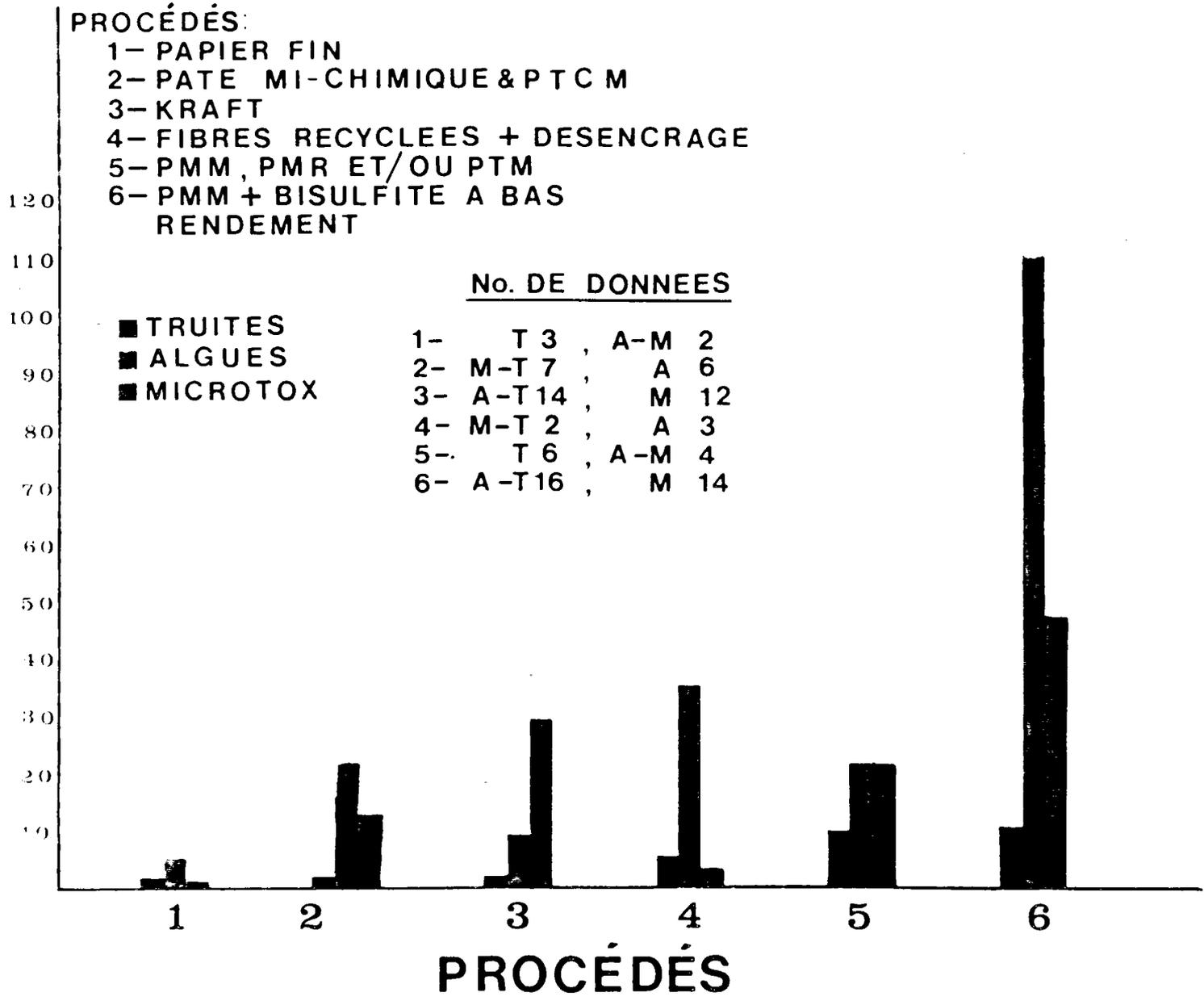


FIGURE 17. TOXICITE DES EFFLUENTS DE PATES ET PAPIERS EN FONCTION DU TYPE DE PROCEDE SANS EGARD AU TRAITEMENT DE L'EFFLUENT.

Parmi les trois bioindicateurs, les algues sont apparues comme les plus sensibles, sauf pour le procédé 3 où le réactif Microtox apporte la plus forte réponse toxique.

Bien que la différence de nocivité des effluents en fonction du procédé industriel soit encore mal connue, les biotests de toxicité s'avèrent des outils sensibles pour la mettre en évidence.

3.3.g Evaluation de la toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers en fonction du type de traitement des rejets

Nous avons cherché également à évaluer la toxicité des effluents selon le degré de traitement qui leur était accordé. Le tableau 28 montre le bilan de cette évaluation.

La conclusion principale du tableau 28 est claire: les trois bioindicateurs montrent une diminution de toxicité en fonction du traitement apporté à l'effluent. Cette constatation soutient également l'opinion que le traitement biologique constitue un des moyens efficaces pour diminuer la charge toxique des effluents de pâtes et papiers (Rainville et al., 1975; Beak Consultants, 1978; Hutchins, 1979; Moilanen et al., 1980; Besner et Van Coillie, 1981).

Lors de l'évaluation, on remarqua aussi que les indicateurs sublétaux (algues et Microtox) révélaient les différences de toxicité avec une acuité plus nette que le biotest avec la truite.

TABLEAU 28. TOXICITÉ DES EFFLUENTS DE PÂTES ET PAPIERS EN
FONCTION DU TYPE DE TRAITEMENT DES REJETS

<u>TRAITEMENT*</u>	<u>NOMBRE D'EFFLUENTS</u>	<u>UNITÉS TOXIQUES/EFFLUENT</u>			<u>SOMME DES UNITÉS TOXI- QUES PAR EFFLUENT</u>
		<u>T**</u>	<u>A**</u>	<u>M**</u>	
0	21 dont 19	9,9	89	40	138,9
1	21 dont 19 dont 16	3,5	20	28	51,5
2	6 dont 5	1,0	2,4	1,1	4,5
Total		14,4	111,4	69,1	

* 0, aucun traitement; 1, traitement primaire et 2, traitement secondaire biologique

**T (TRUITE), A (ALGUE), M (MICROTOX)

Parmi les effluents étudiés, un seul possédait un système de traitement normatif considéré comme étant le meilleur disponible en fonction de l'état de la connaissance technologique actuelle (BPT "Best Practicable Technology: Environnement Canada, 1984). Tel qu'indiqué au tableau 29 dans le relevé des résultats utilisés dans ce chapitre, la toxicité de cet effluent était non décelable pour les truites et le système Microtox et se révélait très faible pour les algues (CI50: 56% et 70%).

Notons finalement que les effluents traités de la même façon et issus du même type de procédé industriel avaient une toxicité qui changeait relativement peu lorsqu'ils étaient échantillonnés à des dates différentes (tableau 29)*. Ceci traduit une constance pour la toxicité des effluents industriels de pâtes et papiers et rejoint des observations analogues faites par Loch et McLeod (1974).

* Il s'agit de l'effluent codé 540, 543, 566 et 567 (donc, échantillonné à 4 reprises), procédé: 2, traitement: 2 et de l'effluent codé 557, 589 et 627 (échantillonné à 3 reprises), procédé: 2, traitement: 1.

du st	Date de l'échantillonnage	Description de l'effluent	Truite CI50-96 heures	Algues CI50-8 jours	Microtox CI50-5 mi- nutes	Type de procédé*(1-6), Traitement**(0-2)
49	06/07/76	Final	44	25	—	6* - 0**
51	08/07/76	Final	30	7	—	6 - 1
54	21/07/76	Final	90-100	28	—	3 - 1
55	22/07/76	Final	90-100	28	—	3 - 1
61	04/08/76	Final	12	2	—	4 - 0
83	03/09/76	Final	>100	10	—	1 - 1
40	12/08/80	Final	>100	15	62	2 - 2
42	16/09/80	Final	50	—	>100	1 - 1
43	08/10/80	Final	80-100	—	>100	2 - 2
49	13/05/81	Bassin de sédimentation	>100	7	56	Atypique
50	21/05/81	Final	56	3	0,4	3 - 1
51	02/06/81	Final	>100	73	>100	1 - 0
52	10/06/81	Final	>100	56	>100	3 - 2 (BPT)***
53	11/06/81	Final	>100	70	>100	3 - 2 (BPT)
54	18/06/81	Final	5,6-10	<2	41	6 - 0
55	09/07/81	Final	>100	>100	>100	3 - 1
56	16/07/81	Final	13,5-24	1	9	6 - 0
57	22/07/81	Final	24-32	5	6	2 - 1
58	22/07/81	Points C, D	1-2,4	0,3	0,6	Eaux de procédé
59	24/07/81	Eaux blanches	--	0,1	2	Eaux de procédé
66	12/08/81	Final (Point 1D)	75-100	68	>100	2 - 2

TABLEAU 29. RELEVÉ DES EFFLUENTS DE PATES ET PAPIERS
UTILISÉS POUR L'ÉTUDE ET DE LEURS CI50 ET CL50 (suite)

No du test	Date de l'échantillonnage	Description de l'effluent	Truite CL50-96 heures	Algues CI50-8 jours	Microtox CI50-5 mi- nutes	Type de procédé*(1-6) Traitement**(0-2)
567	12/08/81	Final (Point 2D)	75-100	84	>100	2 - 2
589	23/09/81	Final (Point A)	42-56	2	6	2 - 1
590	23/09/81	Nouveau procédé (Point F)	2	0,1-1	1	Eaux de procédé
599	25/10/81	Final	75-100	5	21	Atypique
606	18/11/81	Final (Point A)	56	1	19	Atypique
609	24/11/81	Final (Point C)	--	3	43	4 - 1
614	04/12/81	Final (Point C)	42	3-6	30	4 - 1
618	17/06/82	Final	65-100	18	6,2	3 - 0
626	17/06/82	Final	65-100	3,6	22	3 - 0
627	07/07/82	Final (Point A)	24-65	2	2	2 - 1
628	07/07/82	Eaux blanches	1-5,6	1	2	Eaux de procédé
631	14/07/82	Final	5	3,0	4,3	Atypique
633	21/07/82	Final (Point A)	10-13,5	2,1	2,6	6 - 0
634	28/07/82	Final	65-100	37	17	3 - 0
635	28/07/82	Final	65-100	43	24	3 - 0
637	04/08/82	Final (Kraft Point A)	5,6-10	10	11	3 - 1
638	04/08/82	Final (Point C)	24-42	15	3,5	3 - 1
639	12/08/82	Final	5,6-10	5,9	2,8	5 - 0
640	19/08/82	Final	5,6-10	4,2	2,7	6 - 0
641	19/08/82	Final (Point C)	5,6	0,57	2,1	6 - 0
642	15/09/82	Final	10-18	0,51	2,5	6 - 0

TABLEAU 29. RÉLEVÉ DES EFFLUENTS DE PÂTES ET PAPIERS
UTILISÉS POUR L'ÉTUDE ET DE LEURS CI50 ET CL50 (fin)

Poste	Date de l'échantillonnage	Description de l'effluent	Truite CL50-96 heures	Algues CI50-8 jours	Microtox CI50-5 minutes	Type de procédé*(1-6) Traitement**(0-2)
343	27/09/82	Final	>100	63	47	Atypique
344	27/10/82	Final	>100	7	10	3 - 1
349	09/11/82	Final	42-65	58	9,3	6 - 0
350	09/11/82	Final	13,5-18	0,16	0,74	6 - 0
355	24/11/82	Final	5,6-10	7,3	2,2	6 - 0
356	24/11/82	Final	1-5,6	0,30	0,52	6 - 0
357	01/12/82	Final	20	2,1	4,4	6 - 1
359	17/06/82	Final	18-24	7	77	5 - 1
662	28/07/83	Final	65	9	37	6 - 1
663	12/08/83	Final	7,5-13,5	1,5-3	3	6 - 0
664	12/08/83	Ecorçage	7,5	25	5	Eaux de procédé
665	18/08/83	Final	5,6-10	1,5-3	2	6 - 0
666	29/08/83	Final	5,6	2	2	5 - 0
668	14/11/83	Final	65-100	6	5	3 - 1
669	14/11/83	Final	24-42	12,5	45	5 - 1

Types de procédés industriels: 1, Papier fin; 2, Pâte mi-chimique; 3, Pâte Kraft; 4, Fibres recyclées avec désencrage; 5, Pâte mécanique meule (PMM), Pâte mécanique raffinée (PMR) et/ou Pâte thermo-mécanique (PTM); 6, PMM et bisulfite à bas rendement.

* Traitement de l'effluent: 0, aucun traitement; 1, traitement primaire; 2, traitement secondaire biologique.

** BPT: Traitement fait selon le "Best Practicable Technology".

3.4 Sommaire

La toxicité d'une cinquantaine d'effluents provenant de fabriques de pâtes et papiers sises dans la province de Québec (Canada) a été évaluée en réalisant concurremment des bioessais à trois niveaux trophiques. Les biotests ont été entrepris avec la truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri), l'algue Selenastrum capricornutum et le réactif bactérien (Photobacterium phosphoreum) du système Microtox.

Les résultats des 3 séries de bioessais présentaient une excellente concordance générale entre eux et ont mis en évidence une nocivité marquée chez la plupart de ces rejets. Ils ont également explicité la valeur d'emploi des tests avec algues et/ou Microtox, pour fins de dépistage, afin de situer le degré de toxicité des effluents de l'industrie des pâtes et papiers. En outre, lorsque ces deux biotests sont réalisés en support au test de toxicité létale aiguë avec la truite, ils améliorent la caractérisation écotoxique car ils y apportent une dimension sublétales à deux autres étages trophiques.

Parmi les trois bioindicateurs, les algues se sont montrées les plus sensibles, suivies des bactéries du système Microtox et, enfin, des truites. La plus grande sensibilité des indicateurs microbiologiques s'explique entre autres par le fait que ceux-ci expriment leur réponse toxique au niveau sublétales par rapport aux

poissons utilisés pour des réponses de létalité. On constata aussi que la meilleure concordance de sensibilité se situait entre algues et bactéries Microtox; ceci serait partiellement imputable au rapprochement phylogénique existant entre ces deux indicateurs.

Les biotests utilisés ont aussi été très appropriés pour discerner la toxicité des effluents en fonction du type de procédé industriel employé et du type de traitement qui leur est apporté. A cet égard, les bioindicateurs s'avèrent de précieux outils de gestion qui se révèlent essentiels pour l'évaluation de rejets complexes du genre étudié.

3.5 Perspective

Pour tester l'écotoxicité d'un rejet en milieu aquatique, les gestionnaires de l'environnement souhaitent des bioessais qui répondent aux exigences suivantes: représentativité des bioindicateurs, sensibilité, simplicité, rapidité, "reproductibilité" et coût raisonnable. Aucun bioessai ne peut satisfaire concomitamment à toutes ces exigences et on préconise de plus en plus la combinaison de quelques bioessais de type différent pour y répondre.

Le choix de quelques bioessais complémentaires favorise aussi une évaluation plus intégrée de l'écotoxicité d'un rejet car on peut alors obtenir des données sur les aspects suivants:

- . effets sur plusieurs étages écologiques (producteurs, micro ou macro-consommateurs, transformateurs)
- . toxicité à différents paliers (létal, sublétal aigu ou sub-aigu, chronique)
- . concordance des réponses toxiques
- . rapidité des effets

INTEGRATION

Les agences de protection de l'environnement doivent fonctionner sur les plans cognitif, curatif et préventif afin d'atteindre leurs objectifs; dans cet ensemble, la fonction cognitive est un pré-requis essentiel qui conditionne le succès des deux autres fonctions. Il est donc impératif que l'on dispose de méthodes fiables et sensibles pour évaluer les différents rejets susceptibles de perturber l'environnement. Le développement des bioessais dont il est question dans cette thèse a été réalisé en ce sens. Leur utilité ne fait nul doute dans le cadre d'une démarche intégrée visant à démasquer le potentiel d'impact d'eaux résiduaires, où chaque biotest contribuerait à élucider le "puzzle écotoxique" de ces eaux.

Une telle démarche intégrée peut être articulée selon trois niveaux de protection environnementale (tableau 30).

Pour représenter l'évolution de l'écotoxicité entre ces trois niveaux, nous avons conceptualisé une "spirale de l'écotoxicité" (figure 18).

Cette spirale, qui contient cinq bandes de tons distincts représentant les cinq plus importants paliers trophiques de l'écosystème aquatique (i.e. transformateurs, producteurs, consommateurs primaires, consommateurs secondaires et consommateurs ultimes),

TABLEAU 30. NIVEAUX DE PROTECTION ENVIRONNEMENTALE POUR L'ÉCOTOXICITÉ AQUATIQUE

NIVEAUX CONSIDÉRÉS	DÉRÈGLEMENTS		IMPACTS ÉCOTOXIQUES	
	CAUSES	CONSEQUENCES	DIMENSIONS	PORTÉES
Premier	Présence excessive de pollution (contaminants, agents pathogènes, conditions physico-chimiques altérées, etc)	Disparition quasi-totale des composantes biotiques du milieu à l'exception d'espèces très tolérantes (certaines bactéries, par exemple)	Toxicité létale (aiguë à sub-aiguë)	Locale
Deuxième	Présence sublétale de pollution amenant un potentiel écotoxique et un déséquilibre dans le milieu aquatique	Débalancement de la diversité biologique et stress physiologiques à court et/ou moyen terme	Toxicité sublétale (aiguë à sub-aiguë) résultant d'effets directs (à court et/à moyen terme) facilement mesurables	Régionale
Troisième	Toxicité insidieuse qui n'est guère assimilable par le milieu récepteur et agit par des mécanismes de bioaccumulation et/ou mutagénicité	Réduction dans la survie à long terme (taux de croissance et de la reproduction des espèces), déstabilisation des structures et fonctions des écosystèmes aquatiques avec possibilité de récurrence d'effets létaux, induction de problèmes génotoxiques.	Toxicité chronique résultant d'effets insidieux à long terme relativement difficiles à quantifier	Globale

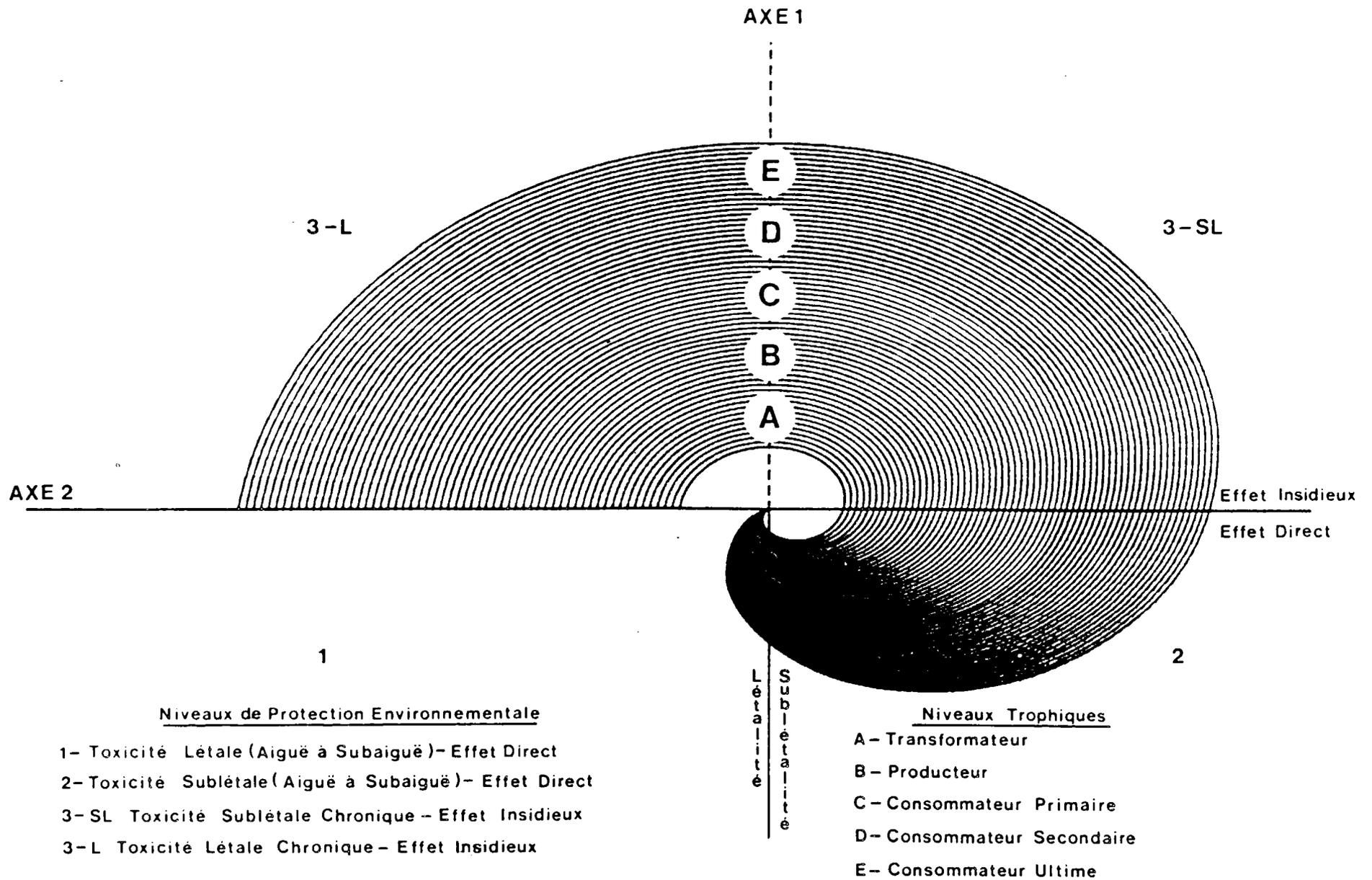


FIGURE 18. SPIRALE DE L'ECOTOXICITE .

s'ouvre progressivement dans quatre secteurs adjacents séparés par deux axes perpendiculaires. L'axe vertical sépare les effets toxiques létaux et sublétaux tandis que l'axe horizontal distingue les effets toxiques directs et insidieux (chroniques). Le secteur 1 correspond au premier niveau de protection environnementale qui doit être envisagé afin d'évaluer les effets écotoxiques létaux ayant un impact local flagrant. Le secteur 2 équivaut au deuxième niveau de protection environnementale devant être considéré afin d'estimer l'écotoxicité sublétale à court ou à moyen terme dont l'impact est souvent régional. Le secteur 3 représente le troisième niveau de protection environnementale dont il faut tenir compte car sa toxicité chronique a généralement une grande portée et nécessite une étude exhaustive avant toute recommandation d'une action corrective. La toxicité chronique peut évoluer d'une dimension sublétale (secteur 3SL) à létale (secteur 3L) par des mécanismes de bioaccumulation ou de génotoxicité. Ainsi, on peut concevoir qu'en s'écartant davantage de son point de départ, la spirale de l'écotoxicité concerne tout d'abord des effets létaux, lesquels produisent par dilution différents effets sublétaux. Ensuite, alimentée par des mécanismes de bioaccumulation et de génotoxicité, la toxicité sublétale entraîne des effets chroniques; ceux-ci peuvent progressivement induire une toxicité létale, ce qui complète ainsi un cercle évolutif de la toxicité.

Le concept projeté par la spirale d'écotoxicité soutient, de toute évidence, que le devenir des molécules toxiques libérées dans l'environnement est beaucoup trop complexe pour limiter

la responsabilité de toute évaluation environnementale à l'analyse chimique comme le font les stratégies classiques. Au contraire, une alliance de données biologiques et chimiques s'avère indispensable pour mettre en évidence les effets (déterminés avec des bioessais) déstabilisateurs de l'écotoxicité et pour en identifier les causes (précisées par les analyses chimiques). Il n'est d'ailleurs plus possible d'ignorer ou de contester l'utilisation d'organismes biologiques pour évaluer l'ampleur des dommages faits à l'environnement puisque ce sont eux qui y sont les plus exposés et les mieux qualifiés pour indiquer des perturbations potentielles aux écosystèmes. En outre, il s'avère de plus en plus évident que l'analyse chimique augmente en valeur lorsqu'elle est associée à des bioanalyses dans une évaluation écotoxicologique. En revanche, lorsqu'elle est réalisée seule, la paramétrie chimique n'a qu'une valeur relative pour la prédiction écotoxique vu qu'elle ne peut préciser la biodisponibilité des nombreux polluants, ni leur spéciation écotoxique (par exemple, la différence d'effets de Cu^{++} sous forme de sulfates ou carbonates), ni leurs interactions (synergisme ou antagonisme), ni leur durée d'effets en fonction de la bioaccumulation ou de la biodégradation. D'autres limitations inhérentes à l'utilisation exclusive de la chimie sont le manque de sensibilité à détecter certains polluants, le coût prohibitif de plusieurs types d'analyses ainsi que la virtuelle impossibilité de pouvoir identifier la totalité des molécules présentes dans un échantillon.

On assiste, d'ailleurs, à un engouement spectaculaire de l'importance des biotests pour le domaine aquatique, comme l'ont récemment témoigné deux symposiums internationaux (Leclerc et Dive, 1982; Persoone et al., 1984), ainsi que des récents développements en biotechnologie environnementale (Roque, 1984; Van Coillie et al., 1984b).

L'importance d'évaluer l'impact de sources polluantes à un deuxième (sublétalité) et à un troisième niveau (toxicité chronique) de protection environnementale devient essentielle car l'écotoxicité peut perturber la fonction d'un écosystème sans tuer des organismes qui en composent la structure (Cairns, 1980) et occasionner ensuite progressivement des disparitions d'espèces lors d'une exposition prolongée d'une substance ou source polluante quelconque (Cairns et al., 1981). L'homme, à plus ou moins long terme, risque de perdre gros avec les effets insidieux de l'écotoxicité car, comme le déclare Ramade (1979), la dispersion de substances toxiques dans le milieu naturel peut, d'une part, occasionner la disparition de ressources naturelles importantes sur le plan alimentaire, et d'autre part, contaminer la pyramide écologique dont nous représentons le sommet. Ces quelques considérations démontrent bien la nécessité d'évaluer l'écotoxicité des rejets à des niveaux autres que celui de la létalité et montrent le rôle primordial des biotests dans un tel but.

Il est cependant virtuellement impossible de prévoir toutes les conséquences, à court et long terme, de l'introduction

d'une source polluante dans l'environnement. Une méthode d'analyse intégrée permet, toutefois, de réduire une grande part d'incertitude à cet égard.

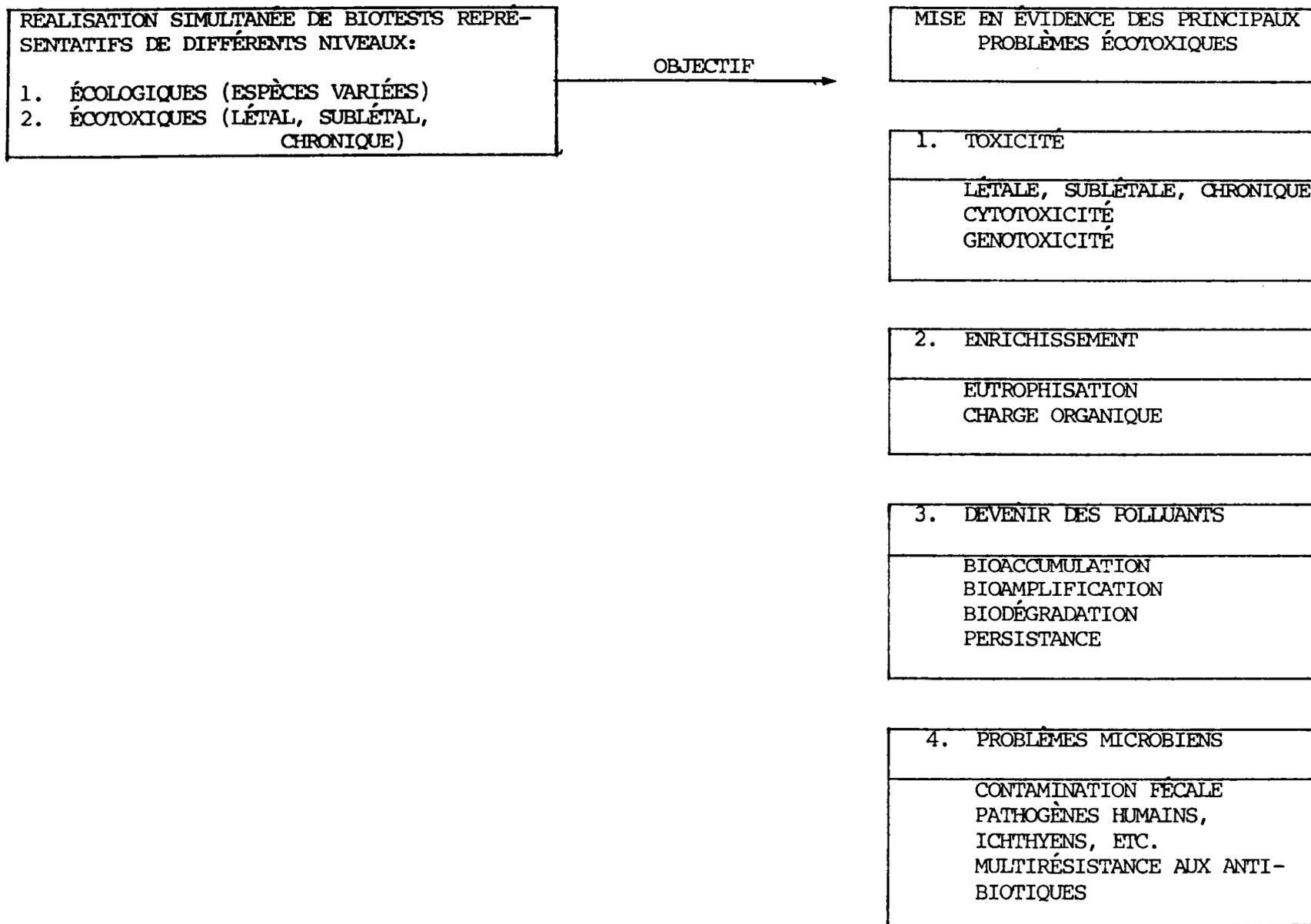
La structure et la marche à suivre des méthodes pour une analyse globale de toxicité diffèrent (Lloyd, 1980b; Cairns, 1983b; Chapman et Long, 1983). Parmi les méthodes les plus intéressantes, l'une emprunte une démarche séquentielle et l'autre préfère l'exécution simultanée de plusieurs types de bioessais. La méthode dite "séquentielle" ou "par étapes" emploie au départ des biotests de dépistage simples et peu coûteux suivis, si nécessaire, d'essais biologiques de complexité croissante (Cairns, 1983b). Il faut décider à chaque étape s'il est nécessaire de poursuivre l'analyse par des biotests additionnels. Malgré la valeur évidente d'une telle approche, particulièrement pour l'évaluation de la toxicité de substances pures, elle ne constitue pas la meilleure méthode d'analyse de l'écotoxicité de rejets contenant plusieurs substances différentes. Les principales failles de la méthode séquentielle sont les suivantes:

- . On assume, sans preuve scientifique à l'appui, que les bioessais placés au début de la séquence d'essai prédiront adéquatement les effets toxiques des biotests placés plus loin dans la séquence, lesquels sont réalisés avec des organismes situés à d'autres niveaux d'organisation biologique;

- . Les bioessais initiaux, conçus principalement pour indiquer des effets toxiques létaux, ne peuvent tout simplement pas prédire la gamme des effets sublétaux et chroniques résultant d'une exposition aux polluants étudiés;
- . Subséquemment aux lacunes notées aux deux paragraphes antérieurs, il y aurait une sous-estimation importante du potentiel écotoxique de la substance à l'étude;
- . Le processus séquentiel peut avoir, sur le plan de la gestion, une basse rentabilité au niveau du temps et du coût total des opérations, surtout si la valeur de prédiction écotoxique n'augmente pas au fur et à mesure que progressent les étapes.

La deuxième méthode d'analyse, récemment considérée pour l'évaluation du potentiel écotoxique de substances altérageuses (Van Coillie et al., 1984a), s'avère plus intégrée et est dite "simultanée" (tableau 31). En effet, cette approche prône la réalisation concomitante de plusieurs biotests représentatifs de niveaux différents d'organisation biologique et considère ensemble les toxicités létale, sublétale et chronique ainsi que certaines autres dimensions environnementales. La mise en évidence des principaux problèmes reliés à l'écotoxicité caractérise ce système d'évaluation (Blaise et al., 1984). Il fait appel à une série de biotests capable d'offrir la meilleure prédiction écotoxique possible de façon rentable en temps et argent. Bien structuré en fonction de besoins spécifiques,

TABLEAU 31. APPROCHE SIMULTANÉE POUR L'ÉVALUATION
ÉCOTOXICOLOGIQUE DES REJETS EN MILIEU
AQUATIQUE



ce plan d'action peut être utile pour analyser diverses situations environnementales sans présenter les faiblesses inhérentes à l'approche étapiste. L'expérimentation d'une telle approche a été menée de façon exhaustive sur des prélèvements liquides provenant de dépotoirs (Van Coillie et al., 1983a). Les résultats de cette étude ont confirmé l'utilité de l'approche écotoxicologique simultanée et d'autres expérimentations similaires sont présentement en cours à nos laboratoires (Environnement Canada, Région du Québec, Longueuil, Québec) avec des effluents industriels en vue d'apporter des ajustements graduels à la méthode.

Pour toute évaluation écotoxicologique de rejets liquides, il faut tenir compte de plusieurs considérations. En premier lieu, il est nécessaire d'obtenir des résultats pour les trois niveaux de protection environnementale correspondant aux trois dimensions de l'écotoxicité conceptualisées à la figure 18. Il est également important de réduire le plus possible le délai entre l'échantillonnage et les (bio)analyses ultérieures afin de maintenir la représentativité de l'évaluation entreprise. La réalisation de plusieurs types de bioessais s'avère aussi essentielle en fonction de variables telles que le palier d'écotoxicité (i.e. létal, sublétal, chronique), l'étage écologique (transformateurs, producteurs, consommateurs), la durée de l'exposition (biotests à court, moyen et long terme), les espèces représentatives et les paramètres de toxicité. Il y a en plus les particularités spécifiques aux prélèvements, le coût des diverses analyses à effectuer ainsi que leur répétition minimale pour

l'obtention de résultats fiables. Finalement, le degré de précision de l'évaluation demandé par les centres de décision influencera nécessairement la portée de l'estimation écotoxique.

Dans cette perspective d'une évaluation intégrée visant à dresser le portrait écotoxique de rejets liquides, les biotests dont il est question dans cette thèse constituent une contribution, comme l'indique le tableau 32 qui présente les principaux avantages associés à leur utilisation.

NIVEAU TROPHIQUE	TEST	AVANTAGES	NIVEAU D'APPLICATION ÉCOTOXIQUE	UTILISATION SUGGÉRÉE
Transformateurs	Microtox (CI50 avec <u>Photobacterium phosphoreum</u>): chapitre 3	Simple, exécution rapide, peu coûteux, obtention rapide des résultats, bonne standardisation, applications environnementales nombreuses	<u>Deuxième: aiguë</u> subléthalité	Pour fins de dépistage lors d'une première évaluation de rejets et/ou de polluants spécifiques
Producteurs	Biotest algal sur microplaque (CI50 avec <u>Selenastrum capricornutum</u>): chapitre 1	Essai miniaturisé simple, exécution rapide, peu coûteux, polyvalent d'application, potentiel d'automatisation avec très grand rendement	<u>Deuxième: aiguë à sub-aiguë</u> subléthalité	Pour fins de dépistage lors d'une première évaluation de rejets et/ou de polluants spécifiques
	Biotest algal classique (CI50 avec <u>Selenastrum capricornutum</u>): chapitres 1 et 3	Essai bien standardisé et polyvalent d'application	<u>Deuxième: aiguë à sub-aiguë</u> subléthalité	Précision confirmative lors d'une deuxième évaluation plus approfondie de rejets et/ou de polluants spécifiques
Consommateurs	Ichthyotest de létalité (CL50 avec <u>Salmo gairdneri</u>): chapitres 2 et 3	Essai bien standardisé et relativement sensible	<u>Premier: aiguë à sub-aiguë</u> létalité	Précision confirmative lors d'une deuxième évaluation plus approfondie de rejets et/ou de polluants spécifiques
	Ichthyotest de subléthalité (CMS avec <u>Salmo gairdneri</u>): chapitre 2	En exploitant l'ATP comme critère d'estimation de la vitalité cellulaire, cet essai s'avère utile à préciser le seuil de stress ichthyen pour les rejets industriels	<u>Deuxième: aiguë à sub-aiguë</u> subléthalité	Précision confirmative lors d'une deuxième évaluation plus approfondie de rejets et/ou de polluants spécifiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON, P.D. 1981. Paradigms in multiple toxicity. In: Management of toxic substances in our ecosystems, Edited by B.W. Cornaby, Ann Arbor Science Publishers, Inc., Michigan, 186 pages.
- ATKINSON, D.E. 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York, 293 pages.
- BATLEY, G.E. et GARDNER, D. 1977. Sampling and storage of natural waters for trace metal analysis. Water Research 11: 745-756.
- BEAK CONSULTANTS LIMITED, 1978. Study of toxicity of effluents from sulphite pulping operations practicing recovery and secondary biological treatment. Report prepared for Fisheries and Environment Canada, Hull, 73 pages.
- BECKMAN INSTRUMENTS INC., 1980. Operating instructions: Microtox™ Toxicity Analyzer, Model 2055 Interim Manual No. 110679. 36 pages.
- BESNER, J. et VAN COILLIE R. 1981. Etude environnementale sur l'implantation d'une usine de papier journal à Causapsal dans la vallée de la Matapédia, Québec. Rapport Rexfor à Environnement Québec, 321 pages.
- BLAISE, C. 1982. Toxicité et enrichissement. Dans: Impact des activités minières sur l'écologie des rivières aux Pékans et Moisie. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Rapport SPE8-RQ-82-1F: 33-49.
- BLAISE, C. et COUTURE, P. 1984. Détection à l'aide d'un bioessai (Selenastrum capricornutum) des répercussions d'un rejet minier sur l'environnement aquatique: toxicité ou enrichissement en substances essentielles? Hydrobiologia 114: 39-50.
- BLAISE, C., LEGAULT, R., BERMINGHAM, N., VAN COILLIE R. ET VASSEUR, P. 1984. Microtest mesurant l'inhibition de la croissance des algues (CI50) par le dosage de l'ATP. Sciences et Techniques de l'Eau 17: 245-250.
- BLAISE, C., SKA, B., SABATINI, G., BERMINGHAM, N. et LEGAULT, R. 1981. Potentiel de bioaccumulation de substances toxiques d'eaux résiduelles industrielles à l'aide d'un essai utilisant des algues et des bactéries. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 106: 155-165.
- BLAISE, C., VAN COILLIE R et BERMINGHAM, N. 1984. L'approche écotoxicologique intégrée: Une contribution à la lutte contre l'éco-toxicité. Bulletin de la Qualité des Eaux (sous presse).

- BREZONIK, P.L., BROWNE, F.X. et FOX, J.L. 1975. Application of ATP plankton biomass and bioassay studies. *Water Research* 9: 155-162.
- BULICH, A.A. 1979. Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments. In: *Aquatic Toxicology*. L.L. Markings and R.A. Kimerle, Editors, American Society for testing and Materials, ASTM 667, 98-106.
- BULICH, A.A. 1982. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. *Process Biochemistry*, March/April, 45-47.
- BULICH, A.A., GREENE, M.W. et ISENBERG, D.L. 1981. Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents. In: *Aquatic Toxicity and Hazard Assessment*. Fourth Conference of American Society for Testing and Materials, D.R. Branson and K.L. Dickson, Editors, STP 737: 338-347.
- BUTTERWICK, C., HEANEY, S.I. et TALLING, J.F. 1982. A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. *British Phycological Journal* 17: 69-79.
- CAIRNS, J. Jr. 1980. Beyond single species toxicity testing. *Marine Environmental Research* 3: 157-159.
- CAIRNS, J. Jr., ALEXANDER, M., CUMMINS, K. W., EDMONDSON, W.T., GOLDMAN, R., HARTE, J., ISENSEE, A.R., LEVIN, R., McCORMICK, J.F., PETERLE, T.J. et ZAR, J.H. 1981. Testing for effects of chemicals on ecosystems. National Academy Press, Washington, DC, USA. 103 pages.
- CAIRNS, J. Jr. 1983a. Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? *Hydrobiologia* 100: 47-57.
- CAIRNS, J. Jr. 1983b. The case for simultaneous toxicity testing at different levels of biological organization. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Sixth Symposium of American Society for Testing and Materials*, STP 802: 111-127.
- CHANG, J.C., TAYLOR, P.B. et LEACH, F.R. 1981. Use of the Microtox assay system for environmental samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 150-156.
- CHANT, D.A. et HALL, R.H. 1979. Ecotoxicité: responsabilités et possibilités, Comité consultatif canadien de l'environnement, Rapport no. 8, 34 pages.
- CHAPMAN, P.M. et LONG, R. 1983. The use of bio-assays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin* 14: 81-84.

- CHIAUDANI, G. et VIGHI, M. 1978. The use of Selenastrum capricornutum batch cultures in toxicity studies. Verhandlungen Internationale Vereinigung Limnologie 21: 316-329.
- CHRISTENSEN, E.R. et SCHERFIG, J. 1979. Effects of manganese, copper and lead on Selenastrum capricornutum, Chlorella stigmatophora. Water Research 13: 79-82.
- CHUNG, L.T.K., MEIER, H.P. et LEACH, J.M. 1979. Can pulp mill effluent toxicity be estimated from chemical analyses? Tappi 62: 71-74.
- CONRATH, T.B. 1972. Handbook of microtiter procedures. Dynatech corporation, Cambridge, Massachusetts, 475 pages.
- COUILLARD, D. 1980. Evaluation de la pollution et des répercussions des rejets des industries des pâtes et papiers sur la vie aquatique. The Science of the Total Environment 14: 167-184.
- COUTURE, P. 1981. Contribution de bioessais avec algues pour l'étude des impacts environnementaux en eaux douces. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 128 pages.
- COUTURE, P., VAN COILLIE, R., CAMPBELL, P.G.C. et THELLEN, C. 1981. Le phytoplancton, un réactif biologique sensible pour détecter rapidement la présence de toxiques. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 106: 255-272.
- CURTIS, C., LIMA, A., LOZANO, S.J., et VEITH, G.D. 1982. Evaluation of a bacterial bioluminescence bioassay as a method for predicting acute toxicity of organic chemicals to fish. In: Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Fifth Conference of American Society for Testing and Materials. J.G. Pearson, R.B. Foster, W.E. Bishop, Editors, STP 766: 170-178.
- DANIELSON, R. 1979. Step-sequence testing of toxic chemicals. Working group VIII draft document. Organization of Economic Cooperation and Development, Paris.
- DELISTRATY, D. 1984. Bioluminescent toxicity assay of synfuel by-product waters. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 32: 613-620.
- DE ZWART, D. et SLOOFF, W. 1983. The Microtox as an alternative assay in the acute toxicity assessment of water pollutants. Aquatic Toxicology 4: 129-138.
- DIVE, D. 1981. Nutrition et croissance de Colpidium campylum: contribution expérimentale et possibilités d'application en écotoxicologie. Thèse de doctorat présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille (France), No. 527, 285 pages.

- DRIEDZIC, W.R. et HOCHACHKA, P.W. 1976. Control of energy metabolism in fish white muscle. *American Journal of Physiology* 230: 579-582.
- DUTKA, B.J. et KWAN, K.K. 1981. Comparison of three microbial toxicity screening tests with the Microtox test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 27: 753-757.
- ELORANTA, V. et LAITINEN, O. 1982. The usefulness of the Selenastrum capricornutum algal assay to evaluate the toxic effects of pulp and paper mill effluents in lake water. *Vatten* 3: 317-331.
- ELORANTA, V., Halttunen-Keyriläinen, L. et Kuivasniemi, K. 1984. La toxicité aiguë des effluents des usines de papier "kraft" pour l'algue Selenastrum et pour le phytoplancton naturel. *Sciences et Techniques de l'Eau* 17: 267-274.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1971. Règlements sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers. Service de la Protection de l'Environnement, Rapport EPS1-WP-72-1, 7 pages.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1972. Lignes directrices concernant le règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers. Service de la Protection de l'Environnement, Rapport EPS1-WP-72-2, 21 pages.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1980a. Méthode normalisée de contrôle de la toxicité aiguë des effluents. Service de la Protection de l'Environnement, Rapport EPS1-WP-80-1, 11 pages.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1980b. Rapport provisoire sur la dépollution de l'eau dans l'industrie canadienne des pâtes et papiers. Service de la Protection de l'Environnement, Rapport EPS3-WP-82-3F, 20 pages.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1983. Plan stratégique régional, exposé sommaire. Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec (document interne), 13 pages.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1984. Techniques de base de l'industrie des pâtes et papiers, et ses pratiques de protection environnementale. Service de la Protection de l'Environnement, Guide de formation SPE6-EP-83-1F, 224 pages.
- FITZWATER, S.E., KNAUER, G.A. et MARTIN, J.H. 1983. The effects of Cu on the adenylate energy charge of open ocean phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 5: 935-938.
- GHOSH, T.K. et KONAR, S.K. 1980. Toxicity of chemicals and wastewaters of paper and pulp mills to worms, plankton and molluscs. *Indian Journal of Environmental Health* 22: 278-285.

- GREENE, J.C., MILLER, W.E., SHIROYAMA, T. et MALONEY, T.E. 1975. Utilization of algal assays to assess the effects of municipal, industrial and agricultural wastewater effluents upon phytoplankton production in the Snake River System. *Water Air Soil Pollution* 4: 415-434.
- HAALAND, P.T. et KNUTSON, G. 1973. Growth experiments with Selenastrum capricornutum Printz. In: Algal assays in water pollution research, Proceedings of Nordic Symposium, Oslo, Norway. NORDFORSK, Secretariat of Environmental Sciences, 69-72.
- HADJINICOLAOU, J. 1983. Water pollution control with toxicant avoidance tests. Thèse de doctorat, Université McGill, Montréal 425, pages.
- HASSETT, J.M., JENNETT, J.C. et SMITH, J.E. 1981. Microplate technique for determining accumulation of metals by algae. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 1097-1106.
- HAYA, K., WAIWOOD, B.A. et JOHNSTON, D.W. 1983a. Adenylate energy charge and ATPase activity of lobster (Homarus americanus) during sublethal exposure to zinc. *Aquatic Toxicology* 3: 115-126.
- HAYA, K., WAIWOOD, B.A. et VAN EECKHAUTE, L. 1983b. Energy metabolism during several life stages of Salmo salar upon exposure to low pH. In: Proceedings of Acid Rain Workshop, St. Andrews, New Brunswick, Canada, R.H. Peterson and H.H.V. Hord (Editors). Technical Report of the Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 1213: 57-69.
- HOLM-HANSEN, O. 1969. Determination of microbial biomass in ocean profiles. *Limnology and Oceanography* 14: 740-747.
- HUTCHINS, F.E. 1979. Toxicity of pulp and paper mill effluents: a literature review. USEPA Report EPA-600/3-79-013.
- INDORATO, A.M., SNYDER, K.B. et USIONOWICZ, P.J. 1983. Toxicity screening using Microtox. In: Proceedings of the First International Symposium on Toxicity Testing Using Bacteria, Burlington Ontario, Canada. B.J. Dutka and D. Liu, Editors (in press).
- IVANOVICI, A.M. 1980. Application of adenylate energy charge to problems of environmental impact assessment in aquatic organisms. *Helgoländer Meeresunters* 33: 556-565.
- JAKUBCZAK, E. et LECLERC, H. 1980. Mesure de l'ATP bactérien par bio-luminescence: étude critique des méthodes d'extraction. *Annales de Biologie Cliniques* 38: 297-304.

- JEANJEAN, R. 1976. The effect of metabolic poisons on ATP level and on active phosphate uptake in Chlorella pyremoidosa. *Physiologia Plantarum* 37: 107-110.
- JONES, J.R.E. 1973. Fish and river pollution. Butterworth and Co., Toronto. 203 pages.
- JONES, N.R. et MURRAY, J. 1960. The acid-soluble nucleotides of codling (Gadus callarias) muscle. *Biochemistry Journal* 77: 567-575.
- JORGENSEN, J.B. et MUSTAFA, T. 1980. The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in flounder (Platichthys flesus L.) - II. High energy phosphate compounds and the role of glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 67B: 249-256.
- JOUBERT, G. 1980a. A bioassay application for quantitative toxicity measurements, using the green alga Selenastrum capricornutum. *Water Research* 14: 1759-1763.
- JOUBERT, G. 1980b. Etude comparative des réactions à la toxicité entre la truite Salmo gairdneri et quatre autres intégrateurs biologiques sur 36 cas de bioessais statiques. Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques 990: 251-264.
- KARL, D.M. 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiological Reviews* 44: 739-796.
- KEIGHAN, E. 1977. Caractérisation du niveau d'enrichissement et de la toxicité des eaux du bassin du fleuve St. Laurent. Comité d'étude sur le fleuve St. Laurent. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Rapport technique No. 6, 153 pages.
- KENAGA, E. 1978. Test organisms and methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals. *Environmental Science and Technology*, 12: 1322-1329.
- KENAGA, E.E. 1982. Predictability of chronic toxicity from acute toxicity of chemicals in fish and aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1: 347-358.
- KENNICUTT II, M.C. 1980. ATP as an indicator of toxicity. *Water Research* 14: 325-328.
- LEACH, F.R. 1981. ATP determination with firefly luciferase. *Journal of Applied Biochemistry* 3: 473-517.

- LEBLANC, G.A. 1984. Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 47-60.
- LEBSACK, M.E., ANDERSON, A.D., DEGRAEVE, G.M. et BERGMAN, H.L. 1981. Comparison of bacterial luminescence and fish bioassay results for fossil-fuel process waters and phenolic constituents. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment. Fourth Conference of American Society for Testing and Materials*, D.R. Branson and K.L. Dickson, Editors, STP 737: 348-356.
- LECLERC, H. et DIVE, D. (éditeurs). 1982. Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique. *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* Volume 106, 600 pages.
- LEGAULT, R. 1979. Toxicité des eaux usées industrielles: compte-rendu et répertoire des bioanalyses de 1975 à 1978. *Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Rapport interne*, 76 pages.
- LLOYD, R. 1980. Toxicity testing with aquatic organisms: a framework for hazard assessment and pollution control. *Rapport des Réunions du Conseil International d'Exploration de la Mer* 179: 339-341.
- LOCH, J.S. et McLEOD, J.C. 1974. Factors affecting acute toxicity bioassays with pulp mill effluent. *Fisheries and Environment Canada, Technical Report Series No.: CEN/T-74-2*, 19 pages.
- LUMINESCENCE REVIEW, 1981. ATP measurements: theory and practice. *Bulletin* 202, February 1981. Turner designs, Mountain View, California, USA, 11 pages.
- MacFARLANE, R.B. 1981. Alterations in adenine nucleotide metabolism in the gulf killifish (*Fundulus grandis*) induced by low pH water. *Comparative Biochemistry and Physiology* 68B: 193-202.
- MacGREGOR, D.J. et WELLS, P.G. 1984. The role of ecotoxicological testing of effluents and chemicals in the Environmental Protection Service. *Environment Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Hull*, 8 mars, 1984, 13 pages.
- MACIOROWSKI, A.G., SIMS, J.L., LITTLE, L.W. et GERRARD, E.D. 1980. Bioassays - procedures and results. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 53: 974-993.
- MALLAK, F.P. et BRUNKER, R.L. 1983. Determination of the toxicity of selected metal working fluid preservatives by use of the Microtox system and an *in vitro* enzyme assay. In: *Proceedings of the First International Symposium on Toxicity Testing Using Bacteria*, Burlington, Ontario, Canada, B.J. Dutka and D. Liu, Editors (in press).

- MARTIN, G., Nam, S.H., VITRAS, O et REINBOLD, M. 1980. Utilisation de l'adénosine triphosphate dans les systèmes d'épuration biologique. *Water Research* 14: 379-387.
- MATTHEWS, J. 1984. Hazardous and industrial solid waste testing. In: Fourth Symposium of American Society for Testing and Materials D-34, May 2-4 (in press).
- McKAY, W.C. (Editeur) 1983. Compte rendu des communications du neuvième atelier annuel sur la toxicité aquatique: du 1 au 5 novembre 1982, Edmonton (Alberta, CANADA). Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques 1163, 243 pages.
- McFETERS, G.A., BOND, P.J., OLSON, S. et TCHAN, Y.T. 1983. A comparison of microbial assays for the detection of aquatic toxicants. *Water Research* 17: 1757-1762.
- McLEAY, D.J. et HOWARD, T.E. 1977. Comparison of rapid bioassay procedures for measuring toxic effects of bleached kraft mill effluent to fish. In: Proceedings of the 3rd Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, Canada. Environmental Protection Service Technical Report No. EPS-5-AR-77-1, 141-155.
- MIETTINEN, V., LONN, B.E. et OIKARI, A. 1982. Effects of biological treatment on the toxicity for fish of combined debarking and kraft pulp bleaching effluent. *Paperi ja Puu - Papper och Trä, Specialnummer 4*: 251-254.
- MICROTOX APPLICATION NOTE M103. 1981. Protection of biological waste treatment plants. Beckman Instruments Inc. Carlsbad, California, USA.
- MICROTOX APPLICATION NOTE 105. 1982. Toxicity of hazardous wastes. Beckman Instruments Inc. Carlsbad, California, USA.
- MICROTOX APPLICATION NOTE 106. 1983. Groundwater monitoring. Beckman Instruments Inc. Carlsbad, California, USA.
- MICROTOX APPLICATION NOTE M107. 1983. Toxicity testing of biomaterials and medical devices. Beckman Instruments Inc. Carlsbad, California, USA.
- MILLEMANN, R.E., Birge, W.J., BLACK, J.A., CUSHMAN, R.M., DANIELS, K.L., FRANCO, P.J., GIDDINGS, J.M., MCCARTHY, J.F. et STEWART, A.J. 1984. Comparative acute toxicity to aquatic organisms of components of coal-derived synthetic fuels. *Transactions of the American Fisheries Society* 113: 74-85.

- MILLER, W.E., GREENE, J.C. et SHIROYAMA, T. 1978. The Selenastrum capricornutum Printz algal assay bottle test: Experimental design, application, and data interpretation protocol. US Environmental Protection Agency Report No. EPA-600/9-78-018, Corvallis, Oregon, 126 pages.
- MOILANEN et al., 1980. Mechanical and biological treatment of waste water from integrated paper and pulp industry (2) Design and construction. Paperi ja Puu 62: 215.
- MOORE, J.E. et LOVE, R.J. 1977. Effect of a pulp and paper mill effluent on the productivity of periphyton and phytoplankton. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34: 856-862.
- MOUNT, D.I., THOMAS, N.A., NORBERG, T.J., BARBOUR, M.T., ROUSH, T.H. et BRANDES, W.F. 1984. Effluent and ambient toxicity testing and instream community response on the Ottawa River, Lima, Ohio. US Environmental Protection Agency, Duluth Minnesota 55804, Report EPA-600/3-84-080, 96 pages.
- NEIHEISEL, T.W., HORNING, W.B., PEETRASOK, A.C., ASBERRY, V.R., JONES, D.A., MARCUM, R.L., et HALL, C.T. 1982. Effects on toxicity of volatile priority pollutants added to a conventional wastewater treatment system. National Technical Information Service, Environmental Research Laboratory - Duluth/Newton, Cincinnati, Ohio. PB83-259721, 19 pages.
- NEUHOLD, J. et RUGGERIO, L. 1976. Ecosystem processes and organic contaminants. National Science Foundation, Washington, D.C. NSF-RA-760008, 41 pages.
- NIE, N.H., HULL, C.H., JENKINS, J.H., STEINBRENNER, K. et BENT, D.H. 1975. Statistical package for the social sciences. Second Edition, McGraw - Hill publishers.
- OCDE, 1981a. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Organisation de coopération et de développement économiques, Paris.
- OCDE, 1981b. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Section 2: Effets sur les systèmes biologiques, "Algues, test d'inhibition de croissance", Organisation de coopération et de développement économiques, Paris. No. 201, 1-14.
- OCDE, 1984. International Workshop on biological testing of effluents (and related receiving waters), Duluth, Minnesota, USA (sous presse).
- PEAKE, E. et MacLEAN, A. 1982. The toxicity of waters produced during in situ recovery of oil from the Athabasca oil sands as determined by the Microtox bacterial system. Report of the Kananaskis Centre for Environmental Research, University of Calgary, Canada, 8 pages.

- PERSOONE, G., JASPERS, E. et CLAUS, C. 1984. Ecotoxicological testing for the marine environment. Persoone, G., Jaspers, E. et Claus, C. (Editors). State University of Ghent and Institute for Marine Scientific Research, Belgium (sous presse).
- PHILLIPS, D.J.H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - A review. *Environmental Pollution* 13: 281-317.
- QURESHI, A.A., COLEMAN, R.N. et PARAN, J.H. 1983. Evaluation and refinement of the Microtox test for use in toxicity screening. In: *Proceedings of the First International Symposium on Toxicity Testing Using Bacteria*, Burlington, Ontario. B.J. Dutka and D. Liu, Editors (in press).
- QURESHI, A.A., FLOOD, K.W., THOMPSON, S.R., JANHURST, S.M., INNIS, C.S. et ROKOSH, D.A. 1982. Comparison of a luminescent bacterial test with other bioassays for determining toxicity of pure compounds and complex effluents. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference of American Society for Testing and Materials*, J.G. Pearson, R.B. Foster, and W.E. Bishop, Editors, STP 766: 179-195.
- RAI, L.C., GAUR, J.P. et KUMAR, H.D. 1981. Phycology and heavy-metal pollution. *Biological Review* 56: 99-151.
- RAINER, S.F., IVANOVICI, A.M. et WADLEY, V.A. 1979. Effect of reduced salinity on adenylate energy charge in three estuarine molluscs. *Marine Biology* 54: 91-99.
- RAINVILLE, R.P., COPELAND, B.J. et MCKEAN, W.T. 1975. Toxicity of kraft mill wastes to an estuarine phytoplankter. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 47: 487-503.
- RAMADE, F. 1979. *Ecotoxicologie*. Collection d'écologie, no. 9, Masson éditeur, Paris: 228 pages.
- REHNBERG, B.G., SCHULTZ, D.A. et RASCHKE, R.L. 1982. Limitations of electronic particle counting in reference to algal assays. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 54: 181-186.
- REYNOLDS, J.H., MIDDLEBROOKS, E.J., PORCELLA, D.B. et GRENNEY, W.J. 1975. Effects of temperature on growth constants of Selenastrum capricornutum. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 47: 2420-2436.
- RIBO, J.M. et KAISER, K.L.E. 1983. Effects of selected chemicals to photoluminescent bacteria and their correlations with acute and sublethal effects on other organisms. *Chemosphere* 12: 1421-1442.
- ROMANO, J.C. et DAUMAS, R. 1981. Adenosine nucleotide "energy charge" ratios as an ecophysiological index for microplankton communities. *Marine Biology* 62: 281-296.

- ROQUE, J. 1984. Biotechnologies dans le traitement des eaux. Biofutur 27: 35-43.
- SBSC (SANTÉ ET BIEN-ÊTRE SOCIAL CANADA)/Environnement Canada, 1983. Atelier sur les nouveaux produits chimiques, Toronto, Ontario. Service de la Protection de l'Environnement. Rapport SPE 3-EP-83-4. 151 pages.
- SCHEFFE, M.A. 1959. Analysis of variance. New York, Wiley, 315 pages.
- SHAUL, G.M., BARNETT, M.W., NEIHEISEL, T.W. et DOSTAL, K.A. 1983. Activated sludge with powdered activated carbon treatment of a dyes and pigments processing wastewater. In: Proceedings of the 38th industrial waste conference, Purdue University, 659-671.
- SHIROYAMA, T., MILLER, W.E. et GREENE, J.C. 1975. Effect of nitrogen and phosphorus on the growth of Selenastrum capricornutum. In: Proceedings Biostimulation and Nutrient Assessment Workshop, Oregon, October 1973. US Environmental Protection Agency, Oregon, Report No. EPA-660/3-75-034: 132-142.
- SLOOFF, W. et CANTON, J.H. 1983. Comparison of the susceptibility of 11 freshwater species to 8 chemical compounds. Part II. (Semi) chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology 4: 271-282.
- SPRAGUE, J.B. 1971. Measurement of pollutant toxicity of fish. III. Sublethal effects and "safe" concentrations. Water Research 5: 245-266.
- STOCKNER, J.G., CLIFF, D.D. et MUNRO, K. 1975. The effects of pulp mill effluent on phytoplankton production in coastal waters of British Columbia. Pacific Environment Institute, West Vancouver, Canada. Fisheries and Marine Service. Research and Development Directorate. Technical Report 578: 1-99.
- STROSHER, M.T., YOUNKIN, W.E. et JOHNSON, D.L. 1980. Environmental assessment of the terrestrial disposal of waste drilling muds in Alberta. Chemistry Petroleum Association Report, Calgary, Alberta, Canada. 22 pages.
- SUTER, G.W., VAUGHAN, D.S. et GARDNER, R.H. 1983. Risk assessment by analysis of extrapolation error: a demonstration of effects of pollutants on fish. Environmental Toxicology and chemistry 2: 369-378.
- THELLEN, C. 1983. Pertinence des ichthyotests sous-létaux pour les études d'impact local et régional. Thèse de Doctorat présentée à l'Université Paul Sabatier (Toulouse, France), No 2865, 139 pages.
- TRUHAUT, R., FERARD, J.F. et JOUANY, J.M. 1980. Cadmium IC50 determinations on Chlorella vulgaris involving different parameters. Ecotoxicology and Environmental Safety 4: 215-233.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1971. Algal assay procedure bottle test. National Eutrophication Research Program, Corvallis, Oregon, 82 pages.
- VAN COILLIE, R., VISSER, S.A. et COUTURE P. 1981. Utilisation de bio-essais avec les algues pour l'étude des répercussions liées à la mise en eau des réservoirs. Annales de limnologie 17: 79-91.
- VAN COILLIE, R., COUTURE, P., SCHOENERT, R. et THELLEN, C. 1982. Mise au point d'une évaluation rapide de la toxicité originale des effluents et de leurs composantes à l'aide d'algues. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Rapport contractuel, 130 pages.
- VAN COILLIE, R., BLAISE, C., COUTURE, P. et DENIZEAU, F. 1983a. Caractérisation écotoxicologique des eaux provenant de quatre dépotoirs d'enfouissement. Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Rapport contractuel, 103 pages plus 8 annexes, 121 pages.
- VAN COILLIE, R., COUTURE, P. et VISSER, S.A. 1983b. Use of algae in aquatic ecotoxicology. In: Aquatic Toxicology. Jerome O. Nriagu Editor. Advances in Environmental Science and Technology, Volume 13. John Wiley and Sons, N.Y., 487-502.
- VAN COILLIE, R., BIRMINGHAM, N. et BLAISE, C. 1984a. Approche intégrée suggérée pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents. Dans: Comptes rendus de la conférence sur les tests biologiques et évaluation des risques, Environnement Canada, Service de la Protection de l'Environnement, Région du Québec, Longueuil, 189-244.
- VAN COILLIE et al. (Comité des biosciences du Québec), 1984b. Biotechnologies au Québec. Rapport du Conseil de la Science et Technologie du Québec, Conseil Exécutif du Premier ministre du Québec, 175 pages.
- VAN DEN THILLART, G., KESKEBE, F. et VAN WAARDE, A. 1980. Anaerobic energy - metabolism of goldfish, Carassius auratus (L). Journal of Comparative Physiology 136: 45-52.
- VASSEUR, P., FERARD, J.F. et LARBAIGT, G. 1983. Interest of luminescent marine bacteria in ecotoxicity screening tests of complex effluents and comparison with Daphnia. In: Proceeding of the First International Symposium on Toxicity Testing Using Bacteria, Burlington, Ontario, B.J. Dutka and D. Liu, Editors (in press).
- VASSEUR, P., JOUANY, J.M., FERARD, J.F. et TOUSSAINT, B. 1981. Intérêt du dosage de l'ATP en tant que critère d'écotoxicité aiguë chez les algues. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 106: 207-226.

- VETTER, R.D. et HODSON, R.E. 1982. Use of adenylate concentrations and adenylate energy charge as indicators of hypoxic stress in estuarine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39: 535-541.
- VEZEAU, R. 1982. Protocoles d'échantillonnage, de préservation et de préparation des échantillons pour l'analyse des polluants prioritaires. Environnement Canada, Service de la protection de l'Environnement, Région du Québec, Rapport interne, 34 pages.
- WALDEN, C.C. et HOWARD, T.E. 1977. Toxicity of pulp and paper mill effluents: A review of regulations and research. *Tappi* 60: 122-125.
- WALESBY, N.J. et JOHNSTON, I.A. 1980. Temperature acclimation in brook trout muscle: adenine nucleotide concentrations, phosphorylation state and adenylate energy charge. *Journal of Comparative Physiology* 139: 127-133.
- WARNER, R.E. 1964. Quantitative studies of toxicant-induced behavioural pathology in fish. Thèse de doctorat, Université de Californie, Berkeley, Etats-Unis.
- WELLS, P.G. et MOYSE, C. 1981. A selected bibliography on the biology of Salmo gairdneri Richardson (Rainbow, Steelhead, Kamloops trout), with particular reference to studies with aquatic toxicity - Second Edition. Environment Canada, Economic and Technical Review, Report EPS-3-AP-81-1, 90 pages.
- YATES, I.E. et PORTER, J.K. 1981. Bacterial bioluminescence as a bioassay for mycotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 1072-1075.
- YATES, I.E. et PORTER, J.K. 1983. Temperature and pH effect on the toxicological potential of mycotoxins in the bacterial bioluminescence assay. In: *Proceedings of the First International Symposium on Toxicity Testing Using Bacteria*, Burlington, Ontario, B.J. Dutka and D. Liu, Editors (in press).