

## **Etude "Algues"**

### **Synthèse des résultats des essais**

**rapport final  
20 Août 1993**

## **Etude "Algues"**

### **Synthèse des résultats des essais**



#### **Sommaire:**

- 1 - Introduction: rappel de l'objet de l'étude
- 2 - Synthèse des conditions opératoires
- 3 - Synthèse des observations relatives à chaque échantillon
- 4 - Synthèse des résultats obtenus
- 5 - Commentaire sur les méthodes de comptage
- 6 - Commentaires sur les traitements préalables
- 7 - Conclusions

#### **Annexes:**

##### **Méthodes de numération cellulaire**

- (1) : Cellule de **Malassez**
- (2) : Coulter Counter
- (3) : Densité optique
- (4) : **Fluorimétrie**

##### **Rapports d'essais**

- (1) : effluent n° 1
- (2) : effluent n° 2
- (3) : effluent n° 3
- (4) : effluent n° 4
- (5) : effluent n° 5

## 1 - Introduction: rappel de l'objet de l'étude

La présente étude a pour **objet** de mesurer la toxicité de cinq effluents industriels à l'aide du test d'inhibition de la croissance de *Selenastrum capricornutum* en 96h (protocole d'essai **dérivé** de la norme ISO 8692) et selon différentes modalités de traitement des échantillons et de comptage cellulaire. Pour chaque effluent, les deux traitements sont d'une part la décantation en 2 heures, et d'autre part la filtration à **0,45 µm**. Les comptages cellulaires ont **été réalisés** de plusieurs façons: à la cellule de **Malassez** et en fluorimétrie, ainsi qu'au Coulter Counter pour les échantillons **filtrés**. Pour compléter cette étude, nous avons jugé pertinent d'effectuer les comptages avec une méthode **supplémentaire** par lecture de densité optique. Simultanément à chaque effluent, le **contrôle** de la souche d'algues a été **réalisé** par un essai avec du dichromate de potassium, les **numérations** cellulaires étant **réalisées** suivant les quatre méthodes précédentes.

Pour l'ensemble des mesures réalisées, les données brutes (et converties lorsque c'est le cas en concentrations cellulaires) sont fournies telles qu'elles ont été obtenues, sous la forme de tableaux de **données**.

Pour compléter les instructions de la lettre de commande de cette étude, différentes mesures physico-chimiques ont été **réalisées** (pH, matières **décantables**, matières en suspension totales, odeur, couleur). Les **résultats** de ces mesures sont **consignées** dans les rapports d'essais.

De **manière** à faciliter la comparaison des **échantillons** entre eux, des clichés photographiques ont **été réalisés** aux **différentes** étapes des essais; ils sont annexes avec chacun des rapports d'essais.

La conclusion de l'étude est faite dans l'objectif de permettre **ultérieurement** l'application de l'essai sur des effluents selon un protocole standardisé.

## 2 - Synthèse des conditions opératoires

### 2.1 - Réception des échantillons

Les cinq échantillons d'effluents analysés dans le cadre de cette étude sont parvenus au laboratoire, le jeudi après-midi comme convenu, par l'**intermédiaire** d'un transporteur. Il est à noter que ces échantillons n'ont jamais été accompagnés d'un courrier ou d'une indication faisant **référence** à l'étude ou au laboratoire concerné, ce qui a été la cause de délais dans l'enregistrement.

Dès leur réception, les effluents ont été référencés de la façon suivante:

Référence de l'effluent	Références IPL/HAHE
Effluent n°1: pâte à papier (blanchiment chlore)	93 04 29 505
Effluent n°2: papeterie	93 05 06 509
Effluent n°3: teinturerie (textile)	93 06 03 502
Effluent n°4: chimie (benzène, acrylates...)	93 06 10 520
Effluent n°5: traitement de surface (chrome)	93 06 24 504

### 2.2 - Calendrier des opérations

Avant essai, chaque **échantillon** est homogénéisé. Un aliquote est mis en **décantation**, ou centrifuge et **filtré**, pour la **réalisation** de l'essai **préliminaire**. Le reste de l'**échantillon** est conservé à l'obscurité à environ **+4°C**. Le lundi suivant, la **quantité d'échantillon** nécessaire à l'essai est soumise à **décantation**, et parallèlement à centrifugation et filtration. Les essais **définitifs** sont mis en route dans l'après-midi, avec une gamme de dilutions **définie** en fonction des **résultats** de l'essai **préliminaire**.

Calendrier des **opérations**:

	numéro d'enregistrement	date de réception	premier traitement	essai préliminaire	second traitement	essai définitif
Effluent n°1	93 04 29 505	29.04.93	30.04.93	30.04.93	03.05.93	03.05.93
Effluent n°2	93 05 06 509	06.05.93	07.05.93	07.05.93	10.05.93	10.05.93
Effluent n°3	93 06 03 502	03.06.93	04.06.93	04.06.93	07.06.93	07.06.93
Effluent n°4	93 06 10 520	10.06.93	11.06.93	11.06.93	14.06.93	14.06.93
Effluent n°5	93 06 24 504	24.06.93	25.06.93	25.06.93	28.06.93	28.06.93

### 2.3 - Traitement des échantillons

Pour que les conditions de conservation de l'échantillon, durant les 72 heures qui séparent la réception de la mise en route de l'essai définitif, n'influence pas sur le résultat des essais, il a **été** décidé de procéder à la décantation-ou-filtration d'un aliquote le jour même de la **réception**, pour la réalisation de l'essai préliminaire, et à une nouvelle **décantation-ou-filtration** le jour de la mise en route de l'essai **définitif**. Cette solution, plus lourde en temps de travail, a **été jugée** préférable à celle qui consistait à traiter l'échantillon à réception et à le conserver pendant 72 heures décanté d'une part et filtré d'autre part, car les deux traitements différents pouvaient conduire à des évolutions **différentes** dans le temps.

Lors de la première phase de traitement de l'échantillon, les paramètres physico-chimiques sont mesurés.

**La méthode de décantation** utilisée est la suivante: après homogénéisation manuelle, un litre d'effluent est mis à **décanter** pendant 2 heures dans un cône de Coin; le surnageant est **recupéré** à l'aide d'un tuyau de plastique à usage unique. La teneur en matibres décantables lue sur les graduations du **cône** est **notée**. Pour les besoins de l'essai définitif, deux aliquotes de un litre chacun ont été mis à **décanter simultanément**.

**La méthode de filtration utilisée** est la suivante: la filtration a, dans tous les cas, **été précédée** d'une centrifugation durant 10 minutes à environ 2000 g (afin que les conditions **opératoires** soient les mêmes pour tous les échantillons). La filtration proprement dite du surnageant de centrifugation est faite sur membrane de **0,45 µm précédée** d'un préfiltre. Le résidu de la phase de **centrifugation/filtration** est passé à l'**étuve** à 110°C pour déterminer la teneur en matières en suspension totales de l'**échantillon**.

### 2.4 - Conditions expérimentales

La souche d'algues **utilisée** (*Selenastrum capricornutum* CCAP 287/4) provient du Centre de Culture des Algues de Cumbria - UK (reçue au laboratoire le 06.07.92).

Compte tenu de l'importance des volumes **nécessaires** aux lectures quotidiennes, les cultures sont réalisées en flacons de 250 ml (200 ml de culture en **début** d'essai), bouchés, et soumises à agitation par barbotage d'air filtré. **Les** cultures sont mises à **incuber** à environ **23°C**, sous lumière blanche continue artificielle (environ 6000 lux). Chaque jour, après **homogénéisation** manuelle, on **prélève** 6 ml de chaque culture pour **réaliser** les lectures.

L'**essai préliminaire** permet de déterminer la gamme de dilutions appropriées encadrant une CE50 approximative. Il est réalisé suivant une gamme de dilutions très large, sans répétition. La lecture de cet essai se fait à la cellule de Malassez.

L'**essai définitif** est réalisé selon le principe de la norme ISO 8692, aménagée conformément aux consignes de la lettre de commande de la présente étude, en 96 heures, et avec l'algue *Selenastrum capricornutum*. L'essai est mis en route, **simultanément**, et dans les mêmes conditions d'environnement, sur l'aliquote **centrifugé/filtré** ainsi que sur l'aliquote **décanté**. On réalise pour chaque essai une gamme de dilutions comportant au moins cinq dilutions, avec trois **répétitions** par dilution. Les gammes de dilutions de chaque essai définitif ont **été** déterminées en fonction des essais préliminaires. Six **répétitions** d'un témoin sans toxique sont réalisées simultanément. Un essai sur substance de **référence** (dichromate de potassium) est réalisé en parallèle aux essais sur effluent.

**Les comptages cellulaires sont réalisés:**

\* pour l'effluent **décanté**: à la cellule de Malassez, par mesure de densité optique et en fluorimétrie;

\* pour l'effluent filtré ainsi que pour la substance de **référence** et le témoin sans toxique: à la cellule de Malassez, par mesure de densité optique, en **fluorimétrie** et au Coulter Counter.

**Pour** l'ensemble des mesures réalisées, les **données** brutes (et converties lorsque c'est le cas en concentrations cellulaires) sont fournies telles qu'elles ont **été** obtenues, sous la forme de tableaux de **données**.

La description de chacune des méthodes de **détermination** des concentrations cellulaires fait l'objet des annexes 1 à 4.

Les résultats expérimentaux obtenus pour chaque effluent sont regroupés en annexe.

## 2.6 - Expression des résultats

Le résultat de chaque essai est exprimé à partir des calculs se rapportant à l'aire de la courbe de croissance (biomasse intégrale), d'une part sous la forme de CE50 96h (dilution de l'effluent qui provoque, en 96 heures, une diminution de 50% de la croissance par rapport à la culture témoin), et d'autre part sous la forme de la CSEO 96h (concentration la plus élevée pour laquelle aucune inhibition significative n'a été observée en 96h par rapport aux cultures témoins). La CSEO est évaluée par extrapolation graphique.

Pour tous les cas où les calculs n'ont pas pu être fait, une explication est **donnée**.

Les **critères** de validation des essais ont **été déterminés** avec les données issues du comptage à la cellule de Malassez.

## 3 - Synthèse des observations relatives à chaque échantillon

	aspect, couleur odeur	matières décantables	matières en suspension totales	pH
Effluent n° 1	aspect turbide couleur brun clair opaque odeur de <b>résineux</b>	45 ml/l	0,72 g/l	7,80
Effluent n° 2	aspect floconneux couleur gris opaque odeur de <b>désinfectant médical</b>	90 ml/l	1,57 g/l	6,90
Effluent n° 3	peu de <b>matières</b> en suspension couleur <b>brun/mauve</b> opaque odeur de solvant (type <b>acétone</b> )	1 ml/l	0,14 gn	7,35
Effluent n° 4	aspect, huileux turbide couleur verte forte odeur d'essence	90 ml/l	2,10 g/l	8,00
Effluent n° 5	fines particules en suspension couleur jaune transparent pas d'odeur particulière	2,5 ml/l	0,49 g/l	2,70 .

\*: les essais ont été réalisés sans ajustement du pH

#### 4 - Synthèse des résultats obtenus

Les résultats sont exprimés sous forme de CE50 96h, en pourcentage de dilution de l'effluent.

	échantillon centrifugé et filtré				échantillon décanté		
	Coulter	Cellule	DO	Fluorimétrie	Cellule	DO	Fluorimétrie
Effluent n°1 CE50	41,8%	13,6%	93% $\mu$	9% *	3,9%	N D	N D
Effluent n°2 CE50	N T	12,5%	30%	18%	7,95%	N D	N D
Effluent n°3 CE50	12%	7,5%	N T	N D	4,5%	N T	N D
Effluent n°4 CE50	4,7%	5,3%	6,5%	4,1%	5,5%	9,5%	6%
Effluent n°5 CE50	1,7%	1,6%	3%	2%	0,3%	1%	0,9%

"N D": non déterminé "N T": non toxique " $\mu$ ": établi par extrapolation "\*" : donné à titre indicatif

Les résultats sont exprimés sous forme de CSEO 96h, en pourcentage de dilution de l'effluent.

	échantillon centrifugé et filtré				échantillon décanté		
	Coulter	Cellule	DO	Fluorimétrie	Cellule	DO	Fluorimétrie
Effluent n°1 CSEO	7%	2%	7% $\mu$	2,546 *	0,896	ND	ND
Effluent n°2 CSEO	N T	2,2%	1,5%	0,9%	0,896	ND	ND
Effluent n°3 CSEO	1,746	1,3%	NT	N D	0,6%	N T	N D
Effluent n°4 CSEO	0,8%   0,8%	0,8%	1%	0,95%	0,75%	2,1%	1,1%
Effluent n°5 CSEO	0,18%	0,22%	0,4%	0,32%	<0,1%	<0,1%	<0,1%

"N D": non déterminé "N T": non toxique " $\mu$ ": établi par extrapolation "\*" : donné à titre indicatif

Les résultats des essais réalisés avec le dichromate de potassium comme substance de référence sont exprimés sous forme de CE50 96h, en mg de substance par litre de milieu d'essai.

	dichromate de potassium			
	Coulter	Cellule	DO	Fluorimétrie
Essai n°1	1,11 mg/l	1,15 mg/l	1,29 mg/l	1,00 mg/l
Essai n°2	0,86 mg/l	0,94 mg/l	0,90 mg/l	0,95 mg/l
Essai n°3	1,15 mg/l	1,10 mg/l	1,40 mg/l	1,40 mg/l
Essai n°4	1,00 mg/l	1,00 mg/l	1,00 mg/l	1,00 mg/l
Essai n°5	0,57 mg/l	0,57 mg/l	0,56 mg/l	0,55 mg/l



Critères de validité des essais:

	multiplication cellulaire en 72h	$\Delta$ pH (96h) du témoin
Essai n°1	x 93	2,1
Essai n°2	x 93	1,5
Essai n°3	x 60	0,9
Essai n°4	x 87	1,5
Essai n°5	x 102	0,65

Chacun de ces résultats permet de valider les essais (concentrations cellulaires déterminées à la cellule de Malassez), excepté l'essai n° 1 pour lequel la variation de pH dans les cultures témoins est de 2,1 en 96h.

## 5 - Commentaire sur les méthodes de comptage

Rappel: la description de chacune des méthodes de détermination des concentrations cellulaires fait l'objet des annexes 1 à 4.

Au cours de cette **étude**, il est apparu que les durées **nécessaires** pour chaque méthode de dénombrement cellulaire étaient **équivalentes**. En effet, l'utilisation de la cellule de **Malassez** demande un temps plus long de lecture mais ne **nécessite pas d'étalonnage** ni de nettoyage de l'appareil, pas de passage de blancs, ni de conversion des données en fin de mesure.

Du point de vue de l'**opérateur**, la cellule de **Malassez** est la **méthode** la plus pénible (fatigue **oculaire**, position pénible lorsque le temps de lecture est long).

D'un point de vue technique, et en fonction des observations **réalisées** sur les cinq échantillons d'effluents industriels reçus, il semble que les lectures de densité optique et par fluorimétrie ne se prêtent pas aux effluents **décantés**. De plus, quand des **données interprétables** sont disponibles, elles sous-estiment en **général** la **toxicité** par rapport aux **résultats** obtenus à la cellule de Malassez.

De même, le **dénombrement** des algues au **Coulter Counter** semble, pour trois des cinq effluents **étudiés**, sous-estimer la toxicité. Cette observation pourrait être **nuancée** en **réalisant** les comptages sans utiliser la fonction "correction" de l'appareil (cf annexe 2).

## 6 - Commentaires sur les traitements préalables

Pour faciliter la comparaison des trois sous-échantillons: brut, décanté et filtre, des clichés photographiques ont **été** réalisés; ils sont insérés dans l'annexe correspondant au rapport d'essai de chaque effluent.

L'effluent n°5 est celui qui a montré la plus faible quantité de matières en suspension, et dont la couleur était la moins prononcée. L'analyse des résultats expérimentaux permet de constater que, par rapport à ceux obtenus avec les autres effluents, les **résultats** des essais réalisés avec l'**effluent n°5** sont les plus reproductibles. L'observation des clichés photographiques **réalisés** durant les essais met en évidence la floculation des suspensions d'algues, quasi systématique dans les essais **réalisés** après décantation, et moins fréquente dans les essais **réalisés** après filtration.

La filtration des effluents apparaît comme une solution pertinente pour s'affranchir des **difficultés** techniques liées à la **turbidité** des échantillons (qui agit sur la quantité de **lumière** disponible pour la croissance algale) et à la **décantation** en cours d'essais (modification des **caractéristiques** de l'**échantillon** en cours d'essai).

La filtration élimine de plus les microorganismes de l'**échantillon** et dont la **présence** elle-même peut influencer sur la dynamique de la population algale (**phénomènes** de compétition, de broutage...). Lorsqu'elle a **été** constatée au microscope optique - durant les dénombrements à la cellule de Malassez-, la **présence** de ces microorganismes est **signalée** en première page des rapports d'essais (annexes 1 à 5)

## 7 - Conclusions

Lorsque l'échantillon est préalablement filtré, pour les cinq effluents industriels étudiés, il apparait que la **méthode de dénombrement** n'influe pas significativement sur la valeur de la CSEO.

Il est à noter que la méthode de **dénombrement** et le prétraitement n'influent pas de façon significative sur les résultats des essais pour deux (effluents 4 et 5) des cinq échantillons étudiés.

Pour quatre des cinq échantillons testés, la filtration de l'**effluent** avant essai permet d'obtenir des résultats par les quatre méthodes de **numération** étudiées, car l'impact des artefacts **liés à la présence** de floculats y est moindre.

Dans le strict cadre de cette étude, il est difficile d'évaluer précisément le coût prévisionnel d'un essai dans l'absolu. Pour être en mesure d'établir une telle évaluation, des données complémentaires nous sont **nécessaires**:

- \* l'ordre de grandeur d'un marche analytique annuel (pour la **définition** des investissements en personnel et en matériel, et les calculs d'amortissement),
- \* l'ordre de grandeur du nombre **d'échantillons à traiter simultanément en série**
- \* les engagements **liés** au cahier des charges (travail le samedi, arrivage planifié des échantillons, ou **possibilité** de report de la mise en route des essais, lecture quotidienne ou seulement **à 72h, réalisation** d'un **témoin** dichromate **systématique** ou possibilité de **vàl**ider la souche d'algues par suivi mensuel et carte de controle.. ).

Pour simplifier ces **évaluations** nous avons donc **intégré** dans le tarif horaire annonce, l'amortissement du matériel, les consommables (dont les souches d'algues et leur maintien en cultures), ainsi que les charges de structure.

Dans tous les cas, le maintien de souches d'algues disponibles en permanence pour les essais dans les règles du controle et de l'assurance de la qualité implique au minimum la culture de la souche dans des conditions **stériles**, le suivi de son Ctat physiologique et la tenue des cartes de controle **associées**, ainsi que son renouvellement au moins annuel auprès d'organismes habilités. Ces charges ont un coût minimal qui ne peut être **réduit** et dont l'importance proportionnelle dans le coût d'un essai diminue avec le nombre d'essais **réalisés**.