

50376
1976
180

50376
1976
180

N° d'ordre : 577

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

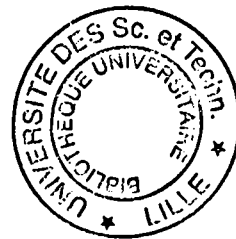
DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Discipline : BIOLOGIE CELLULAIRE

par

Daniel DIVE

Maître ès Sciences



**ETUDE D'UNE METHODE STANDARDISEE UTILISANT
LE CILIE COLPIDIUM CAMPYLUM POUR LA MESURE DE LA TOXICITE.**

Membres du Jury :	M. VIVIER	Président
	M. LECLERC	Rapporteur
	M. BODARD	Examineur
	Mme ERB	Examineur
	M. DUSSART	Membre Invité

Soutenue le 2 Mars 1976



030 051269 5

A mon Maître

Monsieur Henri LECLERC

Professeur de Bactériologie à la Faculté de Médecine

Directeur de l'Unité INSERM 146

Ce travail est dédié à la mémoire de toutes les innocentes victimes de la pollution et à tous ceux qui, dans le monde, s'attachent à lutter contre ce fléau.

A mes Parents
qui m'ont aidé à la réalisation
de ma carrière de Chercheur.

A ma femme et mon fils
témoignage d'affection.

Les travaux relatés ici, ont été effectués au Laboratoire d'Hydrobiologie de l'Institut Pasteur de Lille dirigé successivement par Monsieur le Docteur R. BUTTIAUX et Monsieur le Professeur J. SAMAILLE, que nous tenons à remercier pour les appuis qu'ils nous ont constamment apportés.

Nous remercions Monsieur le Professeur E. VIVIER de nous avoir fait l'honneur de présider notre Jury. Durant ce travail, il n'a jamais ménagé ses conseils et ses encouragements et a accepté de nous parrainer dans le Groupement des Protistologues de langue française. Qu'il soit assuré de notre plus sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur H. LECLERC nous a accueilli dans ses laboratoires. Il nous a fait découvrir le sens profond de la recherche et nous a toujours donné les moyens de la réaliser. Sa constante attention, ses conseils et ses encouragements nous ont permis de résoudre nos difficultés et de réaliser ce travail. Nous l'assurons de nos sentiments les plus respectueux et dévoués.

Monsieur B. DUSSART a accepté de faire un long déplacement pour faire partie de notre Jury. La profondeur de ses vues et la perspicacité de ses critiques nous ont permis une meilleure synthèse de nos connaissances et une meilleure approche des problèmes. Nous tenons à le remercier tout particulièrement.

Notre reconnaissance va aussi à Monsieur le Professeur M. BODARD pour ses précieux conseils et Madame le Professeur F. ERB pour ses conseils, encouragements et la collaboration constante qu'elle nous a apporté au cours de nos recherches.

Que Monsieur C. BURG, Directeur de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale trouve, ici, l'expression de nos plus sincères remerciements pour nous avoir accepté parmi les Chercheurs de l'INSERM.

Tous nos camarades du laboratoire nous ont permis, grâce à de nombreux contacts et à leur grande gentillesse, de travailler dans une ambiance agréable.

Nos remerciements iront à l'ensemble du personnel technique et administratif du laboratoire pour l'aide efficace qu'il nous a apportée dans les problèmes techniques. Mention sera faite pour Mademoiselle M.N. PRIEM dont l'assistance, le dévouement et l'intelligence du travail ont été constants durant toute notre recherche .

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS,
DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,
KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE,
MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

1. BACCHUS Pierre	Astronomie
1. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
1. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
1. BILLARD Jean	Physique du Solide
1. BIAYS Pierre	Géographie
1. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
1. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
1. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
1. BOUGHON Pierre	Algèbre
1. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
1. CELET Paul	Géologie Générale
1. CONSTANT Eugène	Electronique
1. DECUYPER Marcel	Géométrie
1. DELATTRE Charles	Géologie Générale
1. DELHAYE Michel	Chimie Physique
1. DERCOURT Michel	Géologie Générale
1. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
1. FAURE Robert	Mécanique
1. FOURET René	Physique du Solide
1. GABILLARD Robert	Electronique
1. GLACET Charles	Chimie Organique
1. GONTIER Gérard	Mécanique
1. GRUSON Laurent	Algèbre
1. GUILLAUME Jean	Microbiologie
1. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
1. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
1. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
1. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
1. LEBRUN André	Electronique
1. LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCO Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie

CARREZ Christian	Informatique
CORDONNIER Vincent	Informatique
COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
e DACHARRY Monique	Géographie
DEBENEST Jean	Sciences Economiques
DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
DHAINAUT André	Biologie Animale
DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
DUBOIS Henri	Physique
DYMENT Arthur	Mécanique
ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
e EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
FOURNET Bernard	Biochimie
FROELICH Daniel	Chimie Physique
GAMBLIN André	Géographie
GOBLOT Rémi	Algèbre
GOSSELIN Gabriel	Sociologie
GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
HECTOR Joseph	Géométrie
HERMAN Maurice	Physique Spatiale
JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
e KOSMAN Yvette	Géométrie
KREMBEL Jean	Biochimie
LAURENT François	Automatique
e LEGRAND Denise	Algèbre
e LEGRAND Solange	Algèbre
LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
LEROY Yves	Electronique
LHENAFF René	Géographie
LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
MACKÉ Bruno	Physique
MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
e N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
MAIZIERES Christian	Automatique
MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
PAQUET Jacques	Géologie Générale
PARSY Fernand	Mécanique
PECQUE Marcel	Chimie Physique
PERROT Pierre	Chimie Appliquée
PERTUZON Emile	Physiologie Animale
PONSOLLE Louis	Chimie Physique
POVY Lucien	Automatique
RICHARD Alain	Biologie
ROGALSKI Marc	Analyse
ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
SIMON Michel	Sociologie
SOMME Jean	Géographie
e SPIK Geneviève	Biochimie
STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
STEEN Jean-Pierre	Informatique

. THERY Pierre
. TOULOTTE Jean-Marc
. TREANTON Jean-René
. VANDORPE Bernard
. VILLETTE Michel
. WALLART Francis
. WERNIER Georges
. WATERLOT Michel
me ZINN-JUSTIN Nicole

Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Géologie Générale
Algèbre

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION.....	1
Première Partie : HISTORIQUE CRITIQUE.....	3
A - Etudes bionomiques des milieux pollués.....	3
B - Méthodes expérimentales sur cultures.....	6
I. - Techniques de culture.....	6
1) Cultures agnostobiotiques.....	7
2) Cultures monoxéniques.....	8
3) Cultures axéniques.....	9
II. - Techniques de test de toxicité.....	10
1) Méthodes morphologiques, structurales, éthologiques et biochimiques.....	10
2) Tests de toxicité aigue ou tests de mortalité.....	12
3) Mesure de la modification de la croissance	14
4) Conclusions.....	16
C - Conclusion générale de la première partie....	17
Deuxième Partie : MATERIEL ET METHODES.....	19
I - Souches.....	19
1) Bactérie.....	19
2) <u>Colpidium campylum</u>	19
II - Milieux et méthodes de culture.....	19
1) Milieux pour la culture d' <u>Escherichia coli</u>	19
2) Cultures en masse et récolte d' <u>E. coli</u>	20
3) Milieu pour les cultures de <u>Colpidium campylum</u>	20

4) Stérilisation et mise en culture monoxénique	21
5) Entretien des souches de <u>Colpidium</u>	21
6) Cultures en masse de <u>Colpidium campylum</u>	21
 III - Méthodes de dénombrement des individus et de mesure de la biomasse.....	21
1) Etude de l'appareillage.....	22
2) Etalonnage des appareils.....	23
3) Préparation des échantillons et méthodes de mesure.....	25
 IV - Méthodes de calcul.....	26
 Troisième Partie : RESULTATS.....	27
 Chapitre I : Développement d'une méthode de test standardisée.....	27
 I - Principe de test adopté.....	27
II - Influence du nombre de répliques et du temps de culture.....	27
1) Principe de manipulation.....	28
2) Résultats.....	28
3) Conclusions.....	30
III - Facteurs de variation du nombre de généra- tions.....	30
IV - Influence du réglage des appareils de comp- te sur les données numériques.....	34
V - Conséquences au niveau de l'analyse statistique des résultats.....	35
VI - Conclusions.....	35

Chapitre II : Domaines d'application.....	37
I - Toxicité de corps purs hydrosolubles....	37
II - Mesure de la toxicité de corps purs peu solubles.....	39
III - Utilisation de l'analyse factorielle..	40
IV - Etude expérimentale de la bioconcentration des micropolluants.....	41
V - Possibilités d'application à la recherche directe des micropolluants dans les eaux	42
VI - Application à la mesure de la toxicité d'eaux polluées ou d'eaux résiduaires...	43
1) Influence des matières en suspension	44
2) Influence de la charge en matière orga- nique et en bactéries des eaux usées	44
3) Influence des autres organismes présents dans l'effluent.....	45
4) Essai d'application du test <u>Colpidium</u> à quelques échantillons d'eaux usées	46
CONCLUSION GENERALE.....	48

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La pollution des eaux de surface progresse d'une façon alarmante dans tous les pays industriels. Elle se traduit par une transformation profonde du milieu biologique à la fois dans sa composition spécifique et dans son économie énergétique. La disparition des espèces les plus sensibles produit un déséquilibre trophique préjudiciable pour les organismes qui s'en nourrissent. La quantité de matière organique biodégradable est augmentée soit par un apport dû au rejet lui-même, soit par la mort d'une partie de la biocoenose ou, le plus souvent, par l'intervention simultanée de ces deux facteurs.

Dans ces conditions, le fonctionnement des chaînes trophodynamiques est modifié. Le phytoplancton, qui est le capteur d'énergie assurant une production de nouvelle matière vivante, disparaît le plus souvent en premier. Le milieu pollué fonctionne donc essentiellement par utilisation de matière organique préformée, grâce à des chaînes alimentaires détritiques. Le maillon le plus significatif de ces systèmes est représenté par les microorganismes qui minéralisent la matière organique biodégradable. La biomasse bactérienne formée est ensuite utilisée par des organismes bactériophages, en particulier des protozoaires ciliés. Ceux-ci contribuent donc à l'élimination de l'excédent de microorganismes autochtones ou exogènes consécutif à la disparition de la pollution organique.

Les protozoaires servent à leur tour de base nutritionnelle à certains organismes plus évolués comme les rotifères, les crustacés ou les très jeunes poissons. Or, dans

de nombreuses chaînes trophiques, on a pu mettre en évidence une accumulation de substances toxiques variées. La contamination est transmise de maillon en maillon et parfois multipliée de façon spectaculaire. Les conséquences de ce phénomène sont parfois tragiques, comme en témoigne le drame de Minamata (Japon) ou des cas mortels d'intoxication ont pu être mis en relation avec l'accumulation de méthyl mercure le long d'une chaîne trophodynamique naturelle.

Si, dans quelques cas, des chaînes alimentaires ont pu être reconstituées d'une manière satisfaisante, celles qui sont tributaires de la dégradation de la matière organique sont encore mal connues. Les phénomènes de bioaccumulation se produisant dans des chaînes de type Bactéries-Protozoaires n'ont pas encore été étudiés. Dans ces conditions, il était intéressant d'entreprendre un tel travail car ces chaînes trophiques sont parmi les plus exposées aux pollutions de toute nature.

Pour réaliser avec succès des transferts de toxicité le long de chaînes alimentaires, il faut préalablement connaître la sensibilité de chaque maillon aux toxiques que l'on veut étudier. Nous nous proposons d'exposer ici les résultats obtenus avec un protozoaire bactériophage, dans la recherche d'une méthode standard de test de toxicité aigue et d'accumulation applicable à la fois à l'étude de toute substance supposée toxique et aux rejets complexes de l'industrie.

Première Partie : HISTORIQUE CRITIQUE

Première Partie : HISTORIQUE CRITIQUE

Plusieurs méthodes s'offrent au chercheur désireux d'étudier l'effet des pollutions sur les protozoaires afin d'en estimer les conséquences écologiques :

- La première est l'étude bionomique des milieux naturels associée aux mesures physico-chimiques. Des méthodes dérivées peuvent être envisagées pour permettre le travail en laboratoire.

- Les études uniquement expérimentales basées sur des manipulations de cultures pures.

Nous allons examiner les deux types de méthode afin d'en dégager les avantages et les inconvénients.

A - ETUDES BIONOMIQUES DES MILIEUX POLLUES

Elles consistent en l'inventaire qualitatif et si possible quantitatif des protozoaires en de nombreux points différents et la mise en parallèle des résultats obtenus avec une analyse physico-chimique la plus complète possible. On recherche alors comment la composition de la biocoenose correspond aux caractéristiques de l'eau. Ces études de type saprobiologique ont été très nombreuses et approfondies ; l'inventaire complet en serait inutile. Beaucoup ne s'intéressent qu'à l'examen d'un petit nombre de paramètres : demandes biologiques et chimiques en oxygène (DBO, DCO) oxygène dissous, pH, flore microbienne . Dans le contexte d'une recherche de la sensibilité des protozoaires aux toxiques, les études récentes de DETCHEVA (31) sont d'un intérêt capital car 16 paramètres

sont analysés : DBO, DCO, oxygène dissous et indice de saturation, azote ammoniacal, nitreux et nitrique, température, pH, présence de Fe, Mn, phénols et cyanures. Ces facteurs sont mis en corrélation avec la distribution de 66 espèces de ciliés. L'auteur n'apporte aucun résultat d'analyses bactériologiques, la flore constituant pourtant un élément écologique important pour les espèces bactériophages. Les nombreux travaux de BICK (11 - 15) sur l'auto-écologie et la saprobiologie des ciliés, lui ont permis de déterminer les limites de tolérance de nombreuses espèces sur un nombre plus limité de paramètres. Les études de CAIRNS et coll. (21 - 23 - 24 - 25 - 26 - 81) ont surtout eu pour but l'estimation de l'impact des pollutions sur les communautés de protozoaires. Dans une revue bibliographique, CAIRNS, LANZA et PARKER (24) examinent les différents systèmes d'analyse directe des milieux naturels et les conséquences des pollutions sur les communautés aquatiques d'algues et de protozoaires. Ils mettent en évidence la complexité des interactions liées ou non à la pollution et capables d'influer considérablement sur la constitution des communautés. Ces interactions sont la source des difficultés d'application des méthodes d'études globales des effets de pollution.

L'intérêt primordial des études bionomiques est l'absence de stress due à l'étude elle-même. Les animaux sont prélevés dans les conditions naturelles de vie et fixés immédiatement. Les résultats obtenus reflètent les réactions réelles des organismes aux pollutions. Les conséquences écologiques et pratiques des observations ont une application immédiate pour les prévisions de l'effet global d'une pollution sur l'ensemble du système vivant, notion très précieuse sur le plan de la recherche appliquée.

L'étude du fonctionnement des biocoenoses peut être abordée par l'analyse multifactorielle et par une modélisation stochastique.

A côté de ces avantages, les méthodes bionomiques présentent des inconvénients très prononcés. Elles exigent des études taxonomiques très difficiles et longues car les différents groupes constituant les écosystèmes interagissent. Il faut connaître ces relations pour estimer les seuls effets de la pollution elle-même. Une étude continue du milieu pendant une période prolongée est indispensable. La reproductibilité des résultats est impossible du fait de l'indépendance totale des analyses entre elles : on ne peut obtenir aucune standardisation. On ne peut avoir la garantie d'avoir analysé la totalité des paramètres physico-chimiques intervenant sur le fonctionnement de la communauté même au prix d'un équipement d'analyse très complet et onéreux. L'analyse factorielle est une méthode d'approche extrêmement délicate d'interprétation. En particulier la détermination sélective de la toxicité d'un élément ou de la sensibilité d'une espèce est très aléatoire, du fait de la complexité du système étudié. Il en est de même pour l'examen de la bioaccumulation des toxiques par les populations de protozoaires.

Aucune automatisation des mesures ne peut être apportée, les résultats ne peuvent donc être obtenus qu'après de très longs délais.

Des modifications ont été apportées à cette technique, permettant l'établissement de communautés de protozoaires dans un laboratoire et le contrôle partiel de plusieurs paramètres. BICK et coll. (14 - 15), CAIRNS et coll. (29 - 31 - 32 - 72) ont étudié ainsi des communautés artificielles et estimé l'impact des pollutions physiques (en particulier les chocs thermiques) et chimiques sur les associations de protozoaires. SPOON et BURBANK (75) ont mis au point une méthode de collecte et d'établissement de ciliés sessiles permettant la pratique de tests de toxicité aigue ou chronique (19 - 20). Toutefois, les possibilités d'automatisation des mesures sont nulles et la longue durée des observations ne permet pas d'envisager ni l'application de ces techniques dans des tests standards, ni l'élaboration d'un modèle fixe satisfaisant.

En résumé, si les techniques bionomiques sont irremplaçables pour étudier les conséquences réelles d'une pollution, la longueur des analyses et la complexité de l'interprétation ne peuvent fournir une réponse rapide quant à l'effet d'un rejet particulier et sur les conséquences possibles au niveau des chaînes trophodynamiques composant les biocoenoses.

B - METHODES EXPERIMENTALES SUR CULTURES

Ce sont les techniques les plus répandues et les plus largement utilisées dans les domaines de la pollution et de la toxicologie. Par rapport aux études bionomiques, elles présentent un certain nombre d'avantages et d'inconvénients résumés dans le tableau I. Les méthodes expérimentales sur cultures ne permettent que rarement d'étudier les protozoaires dans des conditions naturelles de vie. De ce fait, l'extrapolation des résultats obtenus au laboratoire doit être nuancée d'une certaine prudence. Mais ces restrictions sont largement compensées par les avantages techniques et les possibilités d'application aboutissant à une grande simplification, et à la réalisation de modèles d'application très générale.

Les méthodes expérimentales n'obtiennent leur pleine efficacité qu'avec une bonne standardisation des techniques aussi bien celles des cultures que celles des tests. C'est ce problème de standardisation que nous nous proposons d'examiner à présent.

I. - Techniques de culture :

La mise au point de cultures de protozoaires destinées à des tests de toxicité doit tenir compte à la fois des exigences d'entretien prolongé de l'espèce choisie en culture pure (plusieurs années) et d'obtention de quantités suffisantes d'animaux par des cultures en masse. De plus, les protozoaires doivent être soumis à des conditions telles que leur réaction aux toxiques ne s'éloignent pas trop des réactions naturelles. Enfin, la stabilité des cultures doit être suffisante pour permettre d'obtenir des résultats reproductibles.

Conditions physiologiques du test	Etudes bionomiques et communautés entretenues au laboratoire	Etudes sur cultures pures
Conditions naturelles de vie	oui	non
Condition naturelle à un stress	oui	non
Interprétation écologique immédiate objective (sans extrapolation)	oui	non
Détermination taxonomique des échantillons	oui	non
Analyse physico-chimique de l'échantillon	oui	non
Reproductibilité de l'échantillonnage	non	oui
Standardisation	non	oui
Automatisation des mesures	non	oui
Toxicité aiguë	oui	oui
Toxicité chronique	oui	oui
Bioaccumulation des toxiques	non	oui
Etude d'un seul polluant	non ou très complexe	oui
Analyse factorielle	très complexe	oui
Modélisation	très complexe	oui

Tableau I : Conditions d'utilisation et possibilités d'application des méthodes bionomiques et des méthodes expérimentales pour les études de pollution et de toxicologie.

Quelle que soit la technique de culture employée, la composition minérale du milieu, en particulier sa concentration en sels dissous, son équilibre ionique et son pH jouent un rôle de premier plan dans le développement des cultures. Il est préférable, toutes les fois que cela est possible, d'utiliser un milieu minéral simple totalement défini. L'apport des éléments nutritifs organiques doit provenir de lots de fabrication dont la composition reste stable. Les milieux entièrement synthétiques sont ceux qui garantissent le mieux le contrôle des cultures de protozoaires.

1) Cultures agnostobiotiques :

Dans les cultures agnostobiotiques, une culture pure ou même un clone de protozoaires sont entretenus dans un milieu où la flore bactérienne n'est ni définie ni contrôlée. Afin d'éviter une prolifération trop active des microorganismes, nuisible la plupart du temps au maintien des ciliés dans un bon état physiologique, le milieu est pauvre en matières organiques, très souvent d'origine végétale. Si certains milieux sont bien définis et de standardisation facile (laitue lyophilisée, Cerophyl), d'autres comme l'eau de blé ou de riz (très hétérogène), les extraits de terre et de sphaigne (dont la composition est difficilement reproductible) sont plus difficiles à contrôler et il est préférable de les éviter.

La flore associée présente dans de telles cultures des fluctuations importantes qui se répercutent sur la croissance des espèces de ciliés bactériophages du fait de la différence de valeur nutritive des bactéries et par leur possibilité de sélection par les protozoaires prédateurs. L'adjonction massive d'une suspension pure de bactéries, le plus souvent Enterobacter aerogenes, permet d'obtenir au bout de plusieurs repiquages rapprochés sur un milieu non organique, une culture pratiquement

monoxénique. Mais la stabilité d'une telle culture n'est obtenue que sur un milieu purement minéral sans carbone ni azote assimilable. Une fraction de flore contaminante s'y maintient toujours à un niveau bas mais toutefois suffisant pour provoquer des perturbations, surtout en fin de culture, quand les Enterobacter sont pratiquement éliminés et que les déchets s'accumulent dans le milieu. Si la culture est repiquée dans un milieu organique, même après ensemencement et préincubation d'Enterobacter, la flore contaminante prend encore plus d'importance et la reproductibilité de la croissance n'est plus assurée.

Il est toutefois à noter que certaines espèces de protozoaires se cultivent mal en présence d'une seule espèce bactérienne, probablement par manque d'un élément essentiel ou à cause de modifications physico-chimiques induites par les microorganismes. Il est très souvent possible de trouver une espèce bactérienne permettant une culture prolongée. Dans le cas contraire, rarement rencontré, il faut soit accepter les inconvénients d'une culture agnostobiotique, soit renoncer au protozoaire considéré comme espèce test.

2) Cultures monoxéniques :

L'établissement d'une culture de protozoaires rigoureusement monoxénique exige une stérilisation préalable. Cette stérilisation peut s'effectuer par lavages répétés dans un milieu stérile (difficile pour les petites espèces) avant et après une stabulation de plusieurs heures afin que les vacuoles digestives du protozoaire puissent s'éliminer. Le traitement par antibiotique reste le plus pratique après isolement d'un clone. Un antibiogramme préalable permet le choix le plus judicieux à opérer. Lors de la période de contact avec les antibiotiques, un apport de bactéries tuées par la chaleur (65° à 80° pendant 2 h) facilite beaucoup la mise en culture monoxénique des protozoaires.

L'entretien et l'expérimentation sur ces cultures exigent des manipulations aseptiques. Mais cette méthode permet d'obtenir une standardisation très poussée des cultures par un contrôle absolu tant qualitatif que quantitatif, de la nourriture. Lors d'une expérimentation toxicologique, une contamination accidentelle faible n'a pas le temps de se développer suffisamment pour perturber les résultats si le milieu ne contient ni carbone, ni azote organiques.

3) Cultures axéniques :

Les cultures axéniques permettent le maximum de standardisation pour les manipulations. Le milieu est en effet rigoureusement défini et contrôlé. Mais ces cultures présentent les désavantages d'une grande complexité, exception faite pour quelques milieux déshydratés et commercialisés. La présence de particules en suspension étant indispensable à la nutrition de certains protozoaires (65 - 66 - 67 - 68), la standardisation de ces suspensions est très souvent impossible. La manipulation des cultures axéniques est plus difficile que celle des cultures monoxéniques ; la moindre contamination compromet une expérimentation en cours ou le maintien de la souche de collection. Dans certains cas, un maintien constant sous couverture antibiotique est indispensable. Dans ces conditions, il est difficile d'envisager l'utilisation de telles cultures pour des recherches de toxicité applicables dans le domaine de la pollution. Il devient en effet très aléatoire de considérer les réponses observées comme équivalentes aux phénomènes se produisant dans la nature.

L'examen des différentes techniques de cultures applicables nous a permis de constater que :

- La standardisation des cultures peut être de plus en plus poussée depuis les cultures agnostobiotiques jusqu'aux cultures axéniques. Or, cette standardisation améliore toujours la reproductibilité des résultats, qu'il s'agisse de tests ou de

précultures, par l'homogénéité obtenue d'une expérience à l'autre. Le tableau II permet de mieux comparer les techniques possibles dans l'optique de tests de toxicité. Ce sont les cultures monoxéniques, surtout en milieu non nutritif, qui offrent le maximum de possibilités d'applications avec des garanties suffisantes d'efficacité sans exiger les contraintes des cultures axéniques. Les cultures axéniques sont utilisables pour la recherche fondamentale, lorsque l'on veut posséder un "modèle" cellulaire pour expérimenter des toxiques. Quant aux cultures agnostobiotiques, elles ont l'avantage de pouvoir fournir sans préparation spéciale une réponse, peu précise souvent, mais toutefois interprétable ; en cela, elles peuvent être très utiles dans certains cas particuliers, par exemple pour appréhender grossièrement l'effet d'une pollution accidentelle massive.

II. - Techniques de test de toxicité :

Les méthodes d'étude de toxicité de substances vis-à-vis des protozoaires sont très nombreuses et font appel à différents critères :

- les études de morphologie (taille - forme) de structure (cytologie ultrastructurale) ou d'activité spécifique (mobilité, excitabilité, phagocytose) ;

- les études de toxicité aiguë entraînant la mort d'une partie ou de la totalité de la population considérée ;

- les études de croissance dans un milieu toxique.

Toutes ne sont pas applicables à l'élaboration de test de toxicité.

1) Méthodes morphologiques, structurales, éthologiques et biochimiques :

a) Morphologie :

La taille et la forme des protozoaires ont déjà été étudiées en présence de certains agents toxiques. Ainsi NEMETH et CSIK (58) ont étudié l'action de la colchicine et des rayons

		Milieu standard	Milieu non standard	Milieu organique	Milieu minéral non nutritif	axeniques
Conditions de vie "naturelle"		+	+	-	-	-
Réponse normale aux toxiques		+	+	-	-	-
Aspects techniques	Contrôle de la flore associée	- meilleur avec flore introduite type "Enterobacter"	-	+	+	éliminée
	Stérilisation préalable des cultures	-	-	+	+	+
	Manipulations aseptiques	-	-	+	+	+
	Standardisation	-	-	+	+	+
Applications	Echantillons stériles	+	+	+	+	+
	Echantillons non stériles	+	+	-	+	-
	Influence de la matière organique	-	-	+	-	+

Tableau II : Conditions physiologiques, exigences techniques et possibilités de test offertes par les différents types de cultures pures de protozoaires.

U.V. sur Tetrahymena pyriformis. MORRISSON et TOMKINS (56) ont posé les bases d'une méthode utilisant le volume cellulaire de Tetrahymena comme révélateur de l'action d'un toxique.

b) Etudes cytologiques et ultrastructurales :

L'étude des organites cellulaires (59) ou de l'ultrastructure (78) peut permettre de déceler une toxicité n'affectant pas la croissance ou la survie des protozoaires.

c) Teratogenèse :

La désorganisation de la division cellulaire chez les protozoaires peut permettre le dépistage de substances agissant au cours de la mitose. C'est de cette façon que le molybdène agit sur Euglena gracilis (28) et que le bromure d'éthidium est nocif vis-à-vis de Tetrahymena pyriformis (54).

Toutes ces techniques ne peuvent être applicables à l'élaboration de tests de routine car elles nécessitent des techniques longues (cytologie) ou peuvent être grévées d'un manque d'objectivité ou d'une lecture difficile (morphologie, taille, excitabilité et mouvements).

d) Ethologie :

L'excitabilité et le mouvement des protozoaires sont affectés par les toxiques à des seuils souvent très bas : les détergents et d'autres substances influencent nettement la mobilité (18 - 30 - 33 - 61) et le nickel provoque l'arrêt des mouvements ciliaires (3 - 4) ; d'autres toxiques provoquent l'aggrégation des ciliés (50). La mesure de la nutrition de Colpoda maupasii aux dépens d'une suspension bactérienne a fait l'objet d'un test standardisée en Allemagne Fédérale (17 - 60). On mesure la décroissance de la turbidité consécutive à l'assimilation des bactéries. Susceptible de nombreuses applications, cette méthode nécessite des milieux limpides et stériles. Comme la cinétique

de destruction de la suspension bactérienne dépend de la croissance de la culture de protozoaires, il est préférable de mesurer la multiplication qui est beaucoup plus significative sur le plan écologique et physiologique.

e) Etudes biochimiques :

Des méthodes biochimiques ont déjà été proposées pour mesurer l'activité métabolique (16 - 36 - 80). La mesure de l'ATP cellulaire (16) proposée pour la mesure de la productivité du phytoplancton n'a pas encore été utilisée comme test sur les protozoaires. Pourtant, les méthodologies actuelles, permettant de doser des quantités d'ATP inférieures à 10 pg ($1 - 10^{-11}$ g) devraient permettre l'application d'une telle méthode.

2) Tests de toxicité aigue ou tests de mortalité :

Les tests de mortalité ont été utilisés à plusieurs reprises pour l'essai de substances chimiques sur les protozoaires (5 - 6 - 7 - 8 - 19 - 20 - 25 - 27 - 70 - 79 - 83). La détermination de la dose létale pour la moitié de la population (DL_{50}) en un temps fixé est la plus connue. Si elle est d'application facile pour les toxiques provoquant une lyse cellulaire, elle est plus complexe quand la mort de la cellule s'accompagne d'une fixation partielle ou totale, car il faut distinguer les cellules mortes de cellules vivantes, travail souvent délicat, bien que certains auteurs affirment que les cellules mortes aient un aspect caractéristique (27). Il faut presque toujours séparer l'échantillon en gouttes dans lesquelles on compte les individus vivants. Si la taille du protozoaire est petite, la lecture sous microscope devient très vite difficile à assurer quand le nombre d'échantillons à analyser augmente.

Les méthodes explorant la viabilité des protozoaires ou aptitude à former un clone, sont plus intéressantes. HEAF et LEE (44) diluent une culture mère de Tetrahymena pyriformis de façon à obtenir une population telle que chaque aliquote prélevée (0,25 - 0,5 ou 1 ml) contienne 1 seul individu au plus. Les aliquotes sont mises en culture en salières ou dans des godets de plaques d'hémagglutination en matière plastique. La mesure de la proportion de clones obtenue après incubation fournit une bonne indication de la viabilité et peut servir de base à un test. La principale cause d'erreur, signalée par les auteurs, est la probabilité d'inoculer 2 ciliés dans la même aliquote. Toutefois, HEAF et LEE constatent que la technique donne des résultats irréguliers et incriminent la technique de culture. En fait, la proportion de godets inoculés varie de 2 à 16 pour 80 ; or la limite supérieure à ne pas dépasser pour ne pas inoculer 2 Tetrahymena conjointement est de 8 ciliés pour 80 godets ; ceci peut être une des causes des mauvais résultats observés. L'isolement de clones sur agar (38 - 57 - 79) est plus difficile à appliquer car les ciliés ne sont plus dans des conditions normales de vie. MOUTON et HENDRICKX (57) l'ont perfectionné en provoquant l'apparition de microbulles de liquide dans un milieu à la gélatine-agar coulé en boîte de Pétri. La culture diluée de ciliés est étalée sur la boîte et les ciliés passent de la surface du milieu dans les microbulles. On peut opérer de manière à n'obtenir qu'un cilié par microbulle. On suit ensuite le développement des clones par microphotographie au flash des zones inoculées et des protozoaires sur l'épreuve photographique. On peut observer aussi la morphologie et l'activité des ciliés en même temps que la viabilité ou la croissance.

3) Mesure de la modification de la croissance :

L'étude de la multiplication des protozoaires au contact d'une substance à étudier est une méthode plus sensible que l'étude de la mortalité et de mise en oeuvre plus facile ; la dose inhibant la croissance est plus faible que celle provoquant la mort cellulaire. Les différentes possibilités d'étude sont la comparaison des courbes de croissance, la mesure des taux de croissance ou la mesure de la croissance obtenue pendant un temps donné.

Le problème essentiel lié à ces méthodes est la technique d'estimation de la population (dénombrement des individus, ou mesure spectrophotométrique de la densité optique)... La mesure spectrophotométrique est très utilisée pour les cultures axéniques dans le cas où le milieu de culture est limpide (29). La concordance avec le développement de la population est bonne car on estime en quelque sorte la biomasse de protozoaires (nombre x taille). YAMAGUCHI et coll. (80) ont introduit une méthode de mesure de la croissance utilisant le dosage de protéines spécifiques de Tetrahymena pyriformis. Pour les cultures turbides, on doit procéder au dénombrement des individus. Les méthodes manuelles utilisent surtout des cellules hématimétriques (Nageotte) ou celles de Sedwig Rafter. SCHERBAUM (71) a développé une méthode standard permettant une erreur d'estimation inférieure à 6 %. Pour les petites populations on sépare l'échantillon en gouttes dans lesquelles on compte les individus. Les méthodes électroniques de comptage (Coulter Counter) tendent à être de plus en plus utilisées. 3 comptages peuvent être exécutés sur des volumes d'échantillon de 0,05 à 2 ml en 1 minute avec une précision moyenne de 2 %. On peut donc analyser 60 échantillons/heure et obtenir pour chacun d'eux une précision très satisfaisante. Le principal défaut des méthodes électroniques est leur absence de sélectivité. Toute particule est comptée. Une étude préalable et des précautions opératoires sont donc nécessaires pour éviter des interférences et des résultats aberrants.

a) Comparaison des courbes de croissance :

C'est la méthode qui nécessite le plus de dénombrements (5 - 10). Elle ne permet pas de définir parfaitement la totalité de la croissance si une partie de la courbe échappe à l'analyse en cas de multiplication lente. Il est possible de décaler dans le temps les cultures homologues. La reproductibilité doit alors être très précise. Le nombre de mesures à exécuter désavantage la méthode au profit de celles ne réclamant que quelques mesures (taux de croissance et croissance totale).

b) Mesure du taux de croissance :

La mesure de la modification du taux spécifique de croissance d'une population de protozoaires par les substances toxiques est une méthode rapide, nécessitant un minimum de mesures et possédant une signification écologique très importante car témoignant de la modification de dynamiques des populations. Elle a pu être appliquée avec succès à plusieurs types de protozoaires (29 - 41 - 61 - 71 - 76 - 77). Mais, du fait qu'un toxique peut allonger la phase de latence sans modifier le taux de croissance maximal par l'adaptation du protozoaire, il est difficile de définir le moment précis où l'on peut mesurer ce taux de multiplication. Il est donc nécessaire de suivre au moins une partie de la phase exponentielle et de calculer ensuite le taux de croissance en s'aidant de plusieurs points, ce qui augmente le nombre de mesures à faire et nous rapproche de la méthode des courbes de croissance.

c) Mesure du nombre de générations :

La mesure du nombre de générations obtenu pendant un temps donné est la méthode la plus simple pour mesurer l'effet toxique d'une substance. Elle met en évidence une diminution ou un retard de croissance. Deux mesures suffisent pour obtenir le résultat cherché. En effet, si D_0 est la population initiale

et D_t la population au temps t , pour une population se multipliant par division binaire :

$$D_t = 2^{rt} D_0$$

où le produit rt est le nombre de générations

$$rt = \log_{(2)} \frac{D_t}{D_0}$$

le calcul du nombre de générations offre un autre avantage, celui d'éliminer les effets multiplicatifs sur la dispersion des résultats provoqués par l'hétérogénéité de D_0 ou de l'action d'un toxique sur r , ces facteurs de fluctuations ne sont pas corrigés si l'on travaille avec D_t ou le rapport $\frac{D_t}{D_0}$ comme données numériques. Ces notions seront précisées ultérieurement. La mesure du nombre de générations peut s'opérer sur des populations d'abondance quelconque. Si le protozoaire est de taille suffisante, une méthode très intéressante a été introduite par PERSOONE et UYTTERSROT (63). On isole un seul individu à la pipette dans une saignée ou une concavité de plaques d'hémagglutination. L'opération est répétée 20 fois. A la fin du test, les individus ont formé un clone. Le nombre de générations (G) obtenues en fonction des n individus présents est : $2^G < n < 2^{G+1}$. Cette méthode permet à la fois des résultats rapides et le calcul de la dispersion des réponses individuelles. Seule la petite taille de l'espèce étudiée peut être une restriction à son emploi.

4) Conclusions :

Le tableau III montre les possibilités d'application offertes par les méthodes d'étude de toxicité. Parmi les méthodes physiologiques, seules la mesure de l'ATP des cultures et la phagocytose sont utilisables pour le travail. La mesure de l'ATP demande un appareillage très spécialisé et un nombre important de manipulations et de dosages.

		Aspects techniques				Applications		
		Possibilité de mesure objective quantitative	Standardisation des temps de test	Automatisation des lectures	Interprétation statistique et modélisation	Toxicité aigue	Toxicité chronique	Bioaccumulation des toxiques
Morphologie (taille et forme)		- +(taille)	+	- +(taille)	-	+	+	-
Etude cytologique		+	+	-	+	+	+	+
Reproductibilité et stabilité		-	+	-	-	+	+	-
Mesure de l'ATP cellulaire		+	+	+	+	+	+	+
Phagocytose des bactéries		+	+	+	+	+	+	+
50		+	+	-	+	+	-	-
viabilité	en milieu liquide	+	+	-	+	+	-	-
	sur gélatine agar	+	+	-	+	+	+	-
Courbes de croissance		+	-	+	+	+	+	+
Mesure du taux de croissance		+	-	+	+	+	+	+
Mesure du nombre de générations		+	+	+	+	+	+	+

Tableau III : Aspects techniques et domaines d'application des différentes méthodes de recherche de toxicité sur les protozoaires.

La phagocytose peut être gênée par les floculations très fréquentes dans les cultures de protozoaires. Les tests de mortalité offrent tous un certain nombre d'avantages mais ne permettent pas l'étude de l'accumulation des toxiques ; de plus les lectures ne peuvent être automatisées.

Ce sont les techniques de mesure de croissance qui offrent le plus large champ d'application. Elles ne permettent pas toujours de mettre en évidence des toxicités décelables uniquement au niveau du comportement ou de l'ultrastructure cellulaire, mais elles sont plus sensibles que les tests de mortalité. L'interprétation des résultats donne des indications sur l'influence probable des toxiques sur la dynamique des populations de protozoaires. Enfin, l'automatisation des mesures est possible et permet d'accélérer le travail et de réaliser des screenings. La mesure du nombre de générations constitue la simplification la plus poussée des tests par sa standardisation, le nombre de mesures exigées, et ses possibilités d'application.

C. - CONCLUSION GENERALE DE LA PREMIERE PARTIE

L'examen des techniques d'étude de toxicité, des méthodes de culture et des principes de test nous ont permis de dégager les problèmes principaux liés aux tests biologiques utilisant des protozoaires.

Si le résultat cherché est l'évaluation des conséquences d'un rejet sur le milieu dans son ensemble, la méthode la plus utile sera l'étude bionomique classique ou la méthode utilisant des communautés entretenues en conditions contrôlées.

Si des renseignements sur des éléments particuliers sont recherchés, les communautés de protozoaires maintenues au laboratoire et les cultures pures sont les plus faciles à utiliser.

Si le travail de recherche comprend l'examen de problèmes spéciaux (toxicité chronique, bioaccumulation et métabolisation des toxiques), les cultures pures standardisées sont indispensables. Pour l'établissement de telles cultures, il faudra veiller à garder un équilibre entre les exigences de contrôle des cultures et le respect des conditions de vie des ciliés, en particulier leur alimentation. Le respect de ces conditions est indispensable à une bonne reproductibilité des résultats.

Dans la partie suivante de ce travail, nous examinerons le matériel et les méthodes utilisés pour arriver à ce but. L'examen bibliographique nous ayant orienté vers un test basé sur l'étude du nombre de générations observé dans des cultures monoxéniques. L'espèce choisie, Colpidium campylum est un cilié bactériophage lié aux chaînes trophiques de type détritivores. Il est très répandu et présente des caractères cultureux intéressants :

- il a pu être aisément entretenu en culture monoxénique sur un milieu sans carbone, ni azote organiques
- sa croissance est rapide
- ses cultures se prêtent bien au comptage électronique
- sa taille lui permet de s'intégrer aisément dans une chaîne trophique
- sa grande activité bactériophagique permettait d'espérer la mise en évidence de fortes accumulations de toxiques dans un temps restreint.

Deuxième Partie : MATERIEL ET METHODES

Deuxième Partie : MATERIEL ET METHODES

I - SOUCHES

1) Bactérie :

Nous avons utilisé une souche d'Escherichia coli isolée d'un milieu pollué (souche 17082 de la collection du laboratoire, référence pour la Glu décarboxylase) pour l'entretien du Colpidium campylum et pour l'expérimentation.

2) Colpidium campylum (Stokes) :

Il a été isolé d'un étang d'épuration tertiaire local après enrichissement de l'eau sur une suspension d'E. coli. Après isolement d'un clone, celui-ci a été stérilisé et remis en culture monoxénique.

II - MILIEUX ET METHODES DE CULTURE

1) Milieux pour la culture d'Escherichia coli :

- Bouillon nutritif

Peptone	10 g
Extrait de viande	4 g
NaCl	5 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 7,2

Stérilisation 20 minutes à 120°C

- Gélose nutritive :

Peptone	10 g
Extrait de viande	4 g
NaCl	5 g
Agar	13 g
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 7,2

Stérilisation 20 minutes à 120°C

La souche d'Escherichia coli est entretenue sur gélose nutritive inclinée en tube et repiquée toutes les semaines.

2) Cultures en masse et récolte d'E. coli :

Des tubes contenant 10 ml de bouillon nutritif sontensemencés avec une culture sur gélose pour obtenir un léger louche. Les tubes sont inoculés à 37°C pendant 6 à 7 heures jusqu'à obtention d'une culture franche. Ils constituent l'inoculum pour la gélose nutritive coulée en boîtes de Roux. Après incubation de 20 heures à 37°, on récolte les bactéries dans le milieu minéral standard décrit plus loin et on centrifuge à 3500 tours pendant 20 minutes. Le surnageant est rejeté et les culots sont repris par un minimum de milieu minéral et homogénéisés au Vortex.

La suspension est ensuite ajustée à une densité optique équivalente à une suspension de Kieselguhr ou Terre d'Infusoire à 8 g/l. La densité optique est prise au spectrophotomètre (Junior II Jouan) à une longueur d'onde de 650 nm ($D_0 = 1,2$). Cette suspension ajustée constitue la solution mère de bactéries.

3) Milieu pour les cultures de Colpidium campylum :

Base

Ca (NO ₃) ₂	200 mg
Mg SO ₄	20 mg
NaCl	20 mg
Fe SO ₄	trace
Eau distillée qsp	1000 ml

pH 6,5 - 6,7

Filtration sur membrane Millipore de 0,45 μ .
Stérilisation 20 minutes à 120°C après répartition dans des flacons rincés préalablement avec de l'eau filtrée sur membrane Millipore de 0,45 μ . Dans 50 ml de milieu, on ajoute 5 ml de suspension mère de bactéries.

4) Stérilisation et mise en culture monoxénique :

La stérilisation du cilié a été obtenue, après antibiogramme préalable par la méthode suivante : 1 ml de solution de dihydrostreptomycine à 1,5 et 10 mg/ml sont ajoutés à 9 ml de culture agnostobiotique de Colpidium campylum. On ajoute dans chaque tube une goutte de suspension épaisse d'E. coli tué par la chaleur (60 minutes à 80°C). Des tests de stérilité sont effectués au bout de 24 et 48 heures, et les tubes stériles repiqués dans le milieu standard additionné d'E. coli.

5) Entretien des souches de Colpidium :

Les cultures sont repiquées hebdomadairement dans le milieu standard à raison de 5 ml de ciliés pour 55 ml de milieu préparé. La pureté de ces cultures est contrôlée soigneusement avant repiquage par isolement sur milieu d'identification pour bactéries coliformes. Les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions que les cultures de collection.

6) Cultures en masse de Colpidium campylum :

Pour l'expérimentation, on utilise des précultures de ciliés de 72 ou 96 heures. Ces précultures sont exécutées en inoculant 1/12 (v/v) de ciliés dans le milieu minéral additionné de bactéries (conditions identiques à celles des collections).

Toutes les cultures de Colpidium campylum ont été réalisées à 20°C à l'obscurité.

III - METHODES DE DENOMBREMENT DES INDIVIDUS ET DE MESURE DE LA BIOMASSE

Le travail devant porter à la fois sur la toxicité et la bioaccumulation de toxiques vis-à-vis de Colpidium campylum, il nous a fallu à la fois dénombrer les populations et tenter d'estimer la biomasse. Pour ce faire, nous avons adopté le comptage électronique, permettant d'apprécier ces deux variables et accélérant beaucoup le travail de dénombrement.

1) Etude de l'appareillage :

Les dénombrements ont été effectués grâce à un Coulter Counter Z_{Bic}. Les mesures de biomasse ont été effectuées grâce à un analyseur dimensionnel P 64 - XY et un intégrateur M.C.V. Hématocrite.

Le Coulter Counter Z_{Bic}

Cet appareil permet de dénombrer un à un les protozoaires mis en suspension dans un électrolyte et d'en effectuer la sélection en volume. L'organe détecteur est un microorifice incorporé à un tube plongeant dans la suspension. De part et d'autre de ce microorifice sont placées deux électrodes en platine entre lesquelles est appliqué un courant continu. En passant au travers de l'orifice, les particules déplacent un volume d'électrolyte égal à leur propre volume faisant varier ainsi la résistance de l'orifice, la valeur de cette variation ou impulsion est directement proportionnelle au volume des particules. L'échantillon à analyser est aspiré à travers l'orifice par l'intermédiaire d'un manomètre à mercure.

L'analyseur dimensionnel P 64 - XY

L'analyseur P 64 recueille et classe chaque impulsion envoyée par le Coulter Counter en fonction de son intensité dans l'une des 64 classes de mémoire d'accumulation, de capacité allant de 64 à 4096 impulsions. L'analyseur peut fonctionner de 3 manières différentes :

- analyse des particules contenues dans un échantillon de 0,05 - 0,5 ou 2 ml ;
- analyse des particules passant dans l'orifice pendant un temps donné, réglable de 1 à 999 secondes ;
- cumulation des impulsions poursuivies jusqu'à ce que la mémoire correspondant à la classe modale contienne un nombre d'impulsions réglable de 64 à 4096.

Cette dernière méthode permet de comparer directement la distribution d'échantillons où la population de ciliés est très différente. Le nombre de particules de la classe modale est toujours identique. L'analyseur P 64 permet le traçage de la courbe de distribution. A partir de ce graphique, il est possible de calculer, par lecture point par point et regroupage en classes, l'histogramme de distribution des ciliés et de calculer la taille moyenne des cellules ainsi que l'écart type de la distribution. Ce travail a été réalisé sur calculateur électronique (voir chapitre calcul).

L'intégrateur M.C.V. Hématocrite

Il est à l'origine destiné au calcul du volume moyen des hématies et à celui de l'hématocrite des échantillons sanguins. Nous avons pu montrer qu'il était adaptable à la mesure de la taille moyenne des ciliés et au biovolume total des populations de Colpidium campylum par comparaison aux données obtenues avec l'analyseur P 64 - XY. Cet appareil intègre les impulsions et détermine automatiquement la taille moyenne des protozoaires. Cette valeur, multipliée par le résultat du dénombrement, donne le biovolume total contenu dans l'échantillon. Le biovolume total constitue une approche indirecte de la biomasse des protozoaires.

2) Etalonnage des appareils :

Pour connaître exactement les volumes mesurés et les seuils de comptage, il faut étalonner les appareils avec des suspensions de particules calibrées de taille connue, proche de celle des animaux à dénombrer. Nous avons utilisé une suspension de pollen de noisetier de $21,3 \mu$ de diamètre de sphère équivalente (Coultronics France). Le Coulter Counter a été ensuite réglé pour compter tous les protozoaires sans pour cela totaliser les particules parasites. L'acquisition de l'analyseur P 64 - XY faite ultérieurement a beaucoup facilité le contrôle ou la rectification de l'étalonnage. L'enregistrement graphique visualise

immédiatement le seuil de comptage à adopter pour les numérations. Nous avons ainsi pu apporter des corrections à nos réglages initiaux.

C'est pour éliminer les bruits de fond causés par des particules parasites en suspension que le milieu de culture a été systématiquement filtré sur membrane Millipore de $0,45 \mu$ avant répartition et stérilisation dans des flacons rincés à l'eau propre.

Les réglages utilisés pour l'appareillage ont été les suivants :

Coulter Counter Z_{Bic}

diamètre du microorifice	200 mcm
impédance d'entrée	10 K Ω
trimmer de gain	0
courant d'ouverture	1
atténuateur	1/2
seuil inférieur de comptage	10
seuil inférieur de détection des particules	10 mcm de diamètre de sphère équivalente

Analyseur P 64 - XY

nombre d'individus dans la classe modale	128
seuil	3
100 X	20000 mcm ³ (avec atténuateur Coulter : 2)
100 Y	128 individus

Intégrateur M.C.V. Hématocrite

volume moyen = 1 unité M.C.V. = 100 mcm³

3) Préparation des échantillons et méthodes de mesure :

Numération

Les échantillons doivent être fixés avant toutes les mesures. Celles-ci sont réalisées dans des récipients à fond plat en matière plastique d'une contenance de 25 ml. Ces récipients sont rincés avant usage avec la solution suivante, filtrée sur membrane Millipore de 0,45 μ :

NaCl	7 g
Eau distillée qsp	1 l

On ajoute alors dans chaque récipient 10 ml de solution fixatrice préalablement filtrée sur membrane Millipore 0,45 μ .

NaCl	10 g
Formaldehyde à 30%	75 ml
Eau distillée qsp	1 l

pH 7

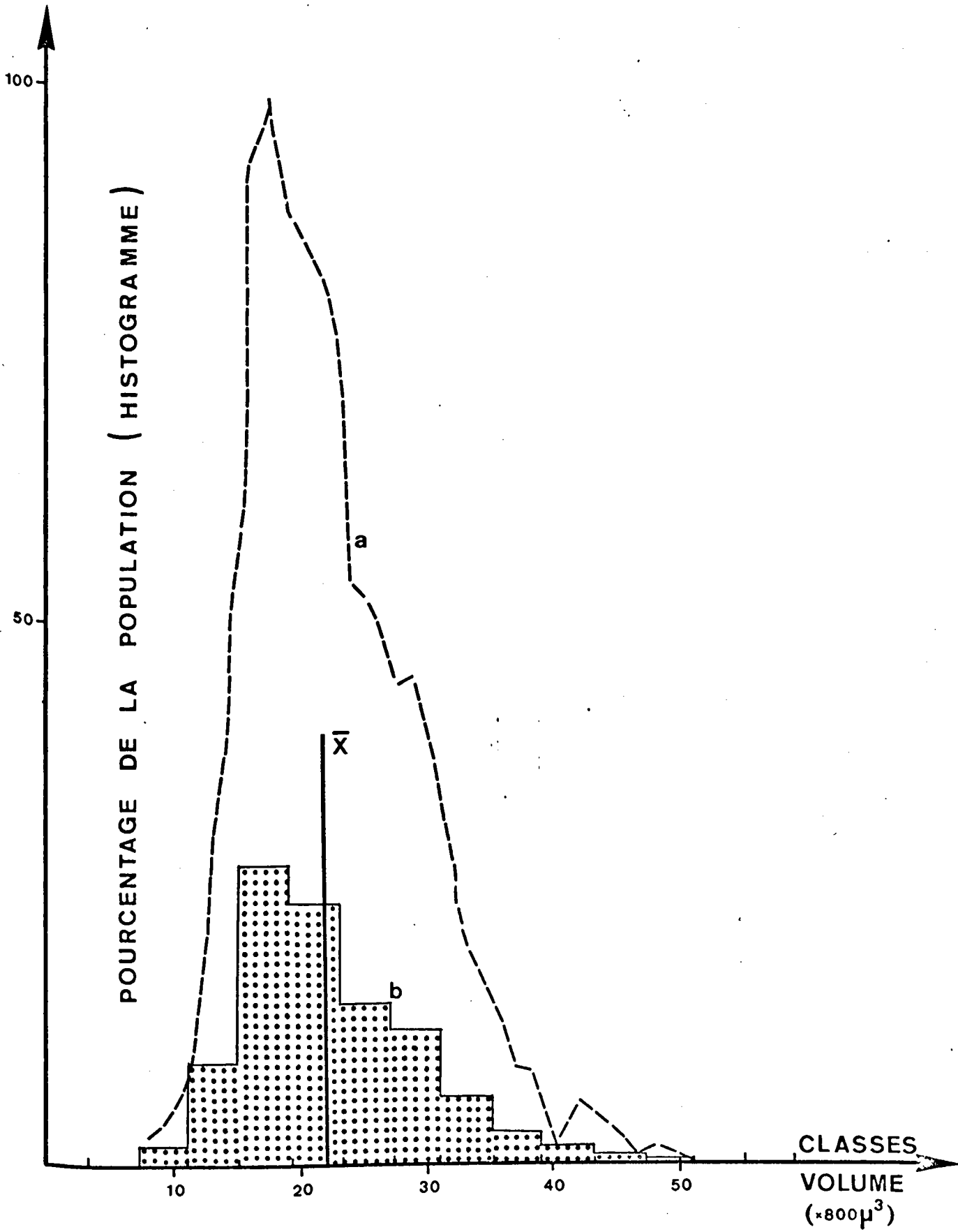
On ajoute 5 ml de culture de Colpidium, on homogénéise et on pratique trois numérations au Coulter Counter (0,5 ml analysé à chaque numération). L'échantillon étant dilué 3 fois et le comptage effectué sur 0,5 ml, la somme des trois numérations équivaut à la population réelle contenue dans 0,5 ml de culture.

Mesure de la taille moyenne

Pour ces études on utilise 14 ml de fixateur et 7 ml de culture. Avec l'analyseur P 64 - XY, on effectue un enregistrement graphique de la distribution de la population (fig. 1:a). On calcule ensuite l'histogramme (fig. 1:b) de répartition en 24 classes par une lecture de la courbe point par point en regroupant 4 valeurs de x dans une classe. On peut ainsi calculer la taille moyenne des ciliés (x) et son écart type.

Figure 1 : Enregistrement graphique et calcul du volume moyen cellulaire et de la distribution à l'aide de l'analyseur P 64 XY.

NOMBRE RELATIF DE CELLULES (GRAPHIQUE)



Troisième Partie : RESULTATS

L'intégrateur M.C.V. Hématocrite fournit directement le volume moyen des protozoaires mais ne donne aucune indication sur la distribution. Il est utilisé uniquement pour le calcul de routine du biovolume total quand l'analyse fine de la population n'est pas nécessaire.

IV - METHODES DE CALCUL

Les analyses statistiques et les calculs nécessaires à ce travail dépassaient très largement les possibilités manuelles. Nous avons donc réalisé ces travaux sur un calculateur électronique de table (MONROE 1860) possédant un certain nombre de fonctions statistiques standard et un langage de programmation de type B.A.S.I.C. +.

Faute de programmes standards commerciaux adaptables, nous avons élaboré des programmes spécifiques de calcul afin de faciliter l'entrée et le traitement des données. Nous avons ainsi automatisé les calculs suivants :

- analyse de variance et de covariance après transformation logarithmique des données numériques ;
- analyse des courbes de distribution de l'analyseur P 64 - XY et sortie de l'histogramme, de la moyenne et de l'écart type. Calcul du biovolume total ;
- régressions linéaire et curviligne (fonction $\log x$, $\frac{1}{x}$, e^x , parabole) ;
- analyses factorielles et calcul de la surface de régression.

Les méthodes de calcul et les principes statistiques utilisés ont été trouvés dans les ouvrages de LISON (51), SNEDECOR et COCHRAN (74) et SCHWARTZ (72).

Troisième Partie : RESULTATS

Chapitre I : Développement d'une méthode de test standardisée.
=====

I - PRINCIPE DE TEST ADOPTE

Le principe de test adopté est la mesure du nombre de générations en un temps fixé dans des cultures de Colpidium campylum nourries avec des quantités constantes d'Escherichia coli.

On calcule le nombre de générations moyen obtenu dans des séries de cultures réalisées avec et sans toxique puis on recherche par analyse statistique si la différence observée est significative.

Le développement de la méthode employée doit tendre à diminuer le plus possible les erreurs dues à la dispersion des résultats afin d'augmenter la sensibilité. Les causes de dispersion qui seront examinées successivement sont :

- le nombre de flacons de culture dans chaque série ;
- le temps de culture ;
- les interrélations existant entre les termes de la relation :

$$NG = \text{Log}_{(2)} \left(\frac{D_1}{D_0} \right) = \text{Log}_{(2)} D_1 - \text{Log}_{(2)} D_0$$

II - INFLUENCE DU NOMBRE DE REPLIQUES ET DU TEMPS DE CULTURE

Nous avons étudié simultanément l'influence du nombre de répliques (3, 5, 10, 15 flacons par série) et du temps de culture (22, 29, 43 h) sur la précision obtenue dans la mesure de la croissance exprimée sous trois formes différentes, D_1 , $\frac{D_1}{D_0}$ et NG, ceci afin de montrer l'influence de la forme des résultats sur la précision obtenue.

1) Principe de manipulation :

33 flacons de milieu standard préparé sontensemencés avec 5 ml d'une préculture de Colpidium campylum de 96 heures. Les flacons sont ensuite regroupés en 4 groupes par tirage au sort ; cette méthode permettant de former les groupes au hasard :

- A : 3 flacons
- B : 5 flacons
- C : 10 flacons
- D : 15 flacons

Un prélèvement est effectué pour mesurer la population initiale. Les cultures sont ensuite dénombrées au bout de 22, 29 et 43 heures.

2) Résultats :

Pour chaque groupe, on calcule la moyenne \bar{X} et l'intervalle de confiance ($I_{\bar{X}}$) de D_1 , $\frac{D_1}{D_0}$ et NG aux seuils de probabilité de 5 % et de 1 % ; on exprime ensuite le quotients $\frac{I_{\bar{X}}}{\bar{X}}$ en pourcentage de \bar{X} ($\bar{X} \pm \frac{I_{\bar{X}}}{\bar{X}}$)

Le tableau IV regroupe les valeurs de $\frac{I_{\bar{X}}}{\bar{X}}$ obtenues aux différents temps de culture pour chaque série et chaque variable employée, $\frac{I_{\bar{X}}}{\bar{X}}$ exprimant alors la précision des résultats.

La précision obtenue sur la moyenne est plus grande quand le nombre de flacons par série augmente. Le gain est particulièrement important, surtout au seuil de probabilité de 1 %, quand on passe de 3 à 5 flacons. L'amélioration est plus faible ensuite pour une augmentation du nombre de flacons identique. Ces résultats sont conformes à la théorie statistique de l'intervalle de confiance de la moyenne qui est égal au quotient $\frac{\text{écart type}}{\sqrt{\text{nombre de données}}}$.

	Nombre de flacons par série				Seuil de probabilité
	3	5	10	15	
D_0	11,2	6,06	4,2	5,1	5 %
	25,8	10,02	6	7,1	1 %
D_1	56	3,9	3,9	4,3	5 %
	129	6,5	5,6	6	1 %
$\frac{D_1}{D_0}$	48	8,6	5,9	5,5	5 %
	111,9	14,3	8,5	7,6	1 %
NG	29	5,7	3,5	3,4	5 %
	68	9,5	5	4,8	1 %
D_1	53	11,6	7	5	5 %
	123	19,6	10	7	1 %
$\frac{D_1}{D_0}$	47	17,4	9,1	5,9	5 %
	110	28,8	13,1	8,2	1 %
NG	21	7,8	3,7	2,5	5 %
	48	12,5	5,4	3,5	1 %
D_1	17,1	5,7	4,1	2,1	5 %
	39,5	9,5	5,9	2,9	1 %
$\frac{D_1}{D_0}$	13	11,3	6	6,1	5 %
	31	18,7	8,7	8,5	1 %
NG	5,6	4,7	2,3	2,5	5 %
	13	7,8	3,4	3,5	1 %

Tableau IV : Croissance de Colpidium campylum exprimée par la mesure de D_1 , D_1/D_0 , et NG en fonction du temps. Intervalle de confiance rapporté à la moyenne $\frac{\bar{IX}}{\bar{X}} \times 100$ en fonction du nombre de flacons par série au seuil de probabilité de 5 % et 1 %.

La dispersion obtenue dans les résultats est minimale en utilisant le nombre de générations et augmente avec D_1 et $\frac{D_1}{D_0}$ comme variables, exception faite pour les mesures de D_1 à la 22ème heure de culture. Cette constatation est en bon accord avec la loi de croissance exponentielle. Quand le nombre de générations augmente linéairement (ΔNG), D_1 est multiplié par $2^{(\Delta NG)}$. La transformation des données par le calcul du nombre de générations permet d'éliminer cet effet multiplicatif sur la dispersion des résultats.

L'intervalle de confiance diminue quand le temps de culture s'allonge, donc quand on s'approche de la phase stationnaire de culture. Ceci plaide en faveur d'une part d'une hétérogénéité du taux de croissance pendant la phase exponentielle et d'autre part d'un rendement constant de la croissance.

Ce dernier point sera examiné plus loin. Compte tenu des dispersions obtenues pour D_0 , on constate que le calcul du nombre de générations permet d'emblée l'élimination d'une partie au moins de la dispersion due aux fluctuations de la densité initiale.

Une expérience complémentaire nous a permis de préciser l'influence du temps de culture sur la précision des résultats. Cette étude a été réalisée sur 18 séries témoins échelonnées sur une période de 6 mois. Pour chaque série, nous avons calculé le coefficient de dispersion

$$V = \frac{S = \text{écart type de la série}}{X = \text{moyenne de NG}} \text{ et nous avons calculé}$$

\bar{V} moyen et son écart type pour des temps de culture de 19, 24 et 43 heures, ce dernier temps correspondant à la phase stationnaire

du témoin. Les résultats regroupés dans le tableau V confirment ceux de la première expérience et révèlent une hétérogénéité plus grande pendant la phase exponentielle de croissance. Le temps de culture de 43 heures qui correspond à la phase stationnaire des cultures sans toxique, est celui qui permet d'obtenir le minimum de dispersion dans le témoin.

3) Conclusions :

Ces travaux préliminaires nous ont permis de dégager plusieurs conditions correspondant à la réduction de l'erreur expérimentale :

- la mesure du nombre de générations est la méthode la plus précise ;
- le temps optimal de test est de 43 heures ;
- le nombre de répliques dans chaque série est primordial. 5 flacons permettent d'espérer une précision meilleure que 10 % au seuil de probabilité d'erreur de 0,01. Cela nous a semblé suffisant pour pouvoir obtenir la sensibilité recherchée sans alourdir les techniques de recherche par un trop grand nombre d'ensemencements et de lectures.

III - FACTEURS DE VARIATION DU NOMBRE DE GENERATIONS

La méthodologie proposée ici n'est applicable que si plusieurs conditions sont parfaitement remplies :

- la reproductibilité de la croissance doit être suffisante pour permettre des études échelonnées sur des périodes prolongées ;
- la méthode statistique applicable à l'analyse des résultats dépendra de l'existence ou de l'absence d'une relation entre le nombre de générations (variable utilisée pour les calculs)

Temps	19 h	24 h	43 h
\bar{V}	0,100	0,050	0,025
S_V	0,05	0,02	0,01
Nombre de données	18	18	18

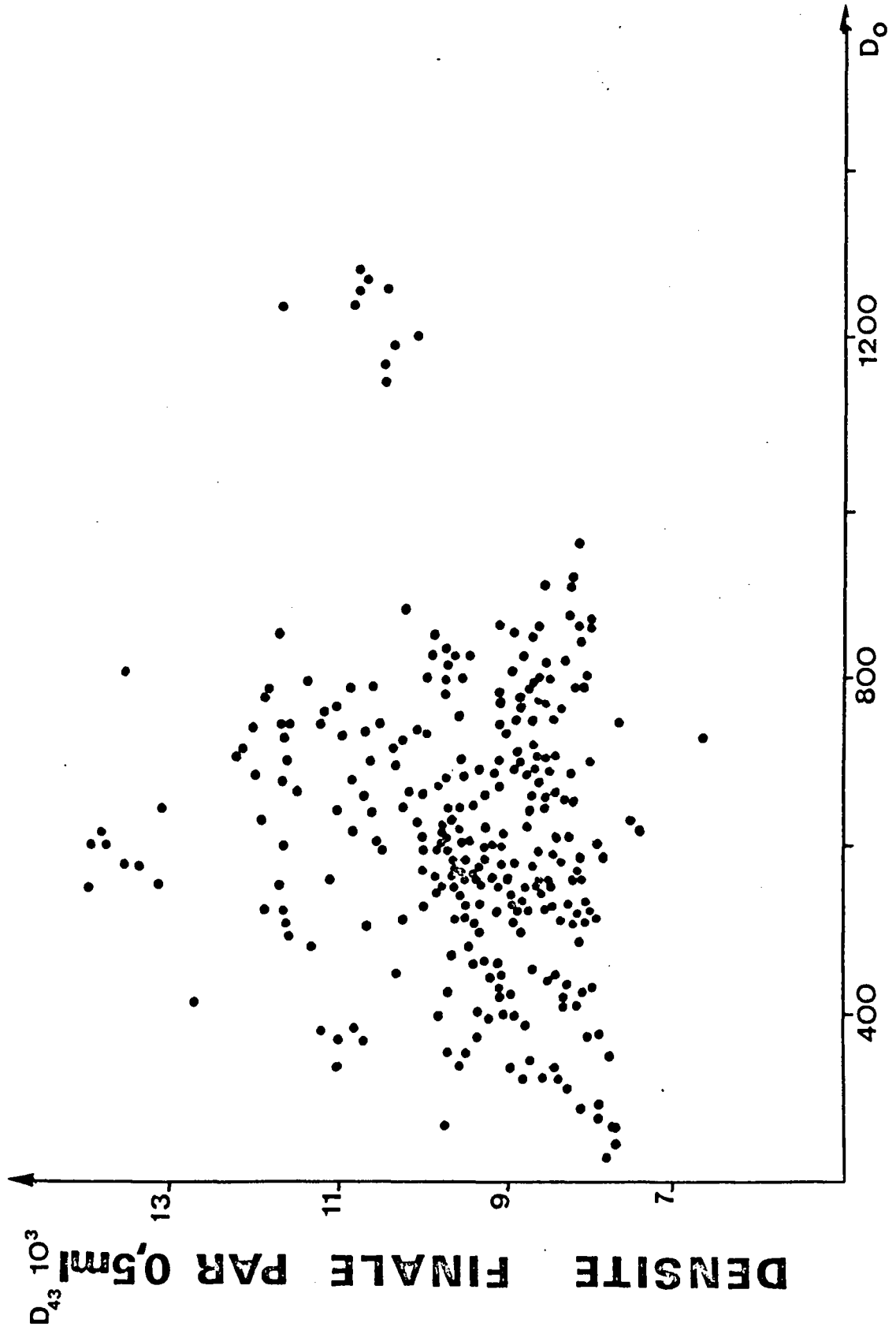
Tableau V : Coefficient de dispersion du nombre de générations moyen en fonction du temps de culture.

et les mesures effectivement réalisées (numération de population au temps 0 et 43 heures). L'influence éventuelle de la dispersion des densités initiales moyennes des séries, au départ de chaque expérience, doit pouvoir être corrigée. Il faut déterminer de quelle manière les instruments de mesure peuvent modifier les résultats en fonction de leur réglage.

Dans la relation $NG = \text{Log}_2 D_{43} - \text{Log}_2 D_0$, les valeurs D_{43} et D_0 peuvent retentir sur NG. D_{43} représente la population à la phase stationnaire. Comme les cultures sont réalisées avec des quantités toujours identiques d'E. coli D_{43} doit être approximativement constant ; dans ces conditions, il est intéressant de vérifier l'indépendance de D_{43} et D_0 . Cette relation établie pour les flacons témoins au cours de la mise en application du test durant les années 1973 et 1974 est reportée sur les figures 2 et 3. Dans les deux cas, les nuages de points sont très étendus, la dispersion plus marquée pour l'année 1973 ; il ne semble pas y avoir de corrélation entre D_{43} et D_0 . Pour démontrer l'absence de relation, déjà apparente sur les graphiques, nous avons calculé pour chaque période la corrélation existant entre D_0 et D_{43} , les résultats étant consignés dans le tableau VI. Si la corrélation est significative dans les deux cas au seuil de 1 %, la variation de D_{43} liée à D_0 est trop faible (2 et 16 %) pour que l'on puisse considérer qu'il existe une liaison réelle entre la densité initiale et la densité finale dans les cultures.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la relation $NG = - a \text{Log}_2 D_0 + C^{te}$ (1) et la possible assimilation dans le cadre du travail à l'équation (2) $NG = a' D_0 + C^{te}$, ceci afin de faciliter les calculs statistiques en routine. En effet, s'il existe une relation entre NG et D_0 , la dispersion des valeurs du nombre de générations autour de la moyenne sera en partie due

Figure 2 : Relation entre la population initiale et la population finale. Année 1973.

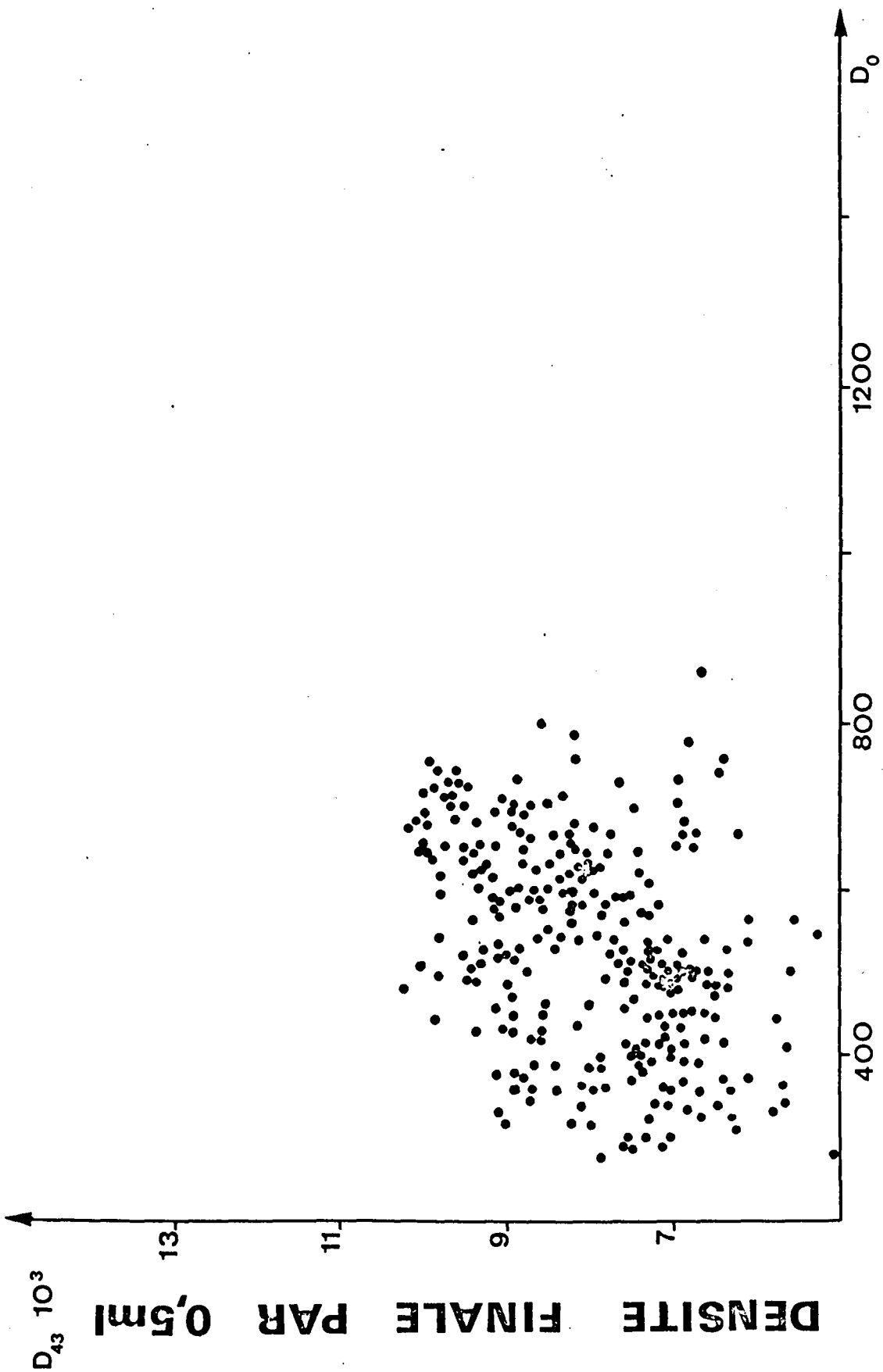


DENSITE INITIALE PAR 0,5ml

Année	Equation générale	Coefficient de corrélation (r) et degrés de liberté (dl)	Signification du coeff. corr.	Variation de D_{43} liée à D_0 (r^2)
1973	$D_{43} = 1,19 D_0 + 8757$	$r = 0,16$ d.l = 296	1 %	0,02
1974	$D_{43} = 3,66 D_0 + 6036$	$r = 0,40$ d.l = 280	1 %	0,16

Tableau VI : Etude de la corrélation existant entre D_{43} et D_0 pour deux années consécutives.

Figure 3 : Relation entre la population initiale et la population finale. Année 1974.



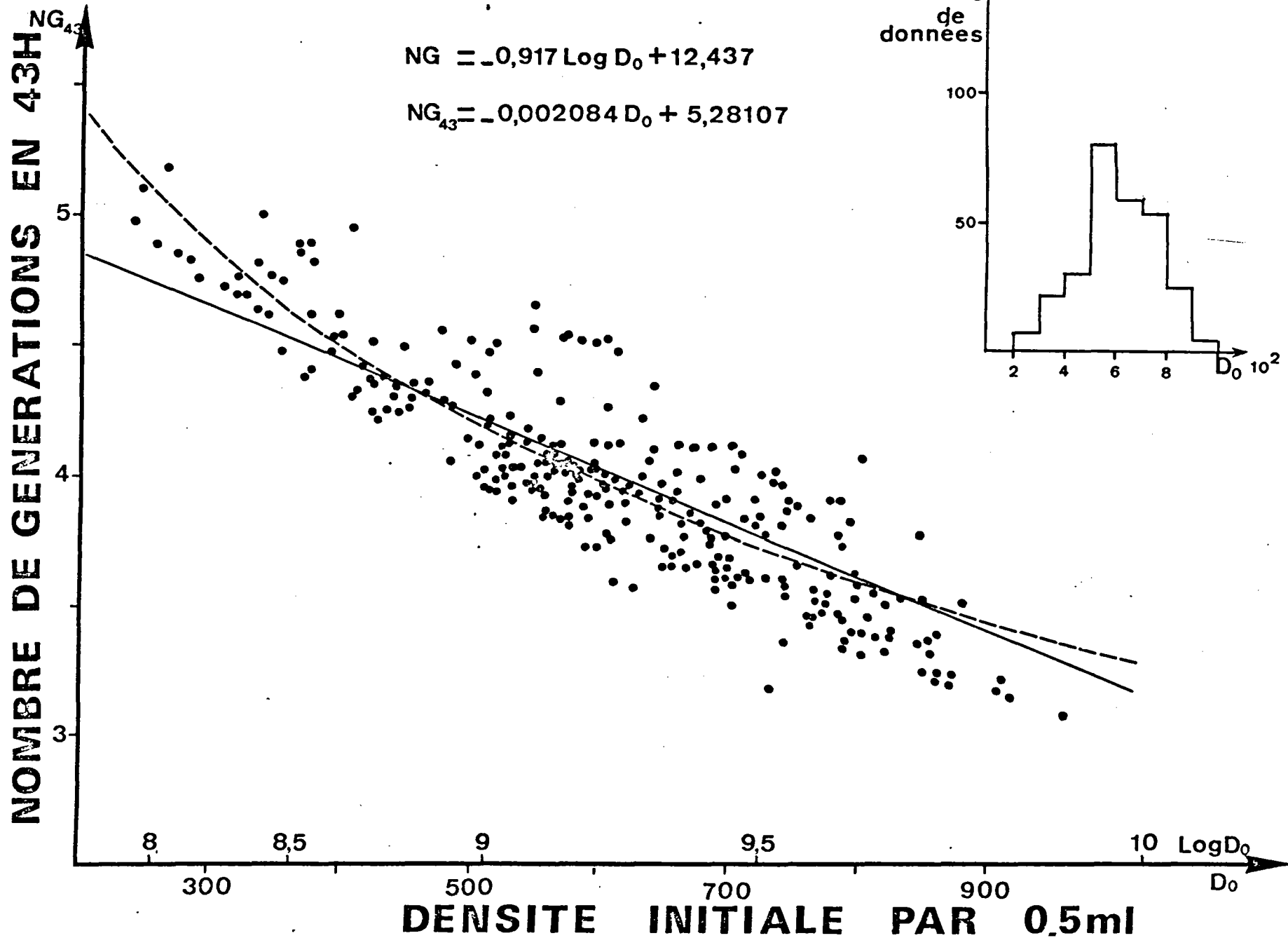
DENSITE INITIALE PAR 0,5ml

à D_0 . Chaque valeur individuelle de NG peut s'exprimer par une relation de la forme : $NG = \overline{NG} + a + b + c D_0 + d$ où \overline{NG} est la réponse moyenne vraie de la série étudiée, a est l'effet du traitement reçu, b est l'effet des conditions d'expérience, c D_0 est l'effet dû à D_0 et d est la variabilité spécifique de la population dont on mesure le nombre de générations, l'écart à la moyenne est représenté par la somme algébrique de $(a + b + c D_0 + d)$. Dans cette expression c'est la mesure de a que l'on recherche expérimentalement. b et d sont contrôlables mais ne peuvent être supprimés. Le facteur c D_0 peut être éliminé par l'analyse statistique s'il est linéaire en D_0 . Sa prise en compte diminue les écarts observés autour de la moyenne \overline{NG} .

Les résultats obtenus au cours des années 1973 et 1974 sont consignés respectivement dans les tableaux VII et VIII et illustrés par les figures 4 et 5 dans lesquelles les valeurs de NG ont été calculées à partir de l'équation (1). Dans les tableaux, nous avons étudié la valeur de la corrélation (r) entre NG et D_0 selon les régressions logarithmiques et linéaires dont nous avons établi les équations par la méthode des moindres carrés. Nous avons estimé la variation de \overline{NG} liée à D_0 (estimation du terme c D_0), et la précision obtenue sur la pente des deux équations. Nous avons ensuite calculé les valeurs théoriques de NG pour D_0 compris entre 300 et 800 selon les deux modèles de régression et l'intervalle de confiance obtenu pour ces valeurs. Nous avons alors recherché la possibilité de coïncidence entre les 2 équations. Sur les figures 4 et 5, les lignes de régression ont été tracées à partir des équations théoriques.

Pour l'année 1973 (fig. 4) la non-linéarité de la relation est très visible d'après la distribution des 197 points de mesure, en particulier pour les faibles valeurs de D_0 . La

Figure 4 : Relation entre le nombre de générations en 43 heures
et la population initiale. Année 1973.



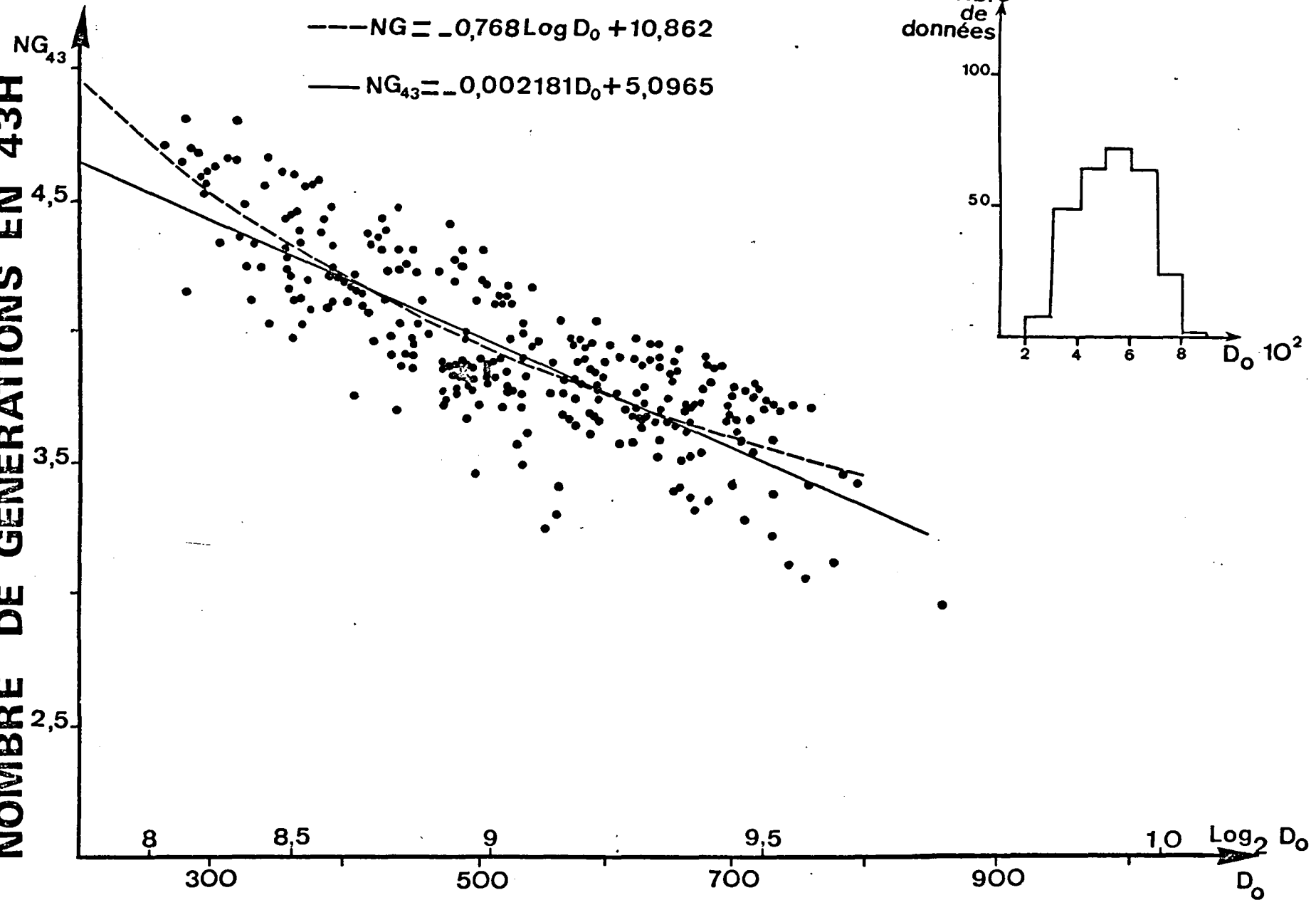
	<i>Equation logarithmique (1)</i>	<i>Equation linéaires (2)</i>
Equation générale	$- 0,917 1 \text{ Log}_{(2)} D_0 + 12, 437 4$	$NG = - 0,002084 D_0 + 5,28107$
Coefficient de corrélation (r)	$0,90 r_{(0,01)} = 0,113$	$0,88 r_{(0,01)} = 0,113$
Variation de NG lié à D_0	81 %	77,7 %
Signification de la pente	$t = 36,4 \quad t_{197-1} (0,01) = 3,29$	$t = 32,12 \quad t_{197-1} (0,01) = 3,29$
Intervalle de confiance de la pente	$I_{(0,05)} = 0,0493$ $I_{(0,01)} = 0,0649$	$I_{(0,05)} = 0,000127$ $I_{(0,01)} = 0,000167$

Valeurs de D_0	Valeurs de NG calculées par (1)	Valeurs de NG calculées par (2)	Correspondance entre valeurs compte-tenu de l'intervalle de confiance	
			$p = 0,05$	$p = 0,01$
300	4,89	4,65	-	-
400	4,51	4,45	+	+
500	4,21	4,24	+	+
600	3,97	4,03	-	+
700	3,77	3,82	-	+
800	3,59	3,61	+	+

Tableau VII : Etudes des corrélations logarithmiques (1) et linéaires (2) entre NG et D_0 . Correspondances entre les valeurs de NG obtenues à partir de (1) et (2) compte-tenu de l'intervalle de confiance de la moyenne de ces relations. Période 1973

Figure 5 : Relation entre le nombre de générations en 43 heures
et la population initiale. Année 1974.

NOMBRE DE GENERATIONS EN 43H



DENSITE INITIALE PAR 0,5ml

corrélation est donc plus précise avec la régression logarithmique. On note également une asymétrie marquée dans la distribution des valeurs de D_0 . Ces observations sont confirmées par l'examen de l'analyse statistique du tableau VII. La corrélation est très légèrement plus faible dans la régression linéaire et la réduction de l'erreur due à D_0 moins importante. Il n'y a correspondance entre les 2 types de régression compte tenu de l'intervalle de confiance que si l'on se place dans des intervalles de confiance larges (1 %) et pour $400 < D_0 < 800$. Seules des modifications très importantes de la croissance (significatives à moins de 1 % d'erreur) seront mesurables si l'on réalise une correction linéaire sur D_0 .

Au cours de l'année 1974 (297 points), les corrélations observées entre NG et D_0 sont un peu moins étroites et la variance liée plus faible. Les valeurs de D_0 sont distribuées d'une façon plus régulière que pour 1973. En revanche, les 2 types d'équation s'appliquent d'une manière pratiquement équivalente et, pour des densités initiales comprises entre 300 et 800, nous n'observons pas de différences significatives entre les valeurs de NG calculées par les deux méthodes. Dans ces limites, il est donc possible d'appliquer la régression linéaire pour étudier les effets inhibiteurs faibles. Enfin, pour les deux années d'étude, les valeurs des coefficients de corrélation et des variations de NG liées à D_0 montrent que la croissance totale de Colpidium campylum, dans des conditions standards, est bien reproductible.

La comparaison des résultats obtenus en 1973 et 1974 laissent pressentir une différence entre les données obtenues pendant ces deux périodes. L'analyse de variance réalisée entre les deux relations logarithmiques indique une divergence hautement significative entre les pentes ($F = 13,55 - F_{0,01} = 6,7$). Cette divergence n'affecte pas les analyses statistiques des séries

	Equation logarithmique (1)	Equation linéaire (2)
Equation générale	$NG = - 0,768 5_{(2)} D_0 + 10,862 1$	$NG = - 0,002181 D_0 + 5,0965$
Coefficient de corrélation (r)	0,821 $r_{(0,01)} = 0,113$	0,812 $r_{(0,01)} = 0,113$
Variation de NG liée à D_0	67,9 %	67,9 %
Signification de la pente	$t = 24,03 t_{297-1} (0,01) = 3,29$	$t = 23,19 t_{297-1} (0,01) = 3,29$
Intervalle de confiance de la pente	$I_{0,05} = 0,062$ $I_{0,01} = 0,082$	$I_{0,05} = 0,00018$ $I_{0,01} = 0,00024$

Valeurs de D_0	Valeurs de NG calculées par (1)	Valeurs de NG calculées par (2)	Correspondance entre valeurs compte-tenu de l'intervalle de confiance	
			p = 0,05	p = 0,01
300	4,55	4,44	+	+
400	4,22	4,22	+	+
500	3,97	4,00	+	+
600	3,77	3,79	+	+
700	3,60	3,57	+	+
800	3,45	3,35	+	+

Tableau VIII : Etudes des corrélations logarithmiques (1) et linéaires (2) entre NG et D_0 . Correspondance entre les valeurs de NG obtenues à partir de (1) et (2), compte-tenu de l'intervalle de confiance de la moyenne de ces relations. Période 1974.

d'expérience car, dans chaque cas, on effectue simultanément un témoin interne. La cause des écarts observés doit être recherchée dans les réglages utilisés pendant ces deux années pour le Coulter Counter.

IV - INFLUENCE DU REGLAGE DES APPAREILS DE COMPTAGE SUR LES DONNEES NUMERIQUES

Au cours de l'année 1973, l'absence d'analyseur P 64 ne nous a pas permis d'étudier les distributions en taille des ciliés dans les cultures. Nous avons donc opéré suivant la méthode classique, les contrôles étant effectués grâce à des comptages en hématimètres. La détermination du seuil est perturbée par la présence dans les cultures de C. campylum de particules parasites provenant du rejet des vacuoles digestives. L'analyse au P 64 - XY de la distribution des protozoaires montre une différence nette dans les tailles et les dispersions entre les temps 0 et 43 heures (fig. 6). De plus, l'analyseur P 64 sépare très nettement la population de particules parasites et permet de régler le seuil avec précision. Si le seuil inférieur de sensibilité du Coulter Counter est trop élevé, comme cela s'est produit en 1973, l'erreur relative de numération est plus importante pour D_0 que pour D_{43} . Ceci entraîne une modification de la courbe générale $NG = f(D_0)$. En effet, les valeurs D_0 et D_{43} deviennent $D_0 (I - \frac{\Delta_0}{D_0})$ et $D_{43} (I - \frac{\Delta_{43}}{D_{43}}) \frac{\Delta}{D}$ étant l'écart relatif par rapport à D réel. Si le seuil de comptage est trop élevé $\frac{\Delta_0}{D_0} > \frac{\Delta_{43}}{D_{43}}$ et

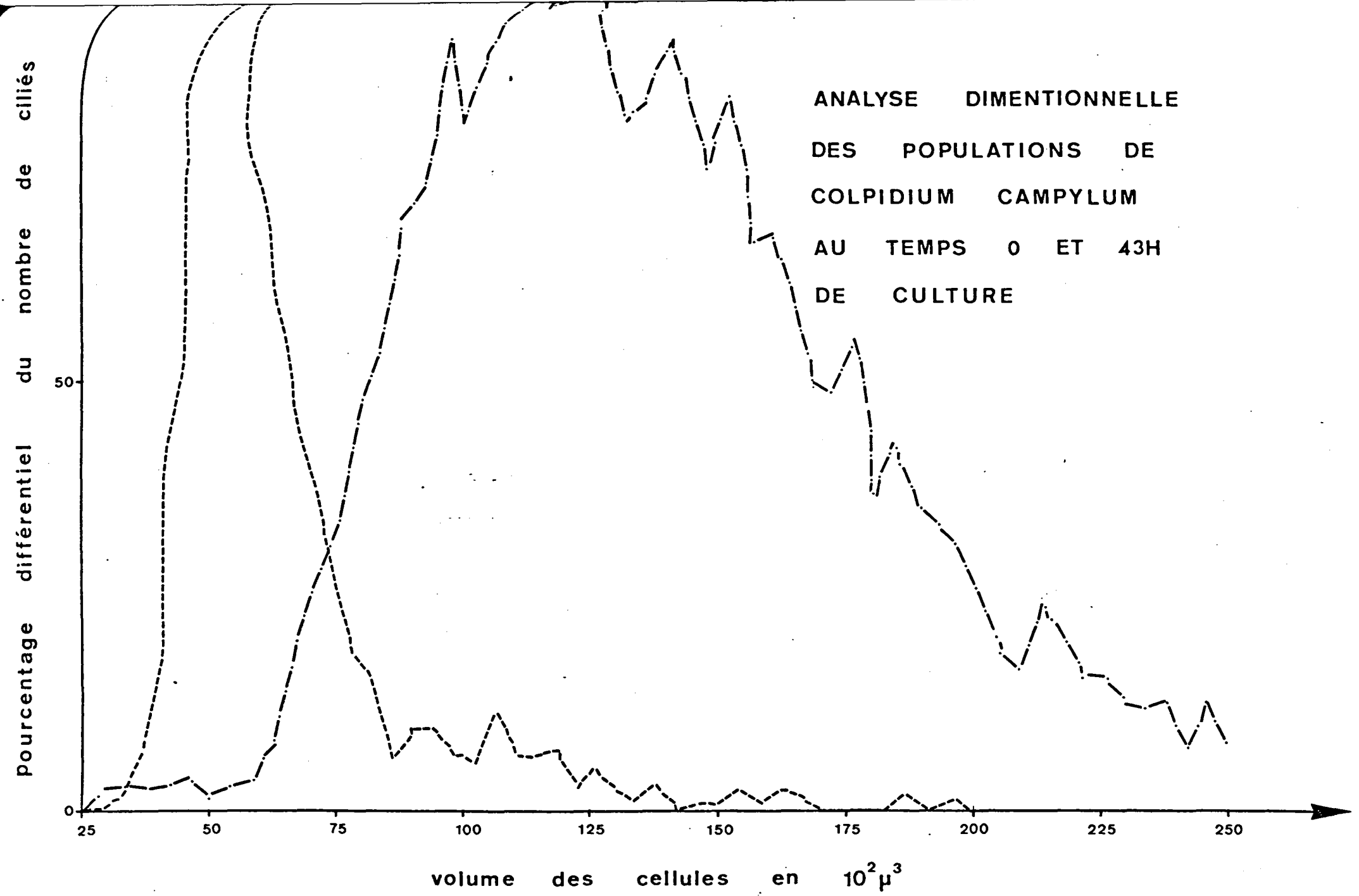
$$\frac{D_{43} (I - \frac{\Delta_{43}}{D_{43}})}{D_0 (I - \frac{\Delta_0}{D_0})} > \frac{D_{43}}{D_0} \quad \text{et NG mesuré} > \text{NG réel.}$$

Cette erreur tend à accentuer la courbure de la relation $NG = a \log_2 D_0 + C^{te}$. Les figures 4 et 5 illustrent parfaitement cette influence, plus réduite en 1974 après correction du seuil inférieur de sensibilité du Coulter Counter.

Figure 6 : Analyse de la distribution cellulaire dans les cultures
de Colpidium campylum au temps 0 et 43 heures.

4

ANALYSE DIMENSIONNELLE
DES POPULATIONS DE
COLPIDIUM CAMPYLUM
AU TEMPS 0 ET 43H
DE CULTURE



V - CONSEQUENCES AU NIVEAU DE L'ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

La relation existant entre NG et D_0 n'est utile que s'il existe des différences importantes entre les densités initiales moyennes des séries en permettant soit un ajustement, soit une réduction de l'erreur obtenue sur NG.

Nous avons examiné, pour les années 1973 et 1974, le nombre d'expériences où l'analyse de variance a révélé une différence significative entre les densités initiales moyennes des séries. Pour l'année 1973 des pipettes stériles classiques ont été utilisées. Pour l'année 1974, les inoculations ont été exécutées avec des pipettes à volume réglable équipées de cones stériles à usage unique. Les résultats du tableau IX montrent une nette amélioration consécutive à l'emploi de la pipette avec cones à usage unique. Mais le progrès est insuffisant pour éviter toute fluctuation significative entre les moyennes des séries. Une correction est donc nécessaire.

VI - CONCLUSIONS

- La croissance de C. campylum sur des suspensions standard d'E. coli présente une reproductibilité suffisante pour l'étude de l'inhibition des cultures par les substances toxiques.

- La valeur du nombre de générations en 43 heures est dépendante de la densité initiale des ciliés dans les cultures. Ce facteur de variation peut être éliminé lors de l'étude des résultats par une analyse de covariance.

- L'efficacité de la méthode dépend de la dispersion des résultats obtenus, donc de la précision du dénombrement. Seul le comptage automatique permet un travail de routine de grande envergure avec une erreur relative faible. Il est

Année	Nombre d'expériences	Pas de différence significative entre séries	Différences significatives		
			Seuil de 5 %	Seuil de 1 %	Total
1973	52	32	5 (9 %)	15 (29 %)	20 (38 %)
1974	63	46	9 (14 %)	8 (13 %)	17 (27 %)

Tableau IX : Divergences des densités initiales moyennes relevées entre les séries de flacons pour les années 1973 (inoculation à la pipette standard) et 1974 (inoculation à la pipette automatique avec cône à usage unique).

indispensable de tenir compte à la fois de la différence de distribution de population entre les temps 0 et 43 heures et de la présence de particules parasites. Il est prudent, pour régler le seuil inférieur de détection, d'effectuer une étude de la distribution des populations.

Chapitre II : Domaines d'application.

=====

Dans les conditions d'applications de la méthode, la plus petite dose modifiant de manière significative la croissance de Colpidium campylum représente le seuil inférieur de solubilité acceptable de la substance étudiée. Nous avons décidé de nommer cette limite critique la Dose Minimale Active (D.M.A.). Si le toxique testé est très soluble, son étude ne présente aucune difficulté particulière. Si sa solubilité est voisine de la D.M.A., il sera nécessaire, le plus souvent, d'en faire une solution concentrée dans un solvant miscible à l'eau. Si le corps n'est soluble qu'à une concentration inférieure à la D.M.A., le test peut encore s'appliquer dans la mesure où le précipité n'oppose pas de difficultés trop grandes au comptage électronique des ciliés (dans ce cas, il est encore possible de numérer les cultures en hématimètres). Il est en effet possible que le précipité de la substance testée soit suffisamment fin pour être ingéré, ou encore qu'il y ait adsorption du toxique à la surface des bactéries servant de nourriture.

I - TOXICITE DE CORPS PURS HYDROSOLUBLES

Nous avons étudié la D.M.A. d'un certain nombre de corps minéraux et organiques utilisés dans l'industrie. Les résultats sont consignés dans le tableau X. Pour comparaison, nous y avons porté également les résultats obtenus par CARTER et CAMERON (27), RUTHVEN et CAIRNS (70), et SUDO et AIBA pour d'autres protozoaires. Nous avons fait figurer également la CI_{50} de ces corps définie par la norme AFNOR T 90301 avec le crustacé Daphnia magna.

Les substances les plus toxiques trouvées sont le mercure et le sélénium, ce dernier très actif sur les ciliés.

Co	Co(NO ₃) ₂	0,1			1000		22
F	NaF	25					235
Ni	Ni(NO ₃) ₂	0,1					39
Se	SeO ₂	0,04					
As	AsO ₃ Na	10					11,5
Mo	MoO ₃ Na	>100					
Cr	CrO ₄ K Cr ₂ C ₇ K ₇	10 10	180	320	>18	180	0,2
Mn	MnO ₄ K MnCl ₂	1,6 10	0,75	0,65	1,0	3,2	12
Li	LiNO ₃	>100					
Hg	HgCl ₂	0,04	2,30*				0,017
Zn	ZnSO ₄	25	1,0 - 2,1*	0,56	3,2	1000	3,4
Cd	CdNO ₃	0,16	0,36*				0,24
Cu	CuSO ₄	0,25	0,32*	0,032	0,024	0,1	0,04
Pb	PbCH ₃ Co	0,4	24 - 23,6*	24	5,6	1000	
CN	KCN	0,4					0,4
CN	SCNK FeON ₆ K ₃	20 >100					281
Phénol	C ₆ H ₅ OH	100	1000	1000	560	750	
Ethanol	CH ₃ CH ₂ OH	10 - 15					

Tableau X : Dose minimale Active (DMA) de quelques substances minérales et organiques vis-à-vis de *C. campylum*. Comparaison avec la concentration tolérée (RUTHVEN & CAIRNS, 1973), la DL 50 (résultats marqués par *) obtenue avec d'autres protozoaires et la CI 50 pour *Daphnia magna* (AFNOR T 90301). (Résultats fournis aimablement par l'IRCHA, VERT LE PETIT, FRANCE).

Puis on trouve un groupe d'éléments qui, à côté du cadmium dont la toxicité est très connue, comprend le cobalt, le nickel et le cuivre. Le Colpidium semble présenter une sensibilité très élective pour ces métaux qui sont aussi nocifs que le cadmium. Pour le nickel, cette action peut s'expliquer par le fait qu'il y a probablement concentration du toxique par transport actif, comme cela se produit chez la Paramécie. Une faible quantité de nickel en solution suffirait à ce moment, pour provoquer un effet toxique. Le plomb est un peu moins toxique que les éléments précédents et son action est semblable à celle des cyanures libres.

Pour les autres éléments, nous trouvons des D.M.A. plus élevées. L'activité forte du permanganate est due à son action oxydante et non à la toxicité propre du manganèse. L'arsenic, le chrome, le manganèse, le zinc et le fluor possèdent des D.M.A. très fortes comparées au nickel, au cuivre et autres toxiques des deux premiers groupes.

La forme d'administration du corps peut influencer fortement (cyanures, manganèse) ou être indifférente (chromate et bichromate) bien que la toxicité d'un sel de chrome simple n'ait pas été explorée.

Des trois substances organiques testées, on voit que le phénol est très peu toxique. Son action est sensible jusqu'à la 24ème heure de culture, mais disparaît en 43 heures. Il y a affaiblissement de l'effet toxique dû, soit à une biodégradation, soit à une acclimatation du cilié.

L'alcool n'est actif sur Colpidium qu'à des concentrations déjà élevées.

La toxicité plus forte du tétrapropylbenzène sulfonate est due à ses propriétés tensioactives. La membrane des protozoaires est très sensible aux produits détergents qui agissent également à des doses très faibles sur l'excitabilité et la mobilité de ces animaux.

Nos observations concordent avec celles de SUDO et AIBA (76) sur le même protozoaire pour Cr et Cu. Il apparaît difficile de comparer des résultats obtenus avec d'autres protozoaires dans des conditions expérimentales différentes. On peut noter malgré tout la grande différence de sensibilité entre Colpidium et les autres protozoaires pour le zinc, le cuivre, le plomb et le chrome.

Il est intéressant de comparer la sensibilité du test C. campylum avec celle de la méthode AFNOR T 90301. Sur onze éléments de comparaison, C. campylum est plus sensible, pour trois d'entre eux (Co, F, Ni) moins sensible, pour quatre (Cr^{6+} , Hg, Zn, Cu) et équivalent pour quatre (As, Mn, Cd, KCN). Particulièrement affecté par Co, Ni, Hg, Se et à un moindre degré par Cd, Cu, Pb et KCN, Colpidium campylum est une bonne espèce test pour l'évaluation de la toxicité des métaux lourds et d'autres toxiques classiques recherchés dans les eaux (CN^- , As).

II - MESURE DE LA TOXICITE DE CORPS PURS PEU SOLUBLES

Si les corps étudiés sont solubles à une dose voisine de la D.M.A., la solution mère peut être effectuée dans un liquide miscible à l'eau (alcool, carbitol, diméthylformamide, etc...). La quantité de toxique à tester est mise en solution dans le minimum de solvant pour éviter toute interaction vis-à-vis de Colpidium campylum. Deux témoins (un témoin normal et un témoin solvant) sont préparés pour contrôler la croissance. L'analyse statistique est faite entre le solvant et les séries contenant le toxique. Le tableau XI montre les résultats obtenus avec hêxachlorobiphényl dont nous avons testé la toxicité sur Colpidium campylum à trois concentrations différentes. L'alcool présente un effet significatif sur la croissance. L'hêxachlorobiphényl est actif jusque 1 ppm.

	Témoïn solvant (alcool)	Témoïn normal	PCB 10 ppm	PCB 1 ppm	PCB 0,1 ppm
\overline{NG}	3,9575	4,0926	3,6169	3,8452	3,8922
s	0,0617	0,1235	0,1283	0,0793	0,0499
F		17,1**	24**	5,6*	3,8 N.S.
$\overline{D_0}$	442	464	438	444	438

Tableau XI : Recherche de la toxicité d'un hexachlorobiphényl.

\overline{NG} : nombre moyen de générations

s : écart type du nombre de générations

F : rapport de variance (** significatif à 0,01, * significatif à 0,05, N.S. non significatif)

dans l'exemple ci-contre $F_{(0,05)} = 5,59$ $F_{(0,01)} = 12,25$

$\overline{D_0}$: moyenne des densités initiales des séries

Cette méthode de détermination de toxicité ne peut pas être considérée comme rigoureuse car elle fait abstraction des possibles interactions entre toxique et solvant. Pour calculer le seul effet du toxique, il faut avoir recours à l'analyse des expériences factorielles.

III - UTILISATION DE L'ANALYSE FACTORIELLE

L'analyse factorielle permet de calculer simultanément la toxicité d'un mélange, celle que présenterait chaque constituant de ce mélange administré séparément et l'interaction entre les composants ; elle permet de dissocier l'effet d'une substance de celui du solvant qui sert à l'administrer.

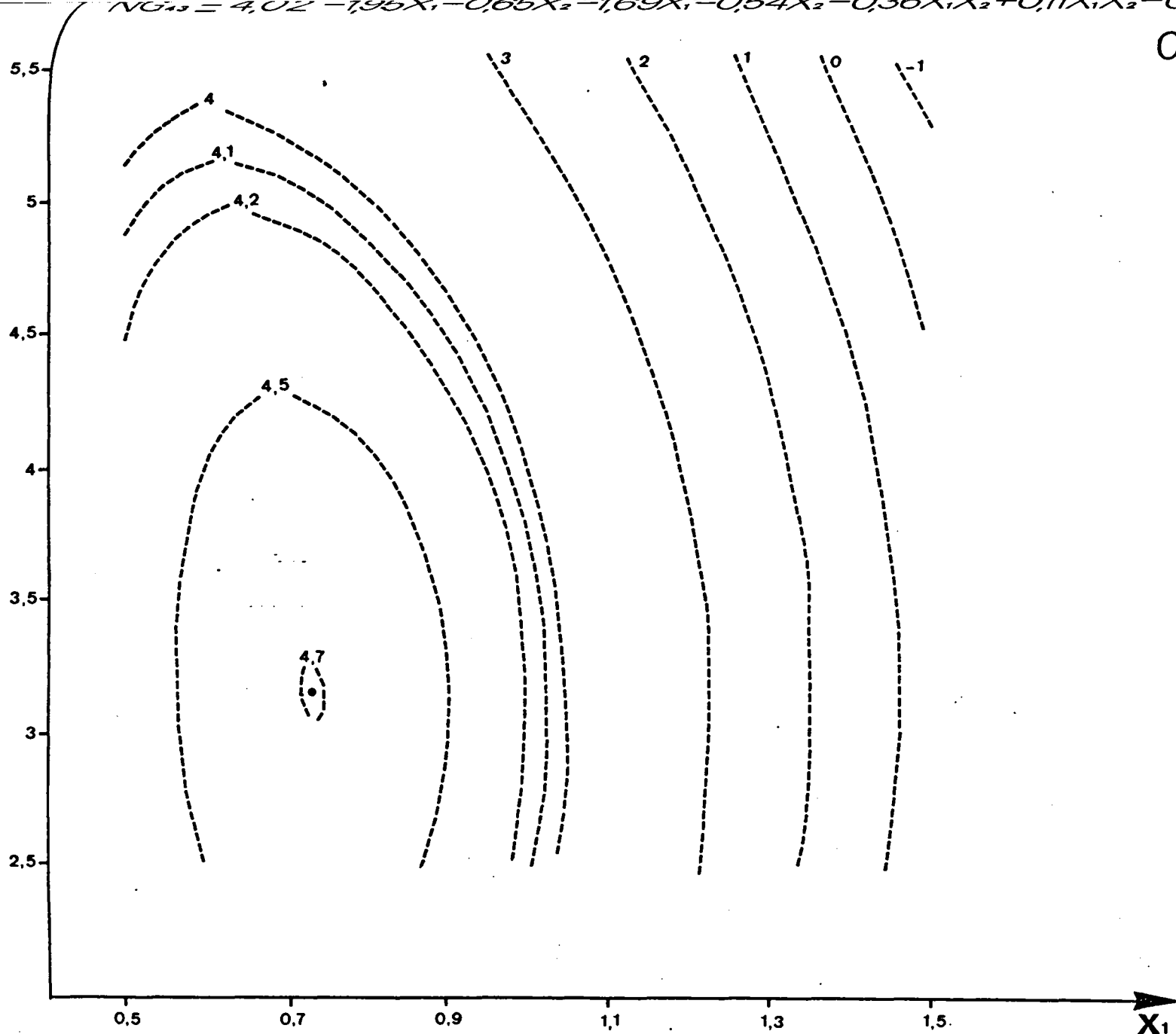
Après calcul des activités séparées de chaque facteur, des coefficients d'interaction et de l'équation de la surface de réponse selon les méthodes de LISON (51) et SNEDECOR et COCHRAN (74), on trace graphiquement les isopleths (lignes de même croissance) en fonction des deux constituants étudiés. Nous avons ainsi étudié l'influence de l'alcool sur la toxicité d'un pentachlorobiphényle. Une expérience préliminaire situait la D.M.A. aux alentours de 2,5 ppm.

L'analyse de variance des résultats indiquait des relations effets/doses quadratiques très significatives pour l'alcool et le PCB. Le coefficient d'interaction est positif (synergie) et très significatif.

L'étude des tracés de la figure 7 montre une action prépondérante de l'alcool au dessus de 1 ml car les isopleths deviennent pratiquement parallèles à l'axe des ordonnées, donc indépendantes de la concentration en PCB. La toxicité du solvant croît non linéairement avec la dose (la distance entre les isopleths 4 à 0 diminue selon la direction de l'axe des abscisses).

Figure 7 : Analyse factorielle entre l'éthanol et un Pentachlorabiphényl. Courbes du même nombre de générations (isopleths).

CONCENTRATION EN PCB EN ppm



CONCENTRATION EN ALCOOL EN ml

Le seuil de toxicité du PCB est compris entre 3 et 3,5 ppm et celui de l'alcool entre 0,7 et 0,8 ml/56 ml. L'équation générale de la surface de régression est inscrite en haut de figure. On retrouve l'influence plus forte de l'alcool (coefficients en X plus élevés) et une synergie, dépendant plus de X_2 ; l'interaction ne devient jamais prépondérante sur l'action individuelle de chaque substance.

L'analyse factorielle réalisée ici permet d'obtenir des résultats très complets quand l'emploi de solvants est indispensable :

- détermination de la concentration en solvant à ne pas dépasser pour obtenir un minimum d'interaction ;
- détermination précise de la D.M.A. de chaque substance étudiée par mesure de l'interaction.

Plus généralement, l'analyse factorielle est la méthode de choix pour étudier l'influence de mélanges de toxiques. Elle permet également l'étude combinée des agents physiques et chimiques du milieu et des toxiques. L'utilisation de l'analyse factorielle dans les tests in vitro offre une possibilité de modélisation des phénomènes pouvant être rencontrés dans les milieux naturels.

IV - ETUDE EXPERIMENTALE DE LA BIOCONCENTRATION DES MICROPOLLUANTS

Pour étudier la bioconcentration d'une substance, on mesure la quantité de substance fixée par la population en un temps donné et on la rapporte au biovolume total par ml de la population à cet instant.

Le biovolume total (V) est mesuré avec l'analyseur M.C.V. (Coultronics France), après fixation, sur l'échantillon moyen d'une série de 5 flacons ; le volume cellulaire moyen est multiplié par le nombre d'individus par ml de l'échantillon. Un second échantillon moyen (50 ml) est centrifugé à 1000 g pendant 10 mn. Le culot est ensuite lavé 2 fois par 5 ml d'eau distillée.

Le surnageant et les eaux de lavage sont récupérés. La substance étudiée est dosée dans le culot et dans le milieu de culture (+ eaux de lavage) avec ou sans extraction préalable. Si Q est la quantité totale de produit initial ajoutée par ml de culture et Q_1 , la quantité correspondante retrouvée dans les protozoaires, le facteur de bioconcentration du C. campylum pour la substance est $\frac{Q_1}{Q} \times \frac{1}{V}$.

Les résultats obtenus avec un hémachlorobiphényle (tableau XII) montrent que la bioconcentration intervient indépendamment de la toxicité et croît avec la dose de toxique présente.

Cet exemple montre que C. campylum est susceptible d'accumuler rapidement et énergiquement certaines substances toxiques. Le facteur de concentration trouvé ici est supérieur à celui obtenu par COOLEY et coll. avec Tetrahymena pyriformis pour des substances analogues. Les conséquences de ce phénomène et ses domaines d'application sont très importants quand on connaît l'importance des protozoaires dans les chaînes trophodynamiques détritivores, les plus fortement touchées par les pollutions de toute nature.

V - POSSIBILITES D'APPLICATION A LA RECHERCHE DIRECTE DES MICROPOLLUANTS DANS LES EAUX

La possibilité de détection directe de toxiques dans l'eau à l'aide du test Colpidium campylum est conditionnée par la sensibilité de ce cilié aux variations de composition minérale du milieu, en absence de toute substance toxique. Pour estimer cette influence, nous avons comparé la croissance du protozoaire dans notre milieu de référence avec celle obtenue dans 74 échantillons d'eau de toute provenance (forages, puits, eaux de distribution eaux embouteillées, eaux de surfaces non polluées) où l'analyse chimique n'a pas permis de découvrir de substances toxiques minérales ; les pesticides et certains éléments n'ont toutefois pas été recherchés. L'examen du tableau XIII montre une différence de croissance dans 19 % des cas, très significative dans 9,5 % des échantillons. Ces discordances sont explicables par la

Concentration en HCB des cultures au temps 0 (ppm)	Volume de culture analysé (ml)	Q théorique ajoutée μg	Q_1 μg	Q_2 μg	Q récupéré μg	V_2/ml (ml)	F_b
0 (Témoin)	50	0	0	0			
0,1	50	5	3,05	1,68	4,72	$196 \cdot 10^{-6}$	2400
1	50	50	24,4	24,5	48,9	$139 \cdot 10^{-6}$	3500
10	50	500	143,5	272	415,5	$137 \cdot 10^6$	3900

Tableau XII : Etude de la bioconcentration d'un hexachlorobiphényl 2,3 - 2', 3', 5

HCB par Colpidium campylum

Q : Quantité de HCB ajoutée au départ dans la culture
 Q_1 : Quantité de HCB retrouvée dans le surnageant de culture
 Q_2 : Quantité de HCB retrouvée dans les Protozoaires
 Q : $Q_1 + Q_2$ = Quantité totale de HCB retrouvée par l'analyse
 V_2/ml : Biovolume total de ciliés par ml de culture
 F_b : Facteur de bioconcentration

Nombre d'échantillons testés	Croissance identique au témoin		Croissance différente du témoin		Différence significative p = 5 %		Différence hautement significative	
	n	%	n	%	n	%	n	%
74	60	81	14	19	7	9,5	7	9,5

Tableau XIII : Test de toxicité directe réalisé sur 74 échantillons
d'eau de toutes provenances et ne présentant pas d'indice de pollu-
tion chimique minérale décelable.

nécessaire adaptation de C. campylum à un milieu de composition minérale variable. Nous avons pu constater dans tous les cas un retard très net de croissance à la 24ème heure de culture. Dans 10 % des cas, l'adaptation du protozoaire est très insuffisante dans le temps de 43 heures fixé pour le test classique. Comme ce dernier est basé sur des inhibitions hautement significatives de la croissance, 90 % seulement des échantillons pourraient être analysés avec succès. Pour éviter cet écueil il est possible, soit de prolonger la durée du test afin de permettre l'adaptation complète du cilié, soit de repiquer la première culture dans un échantillon neuf, identique au 1er (méthode des 2 cultures successives). Cette variante technique doit faire l'objet d'une étude avant son application définitive.

VI - APPLICATION A LA MESURE DE LA TOXICITE D'EAUX POLLUEES OU D'EAUX RESIDUAIRES

L'application du test Colpidium à ces types d'échantillons est soumis à un certain nombre de sources d'erreurs d'interprétation d'origine physico-chimique et biologique :

- la charge en particules de l'échantillon constitue une source d'erreurs lors de la numération ;

- la charge organique, en provoquant une croissance d'E. coli ou des bactéries propres de l'échantillon, peut entraîner une surcroissance secondaire de Colpidium campylum ;

- d'autres organismes, de même taille que le cilié test, peuvent se développer et soit introduire des erreurs de numération, soit perturber la croissance.

L'interprétation des résultats en fonction de la composition chimique des effluents est hasardeuse tant que l'on ne connaît pas l'interaction existant entre les toxiques qui le composent.

1) Influence des matières en suspension :

Un échantillon riche en matières en suspension peut non seulement introduire des erreurs de numération mais aussi provoquer des bouchages de la sonde du Coulter Counter.

Pour éliminer en partie les interférences, nous avons décidé de pratiquer une décantation de 2 heures dans des cônes de Coin, conformément à la technique de la norme AFNOR T 90301, pour les tests sur Daphnia magna (2). Après ce traitement, les particules résiduelles n'entraînent plus le colmatage de la sonde.

Pour supprimer les particules résiduelles, nous avons rejeté d'emblée la filtration sur membrane Millipore et la centrifugation qui modifieraient trop l'effluent en éliminant des toxiques adsorbés, et nous avons essayé sans succès de désagréger les particules par les ultrasons afin de pouvoir éliminer leur interférence par réglage du seuil de comptage des cultures. Dans l'impossibilité de supprimer l'erreur résiduelle sans employer des moyens drastiques, nous avons choisi de pratiquer, pour chaque dilution du rejet, un témoin blanc dont nous avons mesuré la charge aux temps 0 et 43 heures. Les valeurs du témoin sont soustraites aux numérations totales correspondantes et les données corrigées sont considérées comme densités réelles de population aux temps 0 et 43 heures.

2) Influence de la charge en matière organique et en bactéries des eaux usées :

La charge en matière organique biodégradable varie beaucoup d'une eau usée à l'autre. Elle peut être directement assimilée par le Colpidium campylum ou provoquer la surcroissance des Escherichia coli ou des bactéries autochtones du rejet.

Nous avons donc pour un certain nombre d'échantillons, étudié l'évolution de la densité optique d'un témoin blanc, une augmentation trahissant une croissance secondaire des E. coli ou des microorganismes du rejet. Parallèlement, nous avons recherché une surcroissance concomitante du Colpidium. Les résultats du tableau XIV comportent à la fois les données des échantillons bruts et de leurs différentes dilutions. Nous voyons que la surcroissance du cilié est observée dans 24 % des échantillons non toxiques, et que la surcroissance bactérienne n'est concomitante que dans 20 % des résultats anormaux constatés, donc 5 % des échantillons au total.

Bien que le nombre d'observations soit encore insuffisant, il semble que l'hypothèse de la surcroissance bactérienne doit être abandonnée et qu'il est probable que le Colpidium assimile la matière organique présente dans le rejet. Une vérification est indispensable ; en tout état de cause, ce phénomène constitue un écueil à l'application du test Colpidium campylum aux eaux résiduaires peu toxiques et riches en matières organiques biodégradables. Pour les effluents très toxiques, la matière organique présente est diluée plus vite que les substances nocives et l'interférence ne se produit plus.

3) Influence des autres organismes présents dans l'effluent

Un seul échantillon nous a permis d'observer ce phénomène. Lors du test d'un rejet industriel de faible toxicité, nous avons observé, parallèlement à une légère augmentation du nombre de particules du témoin blanc, entre 0 et 43 heures, un éclaircissement considérable de la suspension bactérienne alors qu'aucun cilié n'avait été inoculé. Dans les flacons d'expérimentation, le Colpidium avait poussé d'une façon irrégulière, plus faiblement que dans le témoin. L'examen microscopique du témoin

Nombre total d'essais	Toxiques sur Colpidium	Non toxiques sur Colpidium				Total non toxiques
		Surcroissance d'E. coli		Stabilité ou diminution d'E. coli		
		Total	Surcroissance de Colpidium	Total	Surcroissance de Colpidium	
56	10	3	2	43	9	46

Tableau XV : Rapports entre la surcroissance des suspensions bactériennes et la surcroissance des ciliés lors d'essais d'eaux résiduares.

blanc et des flacons de culture défectueux a révélé une prolifération considérable d'un flagellé dont la taille supérieure était située à la limite du seuil de détection du Coulter Counter, ce qui explique le résultat paradoxal observé. Le flagellé, en se nourrissant des bactéries, a perturbé complètement la croissance du cilié par compétition pour la nourriture.

L'échantillon ayant été congelé à -25°C , nous l'avons, après liquéfaction, retesté et constaté que les flagellés ont été éliminés par la congélation, le test et les témoins blancs s'étant comportés normalement. Cette dernière observation nous a offert un moyen d'éliminer éventuellement les protozoaires présents dans l'effluent à tester.

4) Essai d'application du test Colpidium à quelques échantillons d'eaux usées :

Dans un essai préliminaire, nous avons testé 11 échantillons de diverses provenances qui ont été soumis à une analyse sommaire. Les résultats du tableau XV permettent de distinguer quatre cas possibles :

a) l'absence de toxicité des effluents (échantillons 3 et 4) ;

b) une toxicité limite, sensible à une concentration de 0,8 (échantillons 1, 2, 6, 7). Ces résultats sont les plus difficiles à interpréter. Il peut y avoir, soit acclimatation imparfaite, analogue à celle observée pour les eaux de surface, soit légère toxicité de l'effluent. Il faut remarquer que ces quatre résultats concernent des eaux de surface ;

c) une toxicité nette sensible sur une dilution au dixième du rejet (échantillons 8, 9, 10, 11). Un rejet industriel, contenant une dose significative de cyanure et trois eaux

Origine	Rivière	Rivière	Rivière polluée	Rivière polluée	Rejet industriel	Etang pollué	Etang pollué	Rejet industriel	Etang pollué	Etang pollué	Etang pollué
pH	7,6	7,4	7,5	7,8	/	/	/	/	7,4	7,8	7,95
DCO	23	35	31	27	$>10^6$	76	80	/	201	111	107
DBO	35	8,1	5,3	7,9	$6 - 10^5$	38	38	/	45	39	32
NH ₄	2,2	3,2	7,6	8,1	/	12,1	11,5	/	53,3	24,8	24,5
Toxiques minéraux particuliers	0	0	0	0	CN ⁻ 672	/	/	CN ⁻ 7,8	/	/	/
Phénols	0	0	0	0	0	/	/	/	/	/	/
Détergents	0	0	0	0	0	/	/	/	/	/	/
Autres toxiques	0	0	0	0	0	/	/	/	/	/	/
Toxicité biologique	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Dilution maximale toxique	0,8	0,8			10^{-4}	0,8	0,8	0,1	0,1	0,1	0,1

Tableau X V : Eléments de composition chimique et toxicité biologique de quelques échantillons d'eaux polluées et d'eaux résiduares.

/ : absence d'analyse pour le paramètre correspondant.

provenant d'étangs où la mort de poissons a été constatée ont été ici analysés. Dans tous les cas, le résultat de notre test est significatif et en accord avec les observations ;

d) une très forte toxicité (échantillon 5) a été observée pour un effluent industriel cyanuré. La dilution maximale active trouvée était même plus grande que celle que l'on pouvait attendre d'après les résultats d'étude de la toxicité des cyanures libres. Il n'est pas exclu que d'autres toxiques fréquemment rencontrés dans de tels effluents (tel de nickel) soient responsables du résultat observé.

Ces résultats préliminaires montrent que le test Colpidium, avec quelques aménagements, peut s'appliquer à l'étude d'eaux résiduaires, surtout les eaux industrielles. Les causes d'interférence ne semblent pas introduire de trop grandes difficultés d'interprétation lors de la pratique réelle. Une confrontation de la méthode avec la norme T 90 301 reste à faire afin de vérifier la valeur réelle du test Colpidium.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

La technologie développée ici repose sur une analyse approfondie de la croissance totale de Colpidium campylum dans des conditions standards. Nous avons défini successivement les techniques de culture et de test à utiliser, les conditions d'emploi de la méthode et les analyses statistiques permettant d'obtenir une sensibilité maximale. Nous avons également tenté de dégager les possibilités d'application dont certaines sont déjà entrées effectivement en service dans le cadre du laboratoire. Les possibilités d'application actuelles s'étendent à tous les corps hydrosolubles ou corps peu solubles administrés dans un solvant, aux mélanges. Les métaux lourds, les substances pharmaceutiques, certains produits d'origine animale ou végétale (toxines) peuvent être ainsi étudiés. Du point de vue écologique, les possibilités de bioconcentration de toxiques par Colpidium campylum nous ouvrent des horizons très importants pour la compréhension des phénomènes se produisant dans les chaînes trophodynamiques de type détritivre.

L'utilisation directe de notre technique pour le test d'eau de surface ou de rejets industriels offre un certain nombre d'avantages sur les tests d'utilisation classique (test Daphnie et test poisson) :

Le milieu et les méthodes sont très standardisés, ce qui permet d'obtenir une bonne reproductibilité des résultats dans les laboratoires différents.

Le test requiert pour les cultures et les essais un volume d'eau de dilution et une quantité de rejet faible. C'est un gros avantage sur les méthodes utilisant les poissons. De même l'encombrement du matériel et des cultures est réduit.

Le test portant sur une population d'individus, les erreurs provoquées par la différence de sensibilité individuelle des animaux sont estompées et on obtient une réponse globale peu fluctuante.

La méthode présente des possibilités d'automatisation importante aussi bien pour les inoculations que les prélèvements et les comptages.

Les essais biologiques officialisés utilisant les protozoaires comme espèces test sont rares, mais très diversifiés puisque s'étendant de l'étude de toxiques bien définis jusqu'à la recherche de la valeur nutritive de protéines solubles ou insolubles (69). Notre travail nous a permis d'obtenir des informations sur un groupe peu étudié dont la susceptibilité aux polluants est différente de celle des crustacés, des insectes aquatiques et des poissons. Les conséquences des pollutions au niveau des systèmes naturels peuvent être ainsi mieux estimées. Le dernier pas à réaliser vers l'application est l'essai sur les eaux usées en confrontation avec les normes existantes (test Daphnie) et la levée des dernières difficultés dues aux matières en suspension et à la charge organique. La mise au point de la mesure de la bioaccumulation et la possibilité d'analyses multifactorielles nous permettent d'espérer une meilleure compréhension des effets des pollutions complexes ou de l'interaction entre l'effet des polluants et certains facteurs physico-chimiques du milieu (température, pH, dureté de l'eau). Toutes ces techniques seront utilisées afin d'obtenir une meilleure compréhension des conséquences des pollutions sur les biocénoses et du fonctionnement des chaînes trophodynamiques naturelles.

Sur le plan fondamental, de nombreux problèmes ont été soulevés lors de l'établissement de notre méthodologie. Ainsi, le mode de pénétration du toxique dans les organismes peut influencer son activité. Un passage transmembranaire est probable pour un certain nombre de minéraux et un transport actif possible dans quelques cas, comme le nickel. La phagocytose des bactéries provoque l'absorption conjointe de toxique en solution ou adsorbé sur la surface des microorganismes. Pour les corps peu solubles ou insolubles, des particules précipitées de dimensions suffisamment réduites peuvent être ingérées au même titre que les bactéries. De telles particules peuvent soit transiter passivement à l'intérieur de la cellule, soit être modifiées sous l'influence des variations de pH à l'intérieur des phagolysosomes ; le toxique pourrait alors migrer de la vacuole dans le cytoplasme. L'accumulation d'un toxique à l'intérieur de Colpidium campylum est donc un phénomène extrêmement complexe.

Le mode d'action des toxiques est un autre problème qui n'est pas toujours correctement interprété. Ainsi de nombreuses molécules organiques sont totalement inoffensives dans l'état où elles sont administrées. Mais des enzymes cellulaires les transforment en métabolites extrêmement toxiques. L'existence et le fonctionnement de "complexes enzymatiques d'activation" chez les protozoaires ciliés reste à démontrer ; dans l'affirmative, ces animaux pourraient constituer des modèles pour étudier certaines substances nécessitant une "activation" (PCB, mycotoxines, substances cancérigènes et mutagènes).

Enfin, la possibilité d'acquisition de résistance à un toxique est une question très controversée qui, depuis les premiers travaux effectués sur les Paramacies par JOLLOS (49) n'a pas reçue de solution satisfaisante. Le processus de détoxification de nombreuses molécules organiques nécessite l'intervention du "système enzymatique d'activation" déjà cité. Pour d'autres substances, le phénomène n'est pas encore élucidé. Plus encore

que l'acquisition de la résistance aux polluants, c'est la transmission de cette résistance qui peut poser les problèmes les plus difficiles. Il importe de connaître si une telle propriété peut se transmettre d'une manière prolongée phénétiquement ou résulter d'une modification génétique de la lignée de protozoaires. L'apparition de souches génétiquement résistantes dans des milieux pollués peut amener des modifications radicales dans l'interprétation de l'action à long terme des pollutions. Il y aurait apparition de biocoenoses nouvelles, non sur le plan spécifique, mais sur le plan physiologique et fonctionnel. De telles lignées seraient susceptibles d'augmenter le facteur de bioaccumulation le long des chaînes trophodynamiques. Une telle éventualité, qui n'est pas spécifique pour les protozoaires, doit retenir l'attention car elle modifie les données classiques en matière de pollution et n'est pas sans conséquences pour la santé publique.

BIBLIOGRAPHIE

1. AARONSON S.A., 1963
Protozoa pharmacodynamics : the use of protozoa to study the cellular action of drugs.
In "Progress in Protozoology" Proc. 1er Int. Cong. Protozool. Prague Aug. 1961, p 175-176
2. AFNOR (Association Française de Normalisation) 1974
Détermination de l'inhibition de la mobilité de Daphnia magna Strauss (Crustacé - Cladocère)
norme T 90301 - avril 1974
3. ANDRIVON C., 1968
L'inhibition des mouvements ciliaires chez Paramecium caudatum par les sels de nickel : sa levée par les complexants de cet ion.
Protistologica IV (4), p 517-523
4. ANDRIVON C., 1972
The stopping of ciliary movement by nickel salts in Paramecium caudatum the antagonisms of K^+ and Ca^{2+} ions.
Acta protozoologica XI (46), p 373-386
5. APOSTOL S., 1972
Metoda testelor cronice de toxicitate pe protozoare.
St. Si. Cerc. Biol. Seria Zoologie T 24 NR 3, p 215-223
6. APOSTOL S., 1972
Toxicitatea saponinei pentry nevertebratele acvatice.
Hidrobiologia Bucuresti, 13, p 237-248
7. APOSTOL S., 1973
A bioassay of toxicity using protozoa in the study of aquatic environment pollution and its prevention.
Environ. Res., 6 (4), p 365-372

8. APOSTOL S., 1973
(Allemand) Effet du pesticide Dipterex sur le plancton de surface.
Hydrobiologia Bucuresti, 14, p 303-308
9. BAUM F., HAENEL H., 1965
Determination of the biologic value of proteins with Tetrahymena pyriformis. Methodological hints and determination of the value of some foods.
Nahrung, 37 (47-50), p 53
10. BEN BASSAT D., SHELEF G., GRUNER N., SHUVAL H.T., 1972
Growth of Chlamydomonas in a medium containing mercury.
Nature, 239 (5375), p 43-44
11. BICK H., 1968
Autökologische und saprobiologische Untersuchungen auf süßwasser Ciliaten.
Hydrobiologia, 31 (1), p 17-36
12. BICK H., 1972
Ciliated protozoa : an illustrated guide to the species used as biological indicators in freshwater biology.
W.H.O. Geneva, 198 p
13. BICK H., KUNZE S., 1971
Eine Zusammenstellung von autökologischen und saprobiologischen Befunden an Süßwasserciliaten.
Intern. Rev. Ges. Hydrobiol., 56 (3), p 337-384
14. BICK H., SCHMERENBECK W., 1971
Vergleichende Untersuchung des Peptonabbaus under damit verknüpfter Ciliatenbesiedlung in strömenden und stagnierenden Modellgewässern.
Hydrobiologia, 37 (3-4), p 409-446

15. BICK H., DREWS E.F., 1973
Self cleaning and colonisation by ciliates in an acid environment.
Hydrobiologia, 42 (4), p 393-402
16. BREZONIK P.L., BROWNE F.X., FOX J.L., 1975
Application of ATP to plankton biomass and bioassay studies.
Water Res., 9 (2), p 155-163
17. BRINGMANN G., KUHN R., 1959
Wassertoxikologische Untersuchungen mit Protozoen als Testorganismen.
Ges. Ing., 80, p 239-242
18. BRUTKOWSKA M., DRYL S., MEHR K., 1974
Effects of ionic detergents on motor response and phagocytosis in Paramecium caudatum and Tetrahymena pyriformis G.L.
IV Congrès International de Protozoologie. Clermont-Ferrand (France), 2-9 septembre 1973
19. BURBANK W.D., SPOON D.M., 1967
The use of sessile ciliates collected in plastic Petri dishes for rapid assessment of water pollution.
J. Protozool., 14 (4), p 739-744
20. BURBANK W.D., BIDDLE J.W., 1973
Bioassay of chemical toxicants using sessile ciliates.
IV Congrès International de Protozoologie. Clermont-Ferrand (France), 2-9 septembre 1973
21. CAIRNS J.Jr., 1969
Rate of species diversity restoration following stress in freshwater protozoan community.
Univ. Kans. Sci. Bull., 48 (6), p 209-224

22. CAIRNS J. Jr., BEAMER T., CHURCHILL S., RUTHVEN J., 1971
Response of Protozoans to detergents enzymes.
Hydrobiologia, 38 (2), p 193-205
23. CARIRNS J. Jr., HEATH A.G., PARKER B.C., 1975
Temperature influence on chemical toxicity to aquatic organisms.
J. Wat. Pollut. Contr. Fed., 47 (2), p 267-280
24. CAIRNS J. Jr., LANZA G.R., PARKER B.C., 1972
Pollution related structural and functional changes in aquatic communities with emphasis on freshwater algae and protozoa.
Proc. Acad. Sci. Philadelphia, 124 (5), p 79-127
25. CAIRNS J. Jr., LANZA G.R., 1972
The effects of heated waste waters on some microorganisms.
V.P.I. - W.R.R.C. Bull. 48 O.W.R.R. Project B.O.A.V.A.
101 P
26. CAIRNS J. Jr., PATERSON R.A., 1971
The effects of heated waste wasters upon microbial communities.
Virginia Water Resour. Res. Cent. Blacksburg Proj. Complexion Rep. 9-1971, O.W.R.R. B-017-VA 24 p
27. CARTER J.W., CAMERON I.L., 1973
Toxicity bioassay of heavy metals in water using Tetrahymena pyriformis.
Water Res., 7 (7), p 951
28. COLMANO G., 1973
Molybdenum toxicity : abnormal cellular division of teratogenic appearance in Euglena gracilis.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 9 (6), p 361-364

29. COOLEY N.R., KELTNER J.M.J., FORESTER J., 1972
Mirex and Aroclor 1254. Effect on and accumulation
by Tetrahymena pyriformis W.
J. Protozool., 19 (4), p 636-638
30. CWIK K.B., DRYL S., 1971
The effects of detergents on motile behaviour of
Protozoa.
J. Protozool., 18 (3), supp. P 27
31. DETCHEVA R.B., 1973
Distribution des espèces de ciliés dans certains
affluents bulgares du Danube, aux eaux polluées.
Ann. Stn. Biol. Besse en Chandesse, 6-7, p 261-271
32. DICKMAN M., 1973
Total dissolved electrolyte effects on periphyton.
J. Water Pollut. Contr. Fed., 45 (10), p 2211-2215
33. DRYL S., BUJWID-CWIK K., 1972
Effects of detergents on excitability and motor response
in Protozoa.
Acta Protozool., 11, p 367
34. EVERHART L.P.J., 1972
Methods with Tetrahymena.
Methods in Cell Physiol., 5, p 219-288
35. FOLEY G.E., Mc CARTHY R.E., BINNS V.M., SNELL E.E.,
GUIRARD B.M., KIDDER G.W., DEWEY V.C., THAYER P.S., 1958
A comparative study of the use of microorganisms in
the screening of potential antitumor agents.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 76, p 413-438

36. FRANK O., BAKER H., ZIFER H., AARONSON S., HUTNER S.H.,
FEEVY C., 1963
Metabolic deficiencies in Protozoa induced by
Thalidomide.
Science, 139, p 110
37. FRY J.C., BROOKER M.P., THOMAS P.L., 1973
Changes in microbial populations of a reservoir
treated with the herbicide paraquat.
Water Res., 7 (3), p 395-408
38. GARDIONO E., CRERAR M., PEARLMAN R.E., 1973
Growth and cloning of Tetrahymena pyriformis on solid
medium.
J. Bacteriol., 116 (3), p 1170-1176
39. GOULDER R., 1971
The effects of saprobic conditions on some ciliated
Protozoa in the benthos and hypolimnion of an eutrophic
pond.
Freshwater Biol., 1 (3), p 307-318
40. GRABACKA E., 1973
(Polonais) Les protozoaires d'étangs pollués par des
rejets d'industrie sucrière.
Acto Hydrobiol. Krakow, 15 (1), p 97-111
41. GRAY J.S., VENTILLA R.J., 1973
Growth rates of sediment living marine protozoa
as a toxicity indicator for heavy metals.
Ambio., 2 (4), p 118-121
42. GREGORY W.W., REED J.K., PRIESTER L.E.J., 1969
Accumulation of parathion and D.D.T. by some algae
and Protozoa.
J. Protozool., 16 (1), p 69-71

43. HARTIG W.J., 1971
Studies on mercury toxicity in Tetrahymena pyriformis.
J. Protozool., 18 (3), suppl. p 26
44. HEAF D.P., LEE D., 1971
A viability assay for Tetrahymena pyriformis.
J. gen. Microbiol., 68 (2), p 249
45. HORVATH R.S., BRENT M.M., 1972
Thermal pollution and the aquatic microbial community :
possible consequences.
Environ. Pollut., 3 (2), p 143-146
46. HUTNER S.H., 1964
Protozoa as toxicological tools.
J. Protozool., 11, p 1-6
47. JEANNE LEVAIN N., 1974
Etude des effets du lindane sur la croissance et le
développement de quelques organismes unicellulaires.
Bull. Soc. Zool. France, 19 (1), p 105-109
48. JIROVEC O., 1950
Das Infusorium Glaucoma pyriformis als testobjekt in
pharmalologie und physiologie.
Path. Bakteriolog., 13, p 129-138
49. JOLLOS, in WICHTERMAN, 1953
Biology of Paramecium.
The Blakiston Company Ed. New York, 1ère édition,
p 204-206, 337-338

50. JONES R.F., BAKER H.G., 1946
Formation of aggregations of Glaucoma pyriformis
(Kahl) by means of phenantroquinone and other substances.
Nature, 157, p 554
51. LISON L., 1958
Statistiques appliquées à la Biologie Expérimentale.
Gauthier Villars Edt. Paris 1ère Edit., 1958, 346 p
52. MARK M.F., IMPARATO A.M., HUTNER S.H., BAKER H., 1963
Estimate of toxicity of radiopaque agents by means
of a ciliate.
Angiology, 14, p 383-389
53. MEREDITH R., MEREDITH C.G., 1972
The assay of the molluscicide niclosamide using the
ciliate protozoan Spirostomum ambiguum.
Bull. W.H.O., 46 (3), p 404-407
54. MEYER R.R., BOYD C.R., REIN D.C., KELLER S.J., 1972
Effects of ethidium bromide on growth and morphology
of Tetrahymena pyriformis.
Exper. Cell. Res., 70, p 233-237
55. MORGAN J.R., 1972
Effects of Aroclor 1242 and D.D.T. on cultures of an
Alga, Protozoan, Daphnid, Ostracod and Guppy.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 8 (3), p 129-137
56. MORRISON G.A., TOMKINS A.L., 1973
Determination of mean cell size of Tetrahymena in
growing cultures.
J. Gen. Microbiol., 77 (2), p 383-392

57. MOUTON R., HENDRICKX B., 1974
Cloning of Tetrahymena pyriformis within gelatin agar dishes.
Tetrahymena News, 2 (6)
58. NEMETH G., CSIK L., 1963
Effect of colchicin and U.V. irradiation on the size and shape of Tetrahymena pyriformis G.L.
Acta Biol. Acad. Sci. Hung., 13, p 217-222
59. NILSSON J.R., 1974
Effects of D.M.S.O. on vacuole formation, contractile vacuole formation and nuclear division in Tetrahymena pyriformis G.L.
J. Cell. Sci., 16 (1), p 39-47
60. NUSCH, 1974
Wass. Abwass. Forsch., 5-6, p 85-91
61. PERKINS D.L., CIERESZKO L.S., 1973
The environmental toxicity of crassin acetate using Tetrahymena pyriformis as a model.
Hydrobiologia, 42 (1), p 77-84
62. PERSOONE G., DEPLAECIE M., 1972
Influence de quelques facteurs écologiques sur la vitesse de reproduction du cilié hypotriche Euplotes vannus Muller.
Prostistologica, 8 (4), p 427-434
63. PERSOONE G., UYTTERSROT G., 1975
The influence of inorganic and organic pollutants on the rate of reproduction of a marine hypotrichous ciliate : Euplotes vannus Muller.
Rev. Internat. Ocean. Med., 37-38, p 125-152

64. RANKE-RYBICKA B., STANISLAWSKA J., 1972
Changes in periphyton populations after an organo-phosphorus pesticide treatment (Malathion, Trichlorfos).
Rerz. panstue, Zakl. Hig. Polska, 23 (2), p 137-146
65. RASMUSSEN L., KLUDT T.A., 1970
Particulate material as a prerequisite for rapid cell multiplication of Tetrahymena cultures.
Experim. Cell. Res., 59 (3), p 457-463
66. RASMUSSEN L., MODEWEG-HANSEN L., 1973
Cell multiplication in Tetrahymena cultures after addition of particulate material.
J. Cell. Sci., 12 (1), p 275-286
67. RICKETTS T.R., 1971
Endocytosis in Tetrahymena pyriformis : the selectivity of uptake of particles and the adaptative increase in cellular acid phosphatase activity.
Experim. Cell. Res., 66 (1), p 49-58
68. RICKETTS T.R., 1972
The interaction of particulate material and dissolved foodstuffs in food uptake by Tetrahymena pyridormis.
Archiv. Für Mickrobiologie, 81 (4), p 344-349
69. ROSEN G.D., FERNELL W.R., 1956
Microbiological evaluation of protein quality with Tetrahymena pyriformis W : II relative nutritive value of proteins in foodstuffs.
Brit. J. Nutr., 10, p 156-169
70. RUTHVEN J.A., CAIRNS J.Jr., 1973
Response of fresh water protozoan artificial communities to metals.
J. Protozool., 20 (1), p 127-135

71. SCHERBAUM O., 1957

The application of a standard counting method in estimation of growth in normal and heat treated cultures of Tetrahymena pyriformis.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., 40 (1), p 7-12

72. SCHWARTZ D., 1963

Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.

Edit. Médicales Flammarion, Paris, 1ère Edit. 1963, 290 p

73. SMALL E.B., 1973

A study of ciliate protozoa from a small polluted stream in East Central Illinois.

Am. Zool., 13 (1), p 225-230

74. SNEDECOR G.W., COCHRAN W.G., 1957

Statistical methods.

Iowa State Univ. Press. Amer. Iowa. USA, 6ème édition 1957, 649 p

75. SPOON D.M., BURBANK W.D., 1967

A new method for collecting sessile ciliates in plastic Petri dishes with tigh-filting lids.

J. Protozool., 14 (4), p 735-739

76. SUDO R., AIBA S., 1973

Effect of copper and hexavalent chromium on the specific growth rate of ciliate isolated from activated sludge.

Water Res., 7 (9), p 1301

77. THRASHER J.D., ADAMS J.F., 1972

The effects of four mercury compounds on the generation time and cell division in Tetrahymena pyriformis W.H. 14.

Environ. Res., 5 (4), p 443-450

78. TINGLE L.E., PAVLAT W.A., CAMERON I.L., 1973
Sublethal cytotoxic effects of $HgCl_2$ on Tetrahymena pyriformis.
J. Protozool., 20 (2), p 301-304
79. WEST R.A.J., BARBERA P.W., KOLAR J.R., MURRELL C.B., 1962
The agar method for determining the activity of diverse materials against selected protozoa.
J. Protozoal., 9, 65-73
80. YAMAGUCHI N., WADA O., ONO T. et coll., 1973
Detection of heavy metals toxicity by Tetrahymena pyriformis culture method.
Industr. Hlth., 11 (1-2), p 27-31
81. YONGHE W.H., CAIRNS J.Jr., BOATIN H.J., 1973
A comparison of fresh water protozoan communities in geographically proximate but chemically dissimilar bodies in water.
Arch. Protistenkd, 115 (2-3), p 154-161
82. ZAMFIR G., APOSTOL S., FILIPIUC M., WALEANU F., 1972
L'influence de la saponine sur les processus d'auto-épuration de l'eau.
Rev. Inst. Pasteur Lyon, 5 (4), p 457-477
83. ZDYBIEWSKA M., KLUCZYCKA K., 1974
Comparative studies on the determination of toxicity of some pesticides.
Pol. Arch. Hydrobiol., 21 (1), p 179-190

