

Des biocapteurs algaux au service de la surveillance des milieux aquatiques vulnérables

Algal biosensors for the monitoring of vulnerable water bodies

Antoine Gosset¹, Yannis Ferro², Mercedes Perullini³, Matías Jobbagy³, Sara A. Bilmes³, Claude Durrieu¹

1 Université de Lyon, ENTPE, CNRS, UMR 5023 LEHNA, 2 Rue Maurice Audin, 69518 Vaulx-en-Velin, France - antoine.gosset@entpe.fr

2 CEREMA, Direction Territoriale Méditerranée, Pôle d'activités, 30 Rue Albert Einstein 13593 Aix en Provence, France - yannis.ferro@cerema.fr

3 INQUIMAE-DQIAQF, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pab. II, C1428EHA, Buenos Aires, Argentina.

RÉSUMÉ

La protection de la ressource en eau et de manière globale de l'ensemble des masses d'eau est une priorité de l'union européenne depuis de nombreuses années et en particulier après l'adoption de la directive cadre sur l'eau (DCE). Dans ce cadre, les milieux les plus vulnérables font l'objet d'une attention particulière et d'un suivi régulier à l'aide d'indicateurs physico-chimiques (substances prioritaires) et biologiques (IBGN). En parallèle, lors de travaux d'aménagement, dans ou à proximité de masses d'eau, des suivis ponctuels sont effectués afin de surveiller la non incidence des travaux. C'est également le cas plusieurs années après la mise en service de l'infrastructure. Néanmoins ces suivis portent sur un nombre limité de paramètres (T, P, pH, MES, O₂ dissous), souvent lourds à mettre en place et ne reflétant en rien l'impact des infrastructures sur les écosystèmes aquatiques exposés. Aussi nous proposons de mettre à disposition des gestionnaires de cours d'eau et maîtres d'ouvrage chargés de surveiller la qualité des masses d'eau sensibles, différents biocapteurs basés sur l'étude de la réponse (activité photosynthétique ou phosphatase) au stress (rejets) de microalgues soit encapsulées dans une double matrice alginate/silice, servant à la fois de support de rétention et de milieu de croissance, soit immobilisées sur des monocouches auto-assemblées (SAMs) de thiols d'alcane. Ces biocapteurs ont pour but de donner une réponse intégrée et rapide de l'impact des rejets de temps de pluie issus de ces infrastructures, comme outils de prévention de la qualité biologique des milieux récepteurs.

ABSTRACT

The protection of water resources, and overall of all water masses, has been a priority of the European Union for many years, especially since the adoption of the Water Framework Directive (WFD). In this context, the most vulnerable aquatic areas are subject to a special attention and regular monitoring using physical-chemical (priority substances) and biological (e.g. IBGN) indicators. In the same time, during planning works, in or near water bodies, ad hoc monitoring is carried out to monitor the non-impact of these works. This is also the case several years after the infrastructure commissioning. Nevertheless, only a limited number of parameters (T, P, pH, TSS, dissolved O₂) are monitored, often cumbersome to implement and not reflecting the real impact of infrastructures on the exposed aquatic ecosystems. Therefore, we propose to provide to stream managers and building owners in charge of monitoring the quality of the sensitive water bodies, a biosensor based on the study of the stress (discharges) response (photosynthetic, phosphatase activity) of microalgae either encapsulated within a double alginate/ silica matrix serving both as retention carrier and growth medium, or immobilized on self-assembled monolayers of alkanethiolate. Their aim is to provide an integrated and rapid response to the impact of urban wet weather discharges from these infrastructures, as a biological quality prevention tool of receiving aquatic environments.

MOTS CLÉS

Biocapteur, Eau pluviale, Ecotoxicité, Microalgue, SAM, Sol-gel

1 INTRODUCTION

La protection de la ressource en eau et de manière globale de l'ensemble des masses d'eau est une priorité de l'union européenne. Or, il est maintenant reconnu que l'urbanisation croissante est à l'origine d'un impact environnemental important (Paul et Meyer, 2001) que ce soit sur l'hydrologie, la physico-chimie et la biologie des écosystèmes aquatiques (Stearman et Lynch, 2013). Lors de travaux d'aménagement (bâtiments, routes, etc.) à proximité de masses d'eau, des suivis ponctuels sont effectués afin de surveiller la non incidence des travaux. C'est également le cas plusieurs années après la mise en service de l'infrastructure. Néanmoins ces suivis portent sur un nombre limité de paramètres (T, P, pH, MES, O₂ dissous) ne reflétant en rien l'impact des infrastructures sur les écosystèmes aquatiques exposés. En effet, ces infrastructures peuvent être à l'origine du relargage de nombreuses substances polluantes comme des métaux lourds (tels que le cuivre, plomb ou zinc), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des polychlorobiphényles (PCB), des phénols, des pesticides, des phtalates et même parfois de substances pharmaceutiques (Hwang et Foster, 2006; Gasperi et al., 2008; Curren et al., 2011; Deffontis et al., 2013). Ces substances peuvent pour bon nombre d'entre elles avoir un effet toxique sur les organismes aquatiques. C'est d'ailleurs ce qui a pu être montré sur différents niveaux des réseaux tropiques (producteurs, décomposeurs, consommateurs primaires et secondaires) par Miltner et al. (2004), McQueen et al. (2010), Tang et al. (2013). Seulement, les impacts des rejets issus du ruissellement des eaux sur les infrastructures sont mesurés dans la majorité des cas, en laboratoire, avec un certain nombre de contraintes/limites (tels que la conservation ou la filtration des échantillons, etc.) (Gosset et al., in press). Les essais *in situ* sont peu mis en place, et nécessitent bien souvent un temps d'exposition important. Ainsi, il est nécessaire de développer des outils d'alerte *in situ* et rapides, les biocapteurs, permettant de détecter un impact potentiel des rejets urbains sur les écosystèmes (Gosset et al., in press) rapidement. Ces biocapteurs permettent de donner une réponse intégrée et rapide de l'impact des rejets de temps secs/de pluie issus de ces infrastructures, comme outils de prévention de la qualité biologique des milieux récepteurs. Le but de cette étude est de montrer comment plusieurs de ces outils se sont développés pour le suivi de la toxicité des rejets urbains, en lien avec la détection de certaines familles de polluants dans les rejets (pesticides, métaux lourds, etc.). Ces biocapteurs sont basés sur l'étude de la réponse (activité photosynthétique ou phosphatase) au stress (rejets) de microalgues soit encapsulées dans une double matrice alginate/silice, soit immobilisées sur des monocouches auto-assemblées (SAMs) de thiols d'alcane.

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Algues utilisées et culture

Trois espèces d'algues ont été utilisées pour cette étude : *Chlorella vulgaris* (Cv), *Pseudokirchneriella subcapitata* (Ps), et *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr). Les souches proviennent du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) de Paris. Les cultures d'algues sont cultivées en condition stérile dans un cycle nyctéméral jour/nuit de 16h/8h et repiquées hebdomadairement dans du milieu Lefebvre-Czarda (Cv, Ps), sans phosphate pour l'étude de l'activité phosphatase, ou TAP (Cr).

2.2 Biocapteurs optiques pour l'étude de l'activité photosynthétique

Les biocapteurs optiques développés dans cette étude impliquent l'immobilisation des algues en deux étapes (Voir figure 1)

La première consiste à créer un gel d'alginate dans lequel sont contenues les différentes espèces d'algue. Pour cela, la création de gel d'alginate dans des micropuits de plaque 96 puits est effectuée en agitant un aliquot de 50 µL de cellules en suspension avec 50 µL de tampon Tris-HCl (10 mM, pH=7,5) et 100 µL de 2% de Na(I)-alginate. Ce mélange est introduit dans les puits. Le gel d'alginate est ensuite réticulé immergeant le support d'échantillon dans une solution de CaCl₂ (0,1 M) pendant 10 minutes. Le CaCl₂ est ensuite retiré des micropuits afin de pouvoir passer à l'étape suivante.

La seconde consiste à déposer sur les gels préalablement réticulés une matrice de silice. Cette matrice est constituée par un procédé sol-gel en présence d'un silicate (silicate de sodium, Riedel-de Haën, NaOH à 10%, SiO₂ 27%) et de nanoparticules de silice commercial (Ludox HS-40, 40% dans l'eau, obtenu auprès de Sigma Aldrich). Le processus est réalisé à un pH de 6.5. La concentration finale en silice obtenue est de 3.8 %, avec un ratio fixe entre les précurseurs de silice (1: 3).

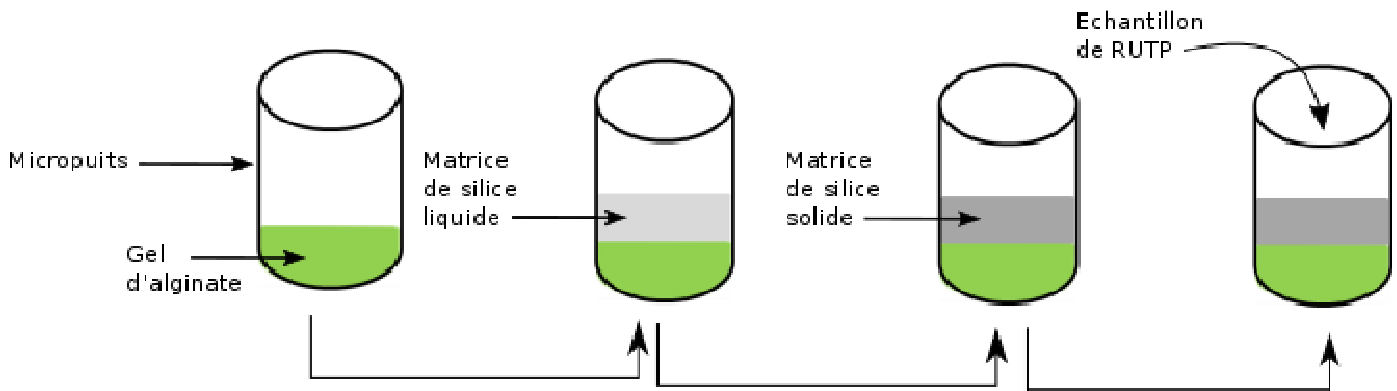


Figure 1 : Principe du biocapteur optique à double-encapsulation

2.3 Biocapteurs conductimétriques pour l'étude de l'activité phosphatase

Les monocouches auto-assemblées ont été réalisées selon le protocole établi par Guedri et Durrieu (2008) (Voir Figure 2). Pour cela des électrodes en platine interdigitées sont nettoyées aux ultrasons pendant 10 minutes, et subissent ensuite une réduction chimique par la mise en contact avec une solution de Piranha (H_2O_2/H_2SO_4 , 1:3 v/v) pendant 15 minutes. Les électrodes sont ensuite rincées à l'éthanol absolu et séchées sous un flux d'air. Les électrodes prétraitées sont alors mises en contact avec une solution d'acide 3-mercaptopropionique (MPA) (2 mM) pendant 12 heures à température ambiante. Les électrodes modifiées sont rincées à l'eau ultra-pure pour éliminer le MPA adsorbé physiquement sur la surface des électrodes. Un microlitre de solution de *Chlorella vulgaris* est ensuite déposé sur une des électrodes. La deuxième électrode reste libre et constitue ainsi l'électrode de référence. Le dépôt sera maintenu 12h sur les électrodes qui seront ensuite lavées à l'eau ultrapure afin d'enlever l'excès de cellules non immobilisées.

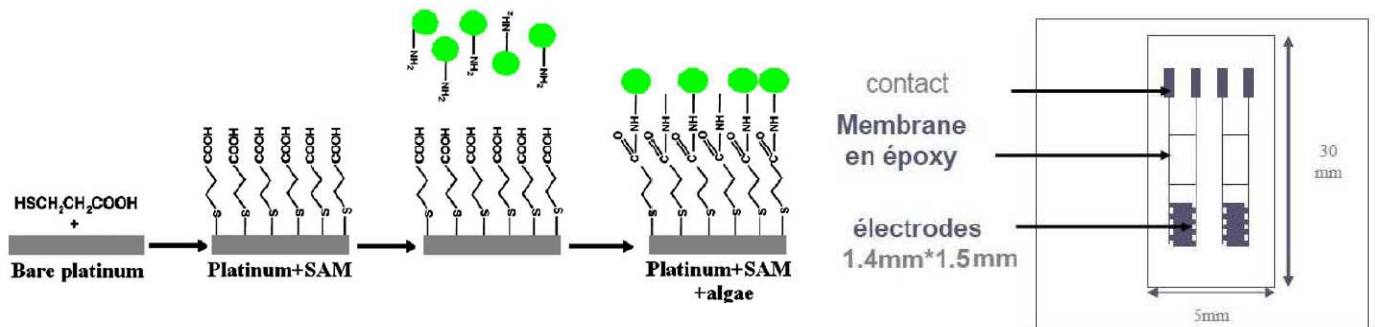
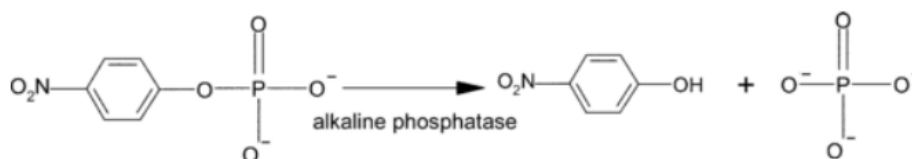


Figure 2 : Principe du biocapteur conductométrique à SAMs (d'après Guedri et Durrieu, 2008)

2.4 Mesure de la toxicité de rejets urbains à l'aide des différents biocapteurs

Des essais ont pu être réalisés après la mise en contact des biocapteurs avec des rejets de temps secs issus de différents sites de l'OTHU (bassin d'infiltration de Chassieu 03/03/2011 et déversoir dorage d'Ecully 03/03/2011). Dans le cas des biocapteurs optiques, une activité photosynthétique résiduelle des algues est déterminée, par la mesure de la fluorescence chlorophyllienne (ex. 460/em. 680) des algues exposées ou non, avant et après empoisonnement avec du DCMU à 4 mg/L (provoquant une fluorescence maximale). Dans le cas des biocapteurs conductométriques, une inhibition de l'activité phosphatase (spécifique des métaux) est observée. On utilise un substrat, qui après réaction se produit des espèces ioniques chargées entraînant un changement de conductivité, selon l'équation suivante :



Un différentiel de conductivité (dS) est mesuré pour une concentration de substrat de la phosphatase déterminée, pour une électrode témoin et une électrode exposée aux rejets.

3 RESULTATS

3.1 Détection de perturbation de l'activité photosynthétique par les rejets

Les résultats d'activité photosynthétique sont présentés sur la Figure 3. Par rapport aux essais contrôles (algues libres), on observe une activité résiduelle légèrement plus importante avec des algues encapsulées en deux étapes. Cependant, un effet est dans la plus part des cas détectée (ex : Cv exposées au rejet d'Ecully: 40% d'activité résiduelle). La présence de pesticides agissant sur la photosynthèse, et retrouvés dans les rejets peuvent expliquer ces inhibitions (Chassieu : 833 ng/L de Diuron, 19.9 ng/L d'Atrazine, 82.9 ng/L d'Isoproturon, 44.2 ng/L de Simazine; Ecully : 25 ng/L de Diuron, 2.9 ng/L d'Atrazine, 2.8 ng/L de Simazine). Ces biocapteurs développés montrent donc une utilité importante pour la surveillance des eaux urbaines contaminées par les pesticides.

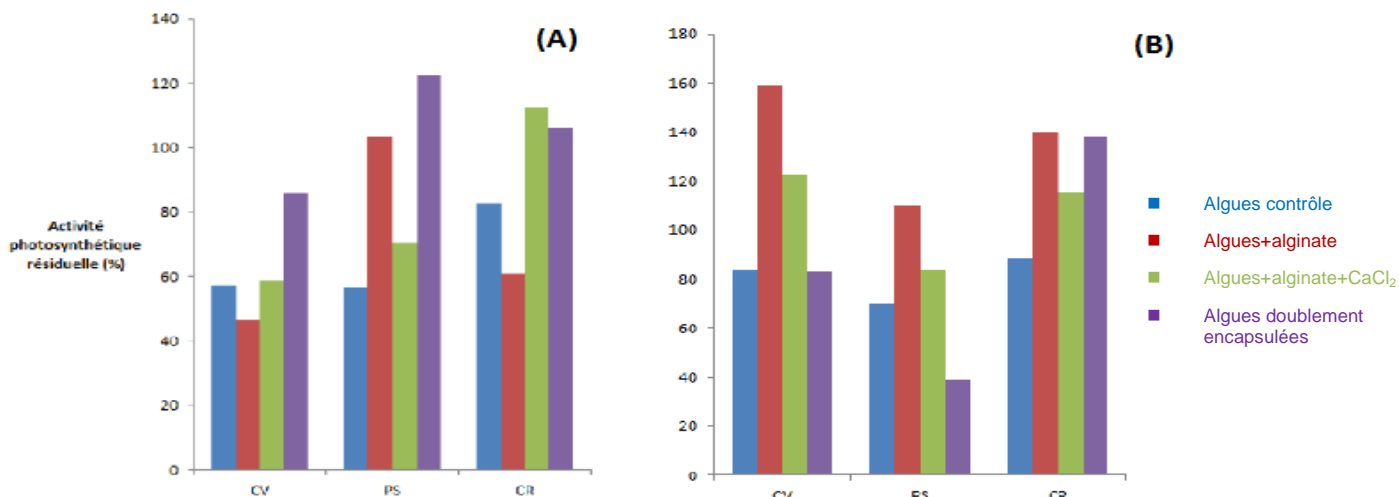


Figure 3 : Résultats d'essais d'activité photosynthétiques après exposition aux rejets (A) de Chassieu, (B) d'Ecully.

3.2 Détection de perturbation de l'activité phosphatase par les rejets

Les résultats d'étude de l'activité phosphatase obtenus sont présentés dans la figure 4. Les essais montrent qu'après 2 heures d'exposition aux rejets l'activité est très fortement inhibée (Chassieu : 20.78% ; Ecully : 8.15% d'activité résiduelle). On peut de même constater que cette inhibition est relativement constante quel que soit le temps d'exposition (Chassieu : 20.78, 29.21 et 26.58 % d'activité résiduelle à 2, 24 et 48 heures d'expositions ; Ecully : 8.15, 1.96 et 2.14 %). Les concentrations en métaux dans les rejets (220 µg/L de Zn pour Chassieu ; 26.78 µg/L de Cu pour Ecully) peuvent expliquer ces résultats. Ces biocapteurs semblent donc être performants pour le suivi des rejets.

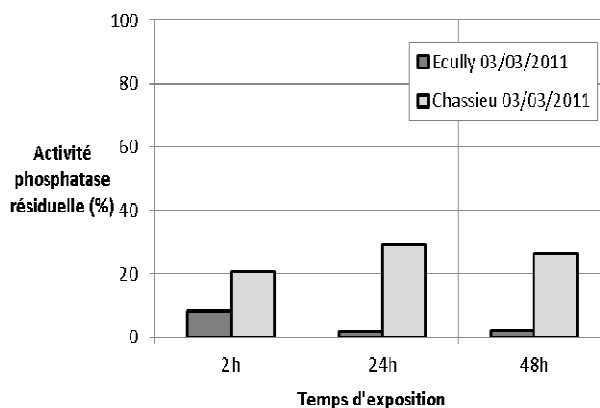


Figure 4 : Résultats d'essais d'activité phosphatase après exposition aux rejets

4 CONCLUSION

On a développé au sein de notre laboratoire différents types de biocapteurs pour l'évaluation de la toxicité des rejets urbains par temps secs/de pluies, à l'origine du déversement de nombreux polluants dans les écosystèmes aquatiques. Les essais menés sur plusieurs rejets ont montré une sensibilité importante à la fois pour l'impact de l'activité photosynthétique et pour l'impact des activités phosphatase, en lien avec les pesticides et métaux. Il existe donc une complémentarité de ces biocapteurs, sensibles à des familles de polluants différentes. D'autres activités ont également été étudiées au moyen de ces biocapteurs (activité estérase). Il est donc possible de mettre en évidence à l'heure actuelle un impact. Cependant, le développement de cet outil se poursuit de manière à optimiser la sélectivité et le contact des polluants avec les algues, notamment en capteur optique.

BIBLIOGRAPHIE

- Curren, J., Bush, S., Ha, S., Stenstrom, M.K., Lau, S.-L., Suffet, I.H.M., 2011. Identification of subwatershed sources for chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in the Ballona Creek watershed. *Science of The Total Environment* 409(13), 2525–2533. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.03.019.
- Deffontis, S., Breton, A., Vialle, C., Montréjaud-Vignoles, M., Vignoles, C., Sablayrolles, C., 2013. Impact of dry weather discharges on annual pollution from a separate storm sewer in Toulouse, France. *Science of The Total Environment* 452-453, 394–403. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.03.014.
- Gasperi, J., Garnaud, S., Rocher, V., Moilleron, R., 2008. Priority pollutants in wastewater and combined sewer overflow. *Science of The Total Environment* 407(1), 263–272. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.08.015.
- Gosset, A., Ferro, Y., Claude, C. (in press). Methods for evaluating the pollution impact of urban wet weather discharges on biocenosis: a review. *Water Research*. Doi: 10.1016/j.watres.2015.11.020.
- Guedri, H., Durrieu, C. (2008). A self-assembled monolayers based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring. *Microchimica Acta*, 163(3-4), 179-184.
- Hwang, H., Foster, G., 2006. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff flowing into the tidal Anacostia River, Washington, DC, USA. *Environmental Pollution* 140(3), 416–426. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.003.
- McQueen, A.D., Johnson, B.M., Rodgers Jr., J.H., English, W.R., 2010. Campus parking lot stormwater runoff: Physicochemical analyses and toxicity tests using *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Chemosphere* 79(5), 561–569. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.004.
- Miltner, R.J., White, D., Yoder, C., 2004. The biotic integrity of streams in urban and suburbanizing landscapes. *Landscape and Urban Planning* 69(1), 87-100. doi:10.1016/j.landurbplan.2003.10.032.
- Paul, M.J., Meyer, J.L., (2001). Streams in the urban landscape. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 333-365.
- Stearman, L.W., Lynch, D.T., (2013). Patterns of assemblage change in prairie stream fishes in relation to urban stormwater impoundments. *Hydrobiologia* 718(1), 221–235. doi:10.1007/s10750-013-1629-z.
- Tang, J.Y.M., Aryal, R., Deletic, A., Gernjak, W., Glenn, E., McCarthy, D., Escher, B.I., 2013. Toxicity characterization of urban stormwater with bioanalytical tools. *Water Research* 47(15), 5594–5606. doi:10.1016/j.watres.2013.06.037.