

## Article

---

« Biocapteurs pour le contrôle de la toxicité des eaux : application des bioélectrodes algales »

P. Pandard et P. Vasseur

*Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, vol. 5, n° 3, 1992, p. 445-461.

Pour citer cet article, utiliser l'information suivante :

URI: <http://id.erudit.org/iderudit/705141ar>

DOI: 10.7202/705141ar

Note : les règles d'écriture des références bibliographiques peuvent varier selon les différents domaines du savoir.

---

Ce document est protégé par la loi sur le droit d'auteur. L'utilisation des services d'Érudit (y compris la reproduction) est assujettie à sa politique d'utilisation que vous pouvez consulter à l'URI <https://apropos.erudit.org/fr/usagers/politique-dutilisation/>

---

Érudit est un consortium interuniversitaire sans but lucratif composé de l'Université de Montréal, l'Université Laval et l'Université du Québec à Montréal. Il a pour mission la promotion et la valorisation de la recherche. Érudit offre des services d'édition numérique de documents scientifiques depuis 1998.

Pour communiquer avec les responsables d'Érudit : [info@erudit.org](mailto:info@erudit.org)

# **Biocapteurs pour le contrôle de la toxicité des eaux : application des bioélectrodes algales**

Biosensors for monitoring pollutions of aquatic systems : applications of algal electrodes

PASCAL PANDARD<sup>1</sup>, PAULE VASSEUR<sup>1</sup>

Reçu le 17 juin 1991, accepté pour publication le 4 mars 1992\*.

## **SUMMARY**

**Environmental monitoring of pollutants with automatic systems, applied on-line and allowing rapid response constitutes one of the most successful ways to improve the quality of the environment. Real time analysis offers the advantage of detecting rapidly sources of pollution and preventing any accidental release of pollutants. Such a strategy is possible only by means of biosensors : current methods, commonly used for toxicity testing are usually carried out in laboratory in static conditions, making real time analysis impractical.**

**Two types of amperometric environmental sensor incorporating eukaryotic algae were investigated for use in monitoring industrial pollution of aquatic systems. Both sensors allowed the monitoring of photosynthetic events.**

**The first sensor follows photosynthetic electron chain events within the cell resulting in the reduction of mediator acting as terminal electron acceptor. Reoxidation of the mediator at the biosensor electrode surface results in a flow of current, the magnitude of which is proportional to the level of photosynthetic activity of the microalgae.**

**In the second approach photosynthetic oxygen evolution by the illuminated biocatalyst is measured by reduction at a cathodic electrode. Enzymic systems associated with the water splitting and oxygen evolution are amongst the most fragile components of the photosynthetic apparatus, and the monitoring of algal oxygen production is therefore a useful approach to early detection of toxic environmental pollutants.**

**Several species of unicellular algae were used for these experiments : *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. Algal cultures were harvested in the exponential growth phase and**

1. Laboratoire de toxicologie, Centre des Sciences de l'Environnement, 1, rue des Récollets, BP 4025, 57040 Metz cedex 1.

\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 mars 1993.

diluted to 0.5 O.D. (665 nm) ; then 1 ml aliquots were centrifuged at 900xg for 3 min. After centrifugation, cells were resuspended in growth medium, LEFEBVRE and CZARDA (LC), and immobilized by aspiration onto a filter disc. This filter disc was placed onto the carbon working electrode surface. Filters were held in place by a fine nylon mesh.

This biosensor is a two electrode system comprising a carbon working electrode and Ag/AgCl reference/counter electrode. Solution was continuously flowed through the electrochemical cell at a flow rate of 2 ml min<sup>-1</sup>. Illumination of the algal biocatalyst was supplied by light emitting diodes with a peak wavelength of 635 nm and a light intensity of 125 millicandelas. Periodicity of illumination was chosen in order to obtain a stable photosynthetic response.

Biosensors exploiting direct electron transfer from a biocatalyst to an electrical system are not feasible. Indeed, the cell wall of the biocatalyst acts as a barrier to the exchange of electrons between the electrode and the redox intermediates of the cell. Electroactive compounds (mediators) must be used to shuttle electrons from the photosynthetic electron transfer chain to the electrode. Mediators were added to the flowing solution of LC medium, and a potential of 550 mV applied at the working electrode to reoxidize mediator reduced by the biocatalyst. The mediator must be lipophilic to access the chloroplast electron transport chain of eukaryotic algae. We tested a wide range of mediators but only p-benzoquinone (p-BQ) and 2,6-dimethylbenzoquinone gave measurable responses.

A concentration of 0.2 mM p-BQ (21.5 mg/l) was employed to measure photosynthetic activity. Experiments showed that 15 minutes light period followed by a 15 minutes dark period gave a steady photosynthetic response. However, this high concentration of mediator was toxic for the cells. Static algal tests using *Chlorella vulgaris* have shown that growth is totally inhibited after 72 hours at a concentration of 5.4 mg/l. The working life of this sensor was therefore very short, less than 24 hours : after 16 hours of continuous monitoring, the recorded photosynthetic current was less than 20 % of initial response. Sensor life was not increased when the probe was used alternately with recovery periods in nutrient medium (4 hours of working period/4 hours of recovery period).

The same apparatus was used for the oxygen electrode based biosensor. The working electrode was coated with a Teflon gas permeable membrane to protect the sensor against poisoning by electrochemically active compounds. Separation of the working and reference/counter electrode requires addition of electrolyte in the flowing solution. With such a semi-protected oxygen electrode, mass transport controlled oxygen reduction currents were obtained when the Teflon covered cathode was poised at -700 mV.

The oxygen biosensor responded more rapidly than the mediated biosensor to changes in the light regime, and alternating light and dark periods of 1 min of light followed by 4 min of dark were used. The sensor also showed good long term stability, with a working life of up to seven days using *Chlorella vulgaris* or *Scenedesmus subspicatus* as biocatalysts.

The sensitivity of this oxygen electrode based biosensor was tested on herbicides (isoproturon, propanil and atrazine), cyanide and heavy metals (copper and mercury). Results were compared with those obtained with three toxicity tests : a standard algal growth inhibition test, the inhibition of photosynthetic activity in spinach leaves and the alga *Chlamydomonas reinhardtii*, and the Microtox test using the luminescent bacterium *Photobacterium phosphoreum*.

IC<sub>50</sub> obtained for isoproturon and atrazine were very similar for the growth inhibition and the oxygen sensor tests. The inhibition of oxygen production by spinach leaves was less sensitive to atrazine ; no toxic effect could be detected with the Microtox test. The oxygen sensor was also very sensitive to cyanide but the response of the probe was quite different if *Selenastrum capricornutum* or *Chlorella vulgaris* was used.

The sensor allowed metals detection but this detection of toxicity was slow compared to that of herbicides or cyanide. Inhibition growth tests and Microtox test were more sensitive than the algal sensor for copper and mercury.

**Key-words :** biosensor, pollution, chlorophyceae, photosynthesis, oxygen electrode.

## RÉSUMÉ

L'amélioration de la qualité de l'environnement passe par la réalisation de contrôles de toxicité *in situ* et en continu des sources de pollution ou des milieux contaminés, à l'aide de systèmes automatisés à réponse rapide. Les systèmes donnant une réponse en temps réel permettent d'intervenir immédiatement à la source, d'interrompre le rejet d'un flux toxique et de prévenir ainsi les accidents de pollution. Ce type de stratégie ne peut être développé qu'au moyen de biocapteurs : les méthodes d'essais conventionnelles n'autorisent que des contrôles de toxicité épisodiques, en laboratoire, effectués dans des conditions statiques quelque peu éloignées des conditions dynamiques.

Nous nous sommes intéressés à la mesure de l'activité photosynthétique d'algues unicellulaires immobilisées. La photosynthèse induite par des stimuli lumineux est en effet un processus dont la réponse est immédiate et aisément mesurable à l'aide de transducteurs électrochimiques. Il apparaît donc intéressant d'utiliser ces réactions photosynthétiques pour la détection des polluants.

Deux dispositifs mesurant l'activité photosynthétique d'algues unicellulaires ont été testés. Le premier dispositif mesure le transfert d'électrons le long de la chaîne photosynthétique lors d'une illumination des micro-organismes. Le second système permet de quantifier la production d'oxygène résultant de cette excitation lumineuse.

La mesure du transfert d'électrons photosynthétiques nécessite l'addition d'une substance oxydo-réductible (médiateur) dans le milieu pour capter ces électrons. De la série de médiateurs testés, seuls les dérivés à caractère lipophile (2,6-diméthylbenzoquinone et p-benzoquinone) ont permis de mesurer un transfert d'électrons. Toutefois la durée de vie de ce biocapteur s'est révélée limitée à moins de 24 heures, ce qui exclut toute utilisation en continu.

Le second dispositif développé présente en revanche une longévité d'une semaine, ce qui le rend intéressant en vue d'une utilisation *in situ*. Les performances de ce capteur à oxygène ont été testées sur des produits de type herbicides, cyanures, métaux et comparées aux valeurs obtenues à l'aide de tests algues classiques ou de méthodes de détection rapide de la toxicité.

**Mots clés :** biocapteur, pollution, chlorophycées, photosynthèse, électrode à oxygène.

## 1 - INTÉRÊT DES BIOCAPTEURS DANS LES CONTRÔLES DE TOXICITÉ

Le contrôle de la toxicité des eaux, qu'il s'agisse d'effluents industriels, d'eaux de surface ou d'eaux potables, relève actuellement d'une approche de laboratoire ; celle-ci implique une étape d'échantillonnage et de transfert du milieu à analyser, préalable à la phase de réalisation des essais sur organismes cellulaires, vertébrés ou invertébrés aquatiques. Les prélèvements sont périodiques, les essais effectués en système statique et les résultats différés par rapport au prélèvement : ce sont donc des conditions peu propices à un contrôle interactif. Elles excluent toute possibilité d'intervention si les résultats du contrôle témoignent d'une toxicité ; les bassins de rétention n'existent pas et l'effluent toxique a rejoint depuis longtemps le milieu naturel lorsque la réponse des essais est connue.

Actuellement, il n'y a pas de biomonitoring des effluents industriels et des eaux de surface ; celui-ci commence seulement à se développer dans le domaine des eaux potables : c'est par exemple l'automatisation du test Microtox pour le contrôle des eaux destinées à la potabilisation avant leur traitement (LEVI *et al.*, 1989) et l'utilisation du truitomètre pour évaluer la qualité des eaux de boisson.

Compte tenu de la menace permanente de contamination des eaux par des micropolluants d'origine agricole et industrielle, il serait justifié de mettre en place des systèmes de contrôles de toxicité en continu des sources de pollution ; ces systèmes devraient être placés au sein même du flux circulant à contrôler, capables de fonctionner en dynamique et de constituer des systèmes d'alerte pour la prévention des accidents de pollution et de la contamination à long terme des écosystèmes.

Ce type de contrôle des effluents industriels et des eaux de surface n'existe pas et ne peut pas être assuré par des essais en laboratoire. Par contre, les biocapteurs, de par leur conception, répondent à ces critères et pourraient combler les lacunes du contrôle environnemental. Ce sont des systèmes se prêtant à l'automatisation, donnant une réponse en temps réel, ce qui permet une action rapide en cas de toxicité manifeste : interruption de l'arrivée ou de l'évacuation d'un flux toxique, dérivation vers un bassin de rétention, retour à une station de traitement ou à un atelier de fabrication.

### 1.1 Structure des biocapteurs adaptés au contrôle toxicologique

Dans un biocapteur, le réactif biologique est fixé sur une membrane ou un support ; il est connecté à un TRANSDUCTEUR qui transformera la réponse physiologique en un signal électrique ou digital, ultérieurement enregistré et amplifié.

Les critères biologiques étudiés pour évaluer la toxicité sont ceux classiquement mis à profit dans la technologie des biocapteurs : des transducteurs électrochimiques, optiques, voire calorimétriques peuvent être utilisés pour

mesurer les principales fonctions métaboliques susceptibles d'être perturbées par l'exposition au flux toxique, par exemple :

- la respiration cellulaire évaluée par la consommation d'oxygène ou la production de  $\text{CO}_2$ ,
- le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire ou celui des systèmes rédox des membranes chloroplastiques pour le contrôle de l'activité photosynthétique chez les organismes végétaux,
- la transformation d'un substrat et la production de métabolites,
- la production de photons.

Ce sont les cinétiques de variation de ces paramètres qu'il est intéressant d'enregistrer ; elles permettront de s'affranchir de l'influence du bruit de fond ; de distinguer entre une dérive et une variation brusque de la réponse laquelle sera l'indice d'un afflux anormal de micropolluants.

La nature du REACTIF BIOLOGIQUE sera fonction du rôle du capteur, selon qu'il est recherché une détection spécifique ou globale des micropolluants. Ce réactif biologique peut être constitué :

- de biomolécules dotées d'une réactivité spécifique, comme des enzymes ou des anticorps, qui seront des réactifs de choix pour la recherche d'une classe particulière de micropolluants avec lesquels elles réagiront ;
- d'organismes cellulaires, procaryotes ou eucaryotes s'il s'agit d'évaluer la toxicité globale de l'ensemble des contaminants présents dans un mélange complexe, ce qui requiert l'utilisation de détecteurs à large spectre de sensibilité.

Les organismes cellulaires intègrent en effet un ensemble de réactions métaboliques contrairement aux enzymes spécifiques d'un schéma réactionnel.

Le mode de fixation du réactif biologique sur la surface active du support va dépendre de sa nature. La fixation covalente est d'usage pour des macromolécules ; elle est déconseillée, par contre, pour l'immobilisation des cellules dont l'intégrité membranaire risque d'être altérée par les réactifs mis en œuvre pour l'établissement de liaisons covalentes : l'adsorption dans ce cas est préférable.

L'inclusion du réactif à l'intérieur d'un gel ou d'une matrice est à exclure dans le cas de biocapteurs à finalité toxicologique : les constituants du gel peuvent adsorber les substances toxiques, faire barrière à la diffusion des micropolluants minéraux qui réagiront avec les groupements polaires de la matrice.

## 1.2 Biocapteurs proposés pour le contrôle toxicologique

Les principaux biocapteurs proposés actuellement pour le contrôle toxicologique sont présentés dans le tableau 1 ; on distingue :

- les biocapteurs spécifiques pour la détection de micropolluants de types : organophosphorés et carbamates, phénols, métaux,
- les biocapteurs pour la détection d'une toxicité globale, relevant d'effets de toxicité aiguë vis-à-vis d'organismes animaux ou végétaux et d'effets génotoxiques.

**Tableau 1** Biocapteurs proposés pour le contrôle toxicologique.**Table 1** Environmental sensors.

Biocatalyseurs (références)	Transducteurs	Toxiques	Concentration
Cholinestérase (1)	Colorimétrie	Pesticides	0,1/10 mg/l
Cholinestérase (2)	El. platine	Pesticides	0,1/20 mg/l
Cholinestérase (3)	Fibre optique photodiodes (colorimétrie)	Pesticides organo-phosphorés	Paraoxon 5 µg/l
<i>B. subtilis</i>	• El. à O <sub>2</sub>	Produits mutagènes	2/20 mg/l
<i>S. typhimurium</i> (4)			
<i>E. coli</i> (5)	El. à CO <sub>2</sub>	Micropolluants métalliques	0,13/1,5 mg/l
Phénol oxydase (6)	El. à O <sub>2</sub>	Phénols	0,5/6 mg/l
<i>Synechococcus</i> (7)	El. carbone + médiateur	Herbicides	min 20 µg/l

(1) SMITH, 1985.

(2) GOODSON et JACOBS, 1974.

(3) WOLFBELS et KOLLER, 1989.

(4) KARUBE *et al.*, 1981, 1982.

(5) DORWARD et BARISAS, 1984.

(6) MACHOLAN et SCHANEL, 1977.

(7) RAWSON *et al.*, 1987.

Ces détecteurs sont des systèmes en cours de validation, qui n'ont pas atteint encore le stade de la commercialisation. Il existe de ce point de vue un paradoxe entre la multiplicité des systèmes proposés dans la littérature et le nombre en fait très limité de biocapteurs potentiellement en usage pour le contrôle des micropolluants et de leur toxicité.

Ce frein à l'application des biocapteurs en toxicologie peut s'expliquer par la nature biologique du détecteur, dont la sensibilité aux substances toxiques sera fonction des conditions de pH, température, oxygénation et force ionique du milieu.

Dans les essais de toxicité standardisés effectués classiquement au laboratoire, ces paramètres sont fixés par la composition même des milieux tests. Pour s'assurer que ces paramètres n'interfèrent pas avec les mesures de toxicité par les biocapteurs, leur valeur devrait être également contrôlée, sinon ajustée à un niveau donné. Une régulation de ces paramètres dans le flux à analyser, avant son passage au niveau de la membrane active pourrait alors s'avérer nécessaire. Le biocapteur, à proprement parler, devra donc être assorti de systèmes de régulation qui vont compliquer l'infrastructure de l'analyseur et constituer autant de sources possibles de dysfonctionnement.

Pour présenter une durée de validité suffisante, le réactif devra être régénéré par des solutions appropriées ou par l'apport d'un minimum de nutriments s'il s'agit de réactifs cellulaires : la complexité de l'analyseur s'en trouvera encore augmentée. S'il s'avère que la régénération ne peut pas se faire pendant que le système est opérationnel, il sera même nécessaire de disposer d'un double circuit pour assurer la continuité du contrôle, l'un des deux capteurs restant fonctionnel pendant que l'autre se régénère.

Dans ces conditions, il est facile de concevoir que le système qui aura le plus de chances d'arriver au stade de l'application en routine, est celui qui sera le plus simple au plan de l'appareillage et le moins exigeant au plan des

régulations ; encore faut-il qu'il ait fait preuve de sensibilité, reproductibilité, fiabilité et d'une longévité satisfaisante.

Ces éléments nous ont amenés à concevoir un biocapteur utilisant des organismes photosynthétiques dont l'autotrophie permet de satisfaire à ces critères de simplicité. Un tel système répond, par ailleurs, à la nécessité de contrôler l'impact des substances chimiques et des micropolluants sur les organismes végétaux, maillon essentiel des écosystèmes.

La photosynthèse, induite par des stimuli lumineux, est un processus dont la réponse est immédiate, aisément mesurable à l'aide de transducteurs électrochimiques. C'est un processus facile à contrôler en jouant sur l'intensité des excitations lumineuses.

Le biocapteur que nous avons développé est basé sur l'utilisation d'algues unicellulaires en tant que système d'alerte pour la prévention des pollutions accidentelles.

## 2 - BIOÉLECTRODES ALGALES

Les algues unicellulaires représentent le premier maillon des chaînes trophiques aquatiques et il apparaît indispensable de connaître et prévenir l'impact des xénobiotiques sur ces micro-organismes. Les algues sont des réactifs sensibles couramment utilisés en toxicologie expérimentale afin d'évaluer la toxicité des substances chimiques sur les organismes photosynthétiques (ISO 8692, EPA 600, OCDE 201).

Nous avons étudié deux dispositifs mesurant l'activité photosynthétique de ces algues unicellulaires immobilisées :

- le premier système mesure le transfert d'électrons le long de la chaîne photosynthétique lors de l'illumination de ces micro-organismes,
- le second dispositif permet de quantifier la production d'oxygène résultant de cette excitation lumineuse.

Rappelons que les réactions lumineuses de la photosynthèse se traduisent par une production d'électrons au niveau des photosystèmes des membranes chloroplastiques sous l'influence d'un rayonnement lumineux. Ces électrons, utilisés pour réduire le NADP<sup>+</sup>, vont être transportés jusqu'à ce cofacteur par l'intermédiaire de couples oxydo-réducteurs comme la phéophytine, les quinones ou la ferrédoxine. Ce transfert s'accompagne de la production d'ATP qui va servir, ainsi que le NADP réduit, à la cellule végétale pour ses réactions de biosynthèse. Les photosystèmes temporairement excités retournent à leur état initial en captant des électrons libérés par la décomposition des molécules d'eau, réaction qui entraîne également un dégagement d'oxygène.

Cette émission d'électrons et cette production d'oxygène vont traduire l'intensité de l'activité photosynthétique des algues unicellulaires. Les pro-



téines et les enzymes associées à ce système de photolyse de l'eau comptent parmi les composantes les plus fragiles de l'appareil photosynthétique. Un suivi de cette activité photosynthétique peut donc servir d'outil d'alerte pour la détection rapide des effets négatifs des polluants sur les espèces végétales.

## 2.1 Matériel biologique

Les essais ont été réalisés sur des chlorophycées représentatives des eaux douces. Les espèces choisies sont celles habituellement recommandées pour les tests d'écotoxicité en milieu hydrique : *Chlorella vulgaris* (CCAP 211/11b), *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662), *Scenedesmus subspicatus* (Gottingen 86-81). Les souches, conservées au laboratoire, sont cultivées stérilement et entretenues par repiquage hebdomadaire en milieu LEFEBVRE et CZARDA (AFNOR, 1980). Pour la préparation des électrodes, une fraction de culture algale est prélevée en phase exponentielle de croissance, puis elle est diluée, si nécessaire, avec du milieu de culture stérile jusqu'à obtention d'une valeur de D.O., mesurée à 665nm, proche de 0,5.

Chaque électrode est ensuite préparée à partir de 1 ml de cette solution ; après centrifugation (900xg pendant 3 minutes), le culot est remis en suspension dans 25  $\mu$ l de milieu de culture puis disposé par filtration sur une membrane ; cette membrane « active » sera appliquée ensuite à l'extrémité de l'électrode.

## 2.2 Description du système de mesure du flux électronique

Le système réalisé est un système à deux électrodes comprenant une électrode de graphite (électrode de travail) et une électrode argent/chlorure d'argent (électrode de référence et contre-électrode combinées). La circulation du milieu s'effectue de manière tangentielle à la surface du biocapteur permettant ainsi une circulation du milieu au niveau des électrodes.

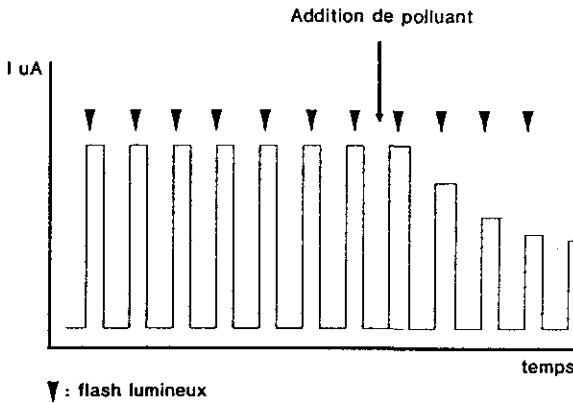
Les algues, immobilisées par filtration sur membrane aluminium 0,2  $\mu$ m (ANOTEC, Brandbury G.B.), sont placées au contact de l'électrode de travail. L'excitation lumineuse est réalisée par l'intermédiaire d'une diode émettrice rouge possédant son maximum à 635 nm et une intensité lumineuse de 125 millicandellas.

La durée et la périodicité de ces flashes lumineux sont définies de manière à obtenir une réponse photosynthétique d'intensité constante : la phase lumineuse et la phase obscure ont été fixées à 15 minutes.

Le type de transducteur utilisé (ampérométrique) se caractérise par l'application d'un potentiel constant entre l'électrode de travail et une électrode auxiliaire maintenue à un potentiel de référence (dans ce cas + 550 mV). Une interface programmable (ARTEK, Laverdon, Bucks, G.B.) connectée à un micro-ordinateur (BBC Microcomputer ACORN, Cambridge, G.B.) maintient ce potentiel constant entre l'électrode de graphite et l'électrode argent/chlorure d'argent. Ce dispositif permet l'enregistrement en continu des courants obtenus lors de l'excitation lumineuse du biocatalyseur. Un exemple des courbes  $I = f(t)$  enregistrées est présenté figure 1. En présence de composés

toxiques, la réponse des micro-algues est perturbée ; ces altérations se traduisent par une diminution du courant mesuré (fig. 1).

La paroi cellulaire agit comme une barrière à l'échange d' $e^-$  entre les composés oxydo-réducteurs intracellulaires et l'électrode collectrice (BENNETO *et al.*, 1983) et s'oppose ainsi au transfert direct des électrons entre le réactif biologique et l'électrode. Ceci nous a obligé à utiliser des molécules électro-actives ou médiateurs qui détournent les électrons émis au niveau des chloroplastes et les transfèrent à l'électrode. Le médiateur, ajouté dans la solution circulante, agit au niveau de la chaîne de transfert électronique comme un accepteur terminal d'électrons. La réoxydation de ce médiateur à l'électrode entraîne la production d'un courant qui sera proportionnel à l'activité photosynthétique des algues unicellulaires (fig. 2).



**Figure 1** Intensité du courant photosynthétique d'algues unicellulaires (émission d'électrons) produit en réponse à des flashes lumineux, influence de l'ajout de substances toxiques dans le milieu.

*Photosynthetic current recorded when unicellular algae are illuminated. Influence of pollutants on photosynthetic current.*

Nous avons étudié différents médiateurs : méthylviologène, 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP), ferricyanure ( $Fe(CN)_6$ ), safranine O, p-benzoquinone (p-BQ) et 2,6-diméthylbenzoquinone. Au cours de ces essais, seules la p-benzoquinone et la 2,6-diméthylbenzoquinone, ont permis de quantifier la réponse photosynthétique de ces algues unicellulaires.

En revanche des composés tels que le méthylviologène et le DCPIP qui avaient été utilisés avec succès pour mesurer l'importance du transfert électronique au niveau du PS I et PS II de chloroplastes isolés (MIMEAULT et CARPENTIER, 1989), n'ont permis de suivre l'émission d'électrons pour aucune des espèces algales testées. Cette absence de réactivité a également été observée pour  $Fe(CN)_6$  souvent utilisé pour capter les électrons des photo-systèmes.

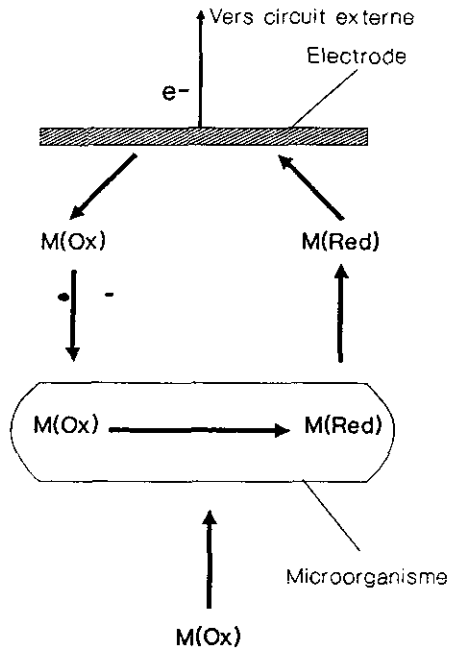


Figure 2 Réduction du médiateur au contact de la membrane des thylacoïdes et réoxydation à la surface de l'électrode se traduisant par l'apparition d'un courant.

*Reduction of the mediator at thylakoid membrane and mediator reoxidation at the electrode surface resulting in a flow of current.*

Les médiateurs de la famille des quinones sont des composés à caractère lipophile qui vont pénétrer dans les cellules pour accéder aux chloroplastes. Les autres médiateurs considérés ne sont pas actifs car la paroi algale fait vraisemblablement obstacle à la pénétration de ces produits au sein de la cellule.

Une concentration de 21,6 mg/l de p-benzoquinone (soit 0,2 mM) est apparue nécessaire pour obtenir une réponse photosynthétique aisément mesurable. Mais, à cette concentration, le médiateur est toxique pour les cellules. Des tests de toxicité en statique ont montré que la croissance de *Chlorella vulgaris* est totalement inhibée après 72 h pour une concentration de 5,4 mg/l. VERSCHUEREN (1983) rapporte qu'une concentration de 6 mg/l de p-BQ est toxique pour *Scenedesmus subspicatus*.

La durée de vie du biocapteur s'est donc révélée très courte. Après 16 heures d'utilisation en continu la réponse photosynthétique de *Chlorella vulgaris* n'est plus que 20 % par rapport à la réponse maximale enregistrée au départ. La durée de vie du capteur n'est pas augmentée si celui-ci est utilisé pendant de courtes périodes de 4 heures alternant avec des phases de régénération par le milieu nutritif LEFEBVRE et CZARDA d'une durée équivalente.

Ces conclusions rejoignent les travaux de RAWSON *et al.* (1987) qui ont montré que l'utilisation de tels médiateurs réduisait la vie d'un biocapteur à cyanobactéries à 24 heures, alors qu'elle est de 6 jours avec un médiateur comme le  $\text{Fe}(\text{CN})_6$ .

### 2.3 Mesure de l'oxygène photosynthétique

L'application du système à médiateur pour le contrôle de toxicité des eaux n'a pas été retenu compte tenu de sa faible durée de vie. Nous avons donc développé un second dispositif mesurant la production d'oxygène par des algues unicellulaires immobilisées. Dans ce système, l'oxygène produit par le photosystème II en présence de lumière est mesuré en continu.

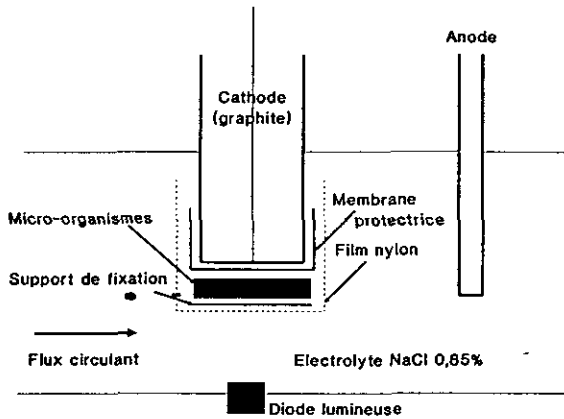
La production d'oxygène est un paramètre d'ailleurs repris dans de nombreux travaux pour évaluer la toxicité des substances chimiques (CEDENO-MALDANO, 1972 ; OVERNELL, 1975 ; OVERNELL, 1976 ; CALLEGARI et LANNOYE, 1981).

La cellule de mesure et le dispositif d'enregistrement du courant correspondant à l'activité photosynthétique des algues unicellulaires sont identiques à ceux utilisés pour le système à médiateur. La cathode de graphite est protégée par une membrane de Téflon. Cette précaution s'avère nécessaire car les électrodes à oxygène de type ouvert sont aisément contaminables par des substances telles que le ferricyanure ou l'ascorbate, susceptibles de perturber la mesure. Les modifications effectuées portent sur les paramètres suivants :

- changement du potentiel imposé entre les bornes des 2 électrodes, qui doit être suffisamment réducteur pour que la totalité de l'oxygène produit par les micro-organismes soit réduit à l'électrode,
- addition d'un électrolyte dans le milieu circulant, rendue nécessaire par la configuration de l'électrode à oxygène choisie de type ouvert afin de permettre les réactions d'oxydo-réduction,
- modification de la périodicité des flashes lumineux : la phase lumineuse a une durée d'une minute, la phase obscure de quatre minutes.

Les expériences réalisées en vue d'optimiser ce prototype (*fig. 3*) nous ont amenés à imposer un potentiel de  $-700$  mV entre les 2 électrodes et à choisir le NaCl à une concentration de 0,85 % comme électrolyte. Le choix du support de fixation est important car il va conditionner la rapidité et la sensibilité du biocapteur. Ainsi les essais ont montré qu'un temps de réponse plus court de l'électrode et une meilleure sensibilité à l'isoproturon (0,1 mg/l) étaient obtenus avec une membrane de fluorure de polyvinylidène (millipore HVLP) comme support de fixation, par rapport à des membranes de nylon (pallbodyne) ou d'ester de cellulose (millipore GSTF ou HAWP).

La recherche d'un gain de sensibilité nous a également conduit à définir la concentration optimale de micro-organismes à filtrer sur la membrane support (de l'ordre de  $10^7$  cellules/cm<sup>2</sup> pour *Scenedesmus subspicatus*). La sensibilité de ces bioélectrodes s'est révélée d'autant plus importante que la population algale immobilisée était faible. Pour une concentration d'algues 14 fois plus élevée, la sensibilité du capteur à l'isoproturon (0,10 mg/l) et au cuivre (1,5 mg/l en  $\text{Cu}^{2+}$ ) est deux fois plus faible (PANDARD, 1990).



**Figure 3** Configuration du capteur à oxygène comportant les micro-algues immobilisées au contact de la cathode de graphite.

*Oxygen sensor including microorganisms on graphite cathode.*

Avec ces conditions expérimentales, la durée de vie observée pour ce biocapteur est de l'ordre de 7 jours en utilisant *Chlorella vulgaris* ou *Scenedesmus subspicatus* comme biocatalyseur, ce qui représente un avantage considérable sur le système à médiateur étudié initialement.

#### 2.4 Sensibilité du capteur à oxygène

Nous avons testé les performances de ce biocapteur à oxygène sur une large gamme de produits toxiques (herbicides, cyanures, métaux). La sensibilité de ces bioélectrodes a été comparée à celle de tests classiques d'inhibition de croissance des micro-algues et à des méthodes de détection rapides de la toxicité (tableau 2).

A cet effet, nous avons effectué des essais pour évaluer la toxicité de l'isoproturon et des cyanures sur la croissance des micro-algues utilisées avec les bioélectrodes. Ces essais ont été réalisés en erlenmeyers de 100 ml contenant 50 ml de milieu test, dans les conditions expérimentales suivantes : numération  $10^5$  cellules/ml, milieu de culture LC, éclaircissement continu d'une intensité de  $2\ 200 \pm 200$  lux, température  $22 \pm 2$  °C, durée du test 5 jours.

Pour les autres substances, nous nous sommes référés aux données bibliographiques relatives aux concentrations inhibant 50 % de la croissance algale évaluées dans des conditions standardisées.

Une comparaison a été faite également avec les travaux de HYEON *et al.* (1982) et OVERNELL (1975) qui ont évalué la toxicité de ces mêmes substances sur la production d'oxygène photosynthétique d'espèces végétales.

Il était intéressant, enfin, de situer la sensibilité de la réponse de cette bioélectrode algale par rapport à celle de méthodes de détection rapide de la toxicité comme le test Microtox qui mesure l'inhibition de la bioluminescence de *Photobacterium phosphoreum* (BULICH et GREENE, 1979).

**Tableau 2** Comparaison de la sensibilité du biocapteur (électrode à O<sub>2</sub>) à celle d'autres méthodes utilisées en écotoxicologie.

**Table 2** Comparison of performances of oxygen sensor with standard growth inhibition tests and short term toxicity assays.

Toxique	Electrode à oxygène		Tests d'inhibition de croissance		Production d'oxygène		Microtox	
	Espèces	CI 50 (mg/l) 30 min 2.5 h 6 h	CI 50 (mg/l)		Espèces	CI 50 (mg/l) 15 min	CI 50 (mg/l) 15 min	
Isoproturon	Chlorella	0,1	-	0,15				
Propanil	Chlorella	0,5		0,09	(1) Feuilles d'épinard	1,7 (4)		
Atrazine	Selenastrum	0,2		0,10	(2) Feuilles d'épinard	0,32 (4)	90	(6)
Cu <sup>2+</sup>	Selenastrum		1,5	(0,010-0,28)	(3) Chlamydomonas	1,2 (5)	0,12*	(6)
Hg <sup>2+</sup>	Chlorella		1,5	(0,010-1)	(1) Chlamydomonas	2,0 (5)	0,05	(7)
CN <sup>-</sup>	Selenastrum	1,0		0,40			4,0	(7)
	Chlorella	> 3,3		0,40				
	Scenedesmus	1,3		0,40				

\* : CI 50 calculée après 5 minutes d'exposition.

(1) STRATTON, 1987.

(2) ROBERT *et al.*, 1990.

(3) VASSEUR *et al.*, 1988.

(4) HYEON *et al.*, 1982.

(5) OVERNELL, 1975.

(6) RETEUNA *et al.*, 1989.

(7) BECKMAN, 1981.

## Herbicides

Les C.I. 50 obtenues avec les bioélectrodes, pour des herbicides appartenant aux groupes des urées substituées et des triazines., (respectivement isoproturon et atrazine) sont très proches de celles déterminées par un test d'inhibition de croissance algale. La détection de ces herbicides est rapide : l'inhibition maximale de réponse étant obtenue après 15 minutes de contact (fig. 4) ce qui représente un gain de temps appréciable par rapport aux tests algues classiques.

Les bioélectrodes sont plus sensibles à l'atrazine que le test Microtox (RETEUNA *et al.*, 1989) ou l'essai d'inhibition de la production d'O<sub>2</sub> par une feuille d'épinard (HYEON *et al.*, 1982) (tableau 2).

Dans le cas du propanil, les bioélectrodes algales sont aussi plus sensibles que le test d'inhibition d'activité photosynthétique développé par HYEON *et al.* (1982). La C.I. 50 obtenue avec le biocapteur est de 0,50 mg/l, cette valeur est plus élevée que celle rapportée par STRATTON (1987) pour des essais de croissance algale.

## Cyanures

Une variation importante de sensibilité aux ions cyanures a été constatée selon l'espèce algale retenue comme biocatalyseur. La production d'oxygène chez *Selenastrum capricornutum* et *Scenedesmus subspicatus* est inhibée de moitié environ par une addition de 1 mg/l alors qu'une concentration de 3,3 mg/l ne perturbe pas l'activité photosynthétique chez *Chlorella vulgaris*.

Les tests algues classiques utilisant d'autres critères de mesure tel que numération cellulaire ou fluorescence indiquent, par contre, que la sensibilité de ces 3 chlorophycées est pratiquement identique après 3 jours (tableau 2) : ce qui laisse à penser que la chaîne photosynthétique ne serait pas le principal système biologique affecté par les cyanures chez *Chlorella vulgaris* contrairement aux autres espèces algales testées. Chez cette algue, les systèmes rédox intervenant dans la respiration cellulaire pourraient être également inhibés. L'absence de consommation d'oxygène par la respiration inhibée par les cyanures, alors que les systèmes photosynthétiques restent fonctionnels, explique à court terme le taux d'oxygène important mesuré à l'électrode, tandis qu'à plus long terme elle entraînerait une diminution de la charge énergétique cellulaire préjudiciable au métabolisme algal.

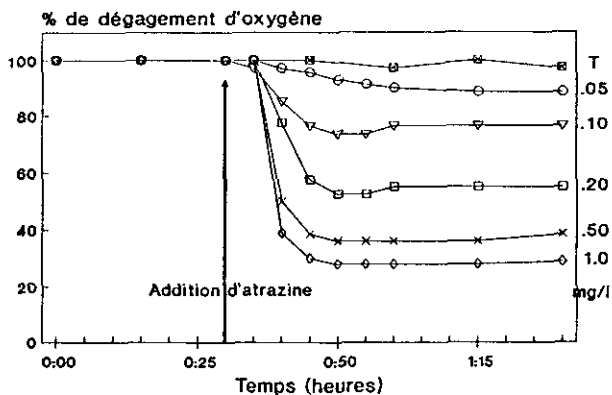


Figure 4 Sensibilité du biocapteur à oxygène vis-à-vis de l'atrazine, comparaison des taux d'oxygène photosynthétique libéré lors de l'ajout d'atrazine à des concentrations comprises entre 0 et 1 mg/l.

*Sensitivity of the oxygen sensor to atrazine. Effects of additions of atrazine (0 to 1 mg/l) on the photosynthetic oxygen evolution.*

## Métaux

Ce capteur permet de déterminer la présence de métaux dans les eaux mais uniquement à des concentrations élevées et après un temps de contact assez long par rapport à des toxiques de type herbicide. Les tests d'inhibition de croissance algale, ainsi que le test Microtox se révèlent beaucoup plus sensibles que les bioélectrodes.

OVERNELL (1975) avait montré que la production d'oxygène consécutive à des stimuli lumineux pouvait être inhibée de moitié chez *Chlamydomonas reinhardtii* en suspension par des concentrations de 2 mg/l en  $Hg^{2+}$  et 1,2 mg/l de  $Cu^{2+}$  après 15 minutes de temps de contact (tableau 2). Ces résultats montrent que le système enzymatique produisant l'oxygène photosynthétique est sensible à ces micropolluants métalliques ; ce qui n'apparaît pas clairement avec les bioélectrodes.

La complexation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$  dans le milieu circulant pourrait expliquer cette détection relativement lente des toxiques métalliques. Ceux-ci formeraient des complexes avec les ions  $\text{Cl}^-$  de l'électrolyte ( $\# 0,15 \text{ M}$ ) ; ces composés ayant une toxicité moins marquée.

Il se peut également qu'au contact des électrodes il se crée un micro-environnement basique. Les ions métalliques formeraient alors préférentiellement des complexes de type hydroxydes caractérisés par une toxicité moindre (RAI *et al.*, 1981).

Le capteur, dans sa structure actuelle, ne permet donc pas la détection de micropolluants métalliques pour la réalisation de systèmes d'alerte pour la prévention des risques de pollution accidentelle.

Les études menées sur la sensibilité de ces bioélectrodes ainsi que la simulation réalisée sur des effluents industriels nous a conduit à apporter des modifications au capteur utilisé dans cette étude. Un second prototype a donc été envisagé pour améliorer cette bioélectrode à oxygène. La nouvelle configuration du biocapteur, élaborée à partir du brevet n° 89 05776 (PANDARD *et al.*, 1989), supprime l'addition de l'électrolyte dans le milieu circulant et donc les phénomènes de complexation des micropolluants métalliques. Le nouveau système est compact et regroupe tous les éléments en une sonde unique (anode, cathode et source lumineuse). Ce dispositif permet de s'affranchir également des perturbations de la mesure d'activité photosynthétique qui pouvaient se produire pour des effluents fortement chargés en matières en suspension susceptibles de faire écran aux flashes lumineux émis par la diode.

Les bioélectrodes algales, dans leur nouvelle configuration, sont en cours de validation.

### 3 - CONCLUSION

De par la spécificité du système photosynthétique utilisé comme indicateur de toxicité, les bioélectrodes algales voient leur champ d'application limité aux polluants agissant sur les organismes autotrophes. Il faudrait pouvoir disposer également de capteurs pour contrôler l'impact des toxiques sur les organismes hétérotrophes, procaryotes ou eucaryotes animaux qui peuplent les systèmes hydriques ; et aussi avoir des systèmes capables d'évaluer non seulement les effets de toxicité aiguë, mais aussi la toxicité à long terme. Le domaine d'applications potentielles des biocapteurs est donc très vaste.

Les biocapteurs, par leur principe même, sont des outils d'avenir au développement prometteur. Il existe un réel besoin de ce type de systèmes dans le contrôle toxicologique et donc un marché énorme pour les biocapteurs en toxicologie environnementale : d'autant que les réglementations européennes se mettent en place en ce qui concerne l'environnement aquatique et en particulier les effluents industriels.



Le développement des biocapteurs nécessite cependant le concours des sociétés d'engineering pour la construction d'appareils nouveaux satisfaisant aux contraintes associées à l'utilisation des biocapteurs ; c'est une technologie différente de celle appliquée au laboratoire et autrement plus performante au plan du biomonitoring que les essais classiques, qui devrait voir le jour et se substituer à cette approche.

Ce type d'innovation demandera des efforts mais l'enjeu en vaut la peine, tant d'un plan environnemental que commercial.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 1980. Détermination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. norme expérimentale T 90-304.
- BECKMAN Microtox technical note M 102, August 1981.
- BENNETO H.P., STIRLING J.L., TANAKA K., VEGA C.A., 1983. Anodic reactions in microbial fuel cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 559-568.
- BULICH A.A. et GREENE M.W., 1979. Use of luminescent bacteria for biological monitoring of water quality. In « *International Symposium on Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence* », Schramm E. et Stanley P. (Eds.), State Printing and Publishing Westlake Village CA, 196-211.
- CALLEGARI J.P., LANNOYE R, 1981. Studies on the factors controlling the toxic action of cadmium on *Chlorella pyrenoidosa*. In *Photosynthesis VI: Photosynthesis and Productivity, Photosynthesis and Environment*. Akoyunoglou G. (Ed.), Balaban International Science Services. Philadelphie, 483-494.
- CEDENO-MALDANO A., SWADER J.A., HEATH R.L., 1972. The cupric ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.*, 50, 698-701.
- DORWARD E. J., BARISAS B.G., 1984. Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. *Environ. Sci. Technol.*, 18 (12), 967-972.
- EPA 600, 1989. Algal *Selenastrum capricornutum* growth test method 1003.0. In *short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms*. 2<sup>e</sup> édition. EPA, 147-187.
- GOODSON et JACOBS, 1974, cités par NEUJAHN, 1984.
- HYEON S.B., NISHIDA M., OHSAKA A., KIM J.M., SUZUKI A., 1982. A simple bioassay for chemicals active to the photosynthetic or respiratory systems of plants. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, 46 (3), 811-812.
- ISO 8692. 1989. Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*.
- KARUBE I., NAKAHARA T., MATSUNAGA T., SUZUKI S.. 1982. Salmonella electrode for screening mutagens. *Anal. Chem.*, 54, 1725-1727.
- KARUBE I., MATSUNAGA T., NAKAHARA T., SUZUKI S., 1981. Preliminary screening of mutagens with a microbial sensor. *Anal. Chem.*, 53, 1024-1026.
- LEVI Y., HENRIET C., LUCAS M., COUTANT J.P., LEGER G., ISENBERG D.L., 1989. Fully automated Microtox : a tool for on-line water acute toxicity monitoring. SETAC 10<sup>th</sup> annual meeting « Transboundary pollution », 28 octobre -2 novembre 1989, Toronto, Canada.
- MACHOLAN et SCHANEL, 1977. cités par NEUJAHN, 1984.

- MIMEAULT M., CARPENTIER R., 1989. Kinetics of photocurrent induction by a thylakoid containing electrochemical cell. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 22,145-158.
- NEUJAHN H.Y., 1984. Biosensors for environmental control. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 1, 167-186.
- OCDE 201, 1984. Algues : essai d'inhibition de croissance.
- OVERNELL J., 1976. Inhibition of marine algal photosynthesis by heavy metals. *Mar. Biol.*, 33, 335-342.
- OVERNELL J., 1975. The effect of some heavy metal ions on photosynthesis in a freshwater alga. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 5, 19-26.
- PANDARD P., 1990. Développement de bioélectrodes algales pour l'évaluation des substances chimiques. Rapport contrat SRETIE 88353.
- PANDARD P., FLAMBEAU J.P., BERTHET M., VASSEUR P., 1989. Sonde permettant la mesure de l'activité photosynthétique d'organismes vivants comprenant une électrode à oxygène et une fibre optique intégrée. Brevet français n° 89 05776.
- RAI L.C., GAUR J.P., KUMAR H.D., 1981. Phycology and heavy metal pollution. *Biol. Rev.*, 36, 99-151.
- RAWSON D.M., WILMER A.J., CARDOSI M.C., 1987. The development of whole cell biosensor for on-line screening of herbicide pollution of surface waters. *Tox. Assess.*, 2, 325-340.
- RETEUNA C., VASSEUR P., CABRIDENC R., 1989. Performances of three bacterial assays in toxicity assessment. *Hydrobiol.*, 188/189, 143-153.
- ROBERT S., VASSEUR P., DIVE D., 1990. Combined effects between atrazine, copper and pH on target and non target species. *Water Res.*, 24 (4), 485-491.
- SMITH I.C., 1985. Enzymatic test will cut costs of pesticide detection. *Bioprocessing Technology*, septembre 1985, 3-4.
- STRATTON G.W., 1987. The effects of pesticides and heavy metals towards phototropic microorganisms. *Reviews in Environmental Toxicology*, 3, 71-147.
- VASSEUR P., PANDARD P., BURNEL D., 1988. Influence of experimental factors on metal toxicity to *Selenastrum capricornutum*. *Tox. Assess.*, 3, 331-343.
- VERSCHUEREN K., 1983. Handbook of environmental data on organic chemicals, Van Nostrand Reinhold Company, New York 2<sup>e</sup> édition pp 1310.
- WOLFBEIS O.S., KOLLER E., 1989. Fiber optic detection of pesticides in drinking water, In *Biosensors Applications in Medicine, Environmental Protection and Process Control*. Schmid R.D. et Scheller F. (Eds), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 221-225.