

LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES

Essai d'inhibition des protozoaires des boues activées

INTRODUCTION

1. La présente Ligne directrice décrit une méthode d'évaluation des effets d'un produit chimique sur l'activité phagocytaire des boues activées (phagocytose des bactéries dispersées) dans des conditions définies en présence de différentes concentrations du produit chimique testé.

2. Le principe des stations de traitement biologique des eaux usées consiste à transformer la matière organique des eaux entrant dans la station en biomasse microbienne, qui est ensuite séparée du liquide pour donner un effluent épuré. Le but de ce processus est de parvenir à une réduction maximale de la charge organique et à une diminution des nutriments tels que l'ammoniaque, les nitrates et les phosphates tout en produisant un minimum de boues biologiques. L'activité phagocytaire des organismes présents dans les boues activées contribue à ce processus. Dans les stations conventionnelles, les organismes ciliés jouent généralement un rôle prédominant dans cette activité. C'est particulièrement le fait qu'ils se nourrissent de bactéries qui assure la clarification des eaux usées et, par conséquent, la transparence, c'est-à-dire la faible charge organique des eaux de sortie.

3. Cet essai doit permettre d'établir les effets des produits chimiques testés sur les organismes consommateurs de bactéries, dans les stations de traitement des eaux usées, à savoir principalement les protozoaires ciliés, dont le mode d'alimentation joue un rôle considérable dans l'épuration des eaux.

4. L'essai est particulièrement aisé à appliquer aux produits chimiques solubles dans l'eau qui, dans les conditions de l'essai, restent habituellement dans l'eau. Dans certains cas, il peut être nécessaire de recourir à un solvant pour produire une solution mère à la concentration adéquate (voir le paragraphe 22).

5. La présente proposition de ligne directrice est basée sur une étude inter-laboratoires internationale commandée par l'Agence allemande de l'environnement, conduite en 2011-2013 (1). L'essai a été validé dans 5 laboratoires sur 5 substances organiques mono-constituants ayant pour mode d'action présumé un effet narcotique non polaire ou polaire. Les substances d'essai dans l'étude de validation avaient un log K_{ow} de 1.36 à 6.91. Les essais ont porté sur les substances suivantes : 1-octylamine (CAS-no. 111-86-4), 3,5-dichlorophénol (CAS-no. 591-35-5), diméthylsulfoxyde (CAS-no. 67-68-5), phényléther (CAS-no. 101-84-8) et hexachlorophène (CAS-no. 70-30-4).

6. Avant d'appliquer la présente Ligne directrice à un mélange en vue de générer des données à des fins réglementaires, il convient d'examiner si et, dans l'affirmative, pourquoi cet essai peut fournir des résultats appropriés à cet effet. Ces questions ne se posent pas si l'essai du mélange est prescrit par la réglementation.

PRINCIPE DE L'ESSAI

7. L'échantillon de boue activée est exposé au produit chimique testé dans de petits flacons de verre, pour un volume de culture de 2 ml. Les flacons sont fermés par des bouchons perméables à l'oxygène, et agités pendant 22 heures à 22 °C (± 1 °C). Au début de l'essai, les échantillons de boue sont nourris de bactéries en suspension. Alors que la turbidité décroît dans les échantillons témoins, les bactéries ne sont pas éliminées dans les échantillons chimiquement inhibés. Afin de quantifier l'activité phagocytaire, on suit le déclin dans le temps des bactéries introduites dans les flacons en procédant à deux reprises à des mesures photométriques ($\lambda = 440$ nm), après 2 h (t1) et après 22 h (t2) d'incubation. À partir de la différence entre ces deux valeurs, le pourcentage de réduction de l'activité est calculé en relation avec un témoin non traité. Une relation linéaire entre le temps et la densité optique a été démontrée (8). L'essai est généralement utilisé pour déterminer les CE_x (CE_{50} , par exemple) du produit chimique testé. Pour permettre la prise en compte des réactions non spécifiques du substrat bactérien introduit dans les flacons avec les floccs des boues (phénomènes de liaison, par exemple) ou des effets des produits chimiques sur la turbidité de l'échantillon de boue (par désagrégation, par exemple), des échantillons parallèles défaunés (et donc exempts de phagocytose) sont inclus dans l'essai, pour les témoins et pour chaque concentration.

INFORMATIONS SUR LE PRODUIT CHIMIQUE TESTÉ

8. Il est nécessaire de connaître la solubilité dans l'eau du produit chimique testé dans les conditions de l'essai. Il faut en outre disposer d'une méthode analytique fiable de quantification du produit chimique testé dans les solutions d'essai.

9. Les informations utiles sont notamment les suivantes : formule structurelle, degré de pureté, solubilité dans l'eau (2), coefficient de partage n-octanol/eau (3), pression de vapeur (4) et biodégradabilité (5). La solubilité et la pression de vapeur peuvent être utilisées pour calculer la constante de Henry, qui indiquera si des pertes du produit chimique testé peuvent survenir.

VALIDITÉ DE L'ESSAI

10. Pour qu'un essai soit valide, les conditions suivantes doivent être remplies :

- la baisse de la densité optique (DO) des témoins du fait de l'activité phagocytaire doit excéder 30 % pendant la période d'essai entre 2 h et 22 h (voir le paragraphe 42).
- la baisse non spécifique de la DO (témoins défaunés contenant le substrat bactérien) ne doit pas excéder 25 % pendant la période d'essai (voir le paragraphe 43).
- les concentrations de produit chimique testé auxquelles survient une augmentation moyenne de la DO de plus de 5 % dans les échantillons parallèles défaunés doivent être exclues du calcul des effets (cf. paragraphe 44).

SUBSTANCE DE RÉFÉRENCE

11. Un essai sur une substance de référence permet de détecter si les conditions d'essai ne sont pas satisfaisantes. Dans une étude inter-laboratoires conduite en 2011, la CE_{50} du 3,5-dichlorophénol se situait entre 1.5 mg/l et 5.1 mg/l pour l'inhibition de la phagocytose dans les boues activées. Les valeurs de la CE_{50} pouvant varier considérablement selon les boues utilisées pour l'essai, cette gamme de valeurs de la CE_{50} n'est indiquée qu'à titre de référence et ne conditionne pas nécessairement la validité de l'essai. Les résultats obtenus avec la substance de référence doivent être indiqués dans le rapport d'essai.

APPLICABILITÉ DE L'ESSAI

12. La méthode d'essai peut être appliquée aux produits chimiques solubles dans l'eau, peu solubles ou volatils. Cependant, il ne sera peut-être pas toujours possible d'obtenir des valeurs de la CE_{50} avec des produits chimiques de solubilité limitée et – bien que la procédure décrite utilise des récipients d'essai fermés – des résultats valides avec des produits chimiques volatils ne peuvent être obtenus qu'à condition que la plus grande part (> 80 %) du produit chimique testé reste dans le mélange de réaction à la fin de la période d'exposition (voir le document d'orientation de l'OCDE sur les substances difficiles(6)). Pour les produits chimiques peu solubles, un solvant pourra être utilisé en dernier ressort (voir le paragraphe 22). Des données analytiques complémentaires seront fournies, à l'appui des résultats, afin d'affiner la concentration CE_x en cas d'incertitude sur la stabilité du produit chimique testé ou sa volatilité.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Appareillage

13. On utilisera l'équipement de laboratoire classique, et particulièrement le matériel suivant :

- des flacons de verre à bouchons perméables à l'oxygène,
sont recommandés :
- des flacons de verre clair pour bouchons vissés, de 45 x 15 mm (dimensions externes), d'un volume total de 4 ml.
- des bouchons ouverts (bouchons ouverts à visser) avec septum en silicone face téflon.
- un agitateur rotatif (vitesse réglable jusqu'à 250 rpm (4.17 Hz)) avec des portoirs permettant d'incliner les flacons de 20-40 ° par rapport à l'horizontale.
- un photomètre (filtre de $\lambda = 440$ nm) adapté pour les flacons ci-dessus.
- une armoire ou une enceinte permettant le maintien à une température de 22 °C (± 1 °C).

Inoculum

14. De la boue activée prélevée en sortie de l'étape d'aération d'une installation d'épuration bien gérée traitant principalement des boues domestiques est utilisée comme inoculum pour l'essai de phagocytose. Éviter la mousse de surface lors du prélèvement de la boue activée. Ne pas prélever l'échantillon dans des angles morts où s'est accumulée la mousse. Lors du prélèvement, immerger complètement l'outil de prélèvement sous la surface de l'eau. Si des flottants apparaissent pendant l'essai, il peut suffire d'incliner légèrement les flacons de verre ou de remuer manuellement avec une baguette en verre pour faire passer au fond la couche de surface.

15. Pour réaliser le test, il faut connaître la masse sèche de la boue. Des concentrations de solides en suspension de 2 g/l à 4 g/l peuvent être considérées comme appropriées. Dans la plupart des cas, les installations de traitement des eaux réalisent en continu des mesures de routine de la concentration de boue. Si des données réelles ne sont pas disponibles, la masse sèche devra être déterminée. La boue est séchée à 60°C pour atteindre un poids constant. Le poids sec doit être exprimé à une précision d'au moins 0.1mg. Dans l'alternative, des méthodes standardisées pour le calcul de la fraction de matière sèche après détermination du résidu sec ou du contenu en eau peuvent être utilisées, par exemple le standard DIN EN 15934, 2540 D ou des méthodes équivalentes. À partir de ce résultat, le volume de la suspension de boue activée native peut être calculé. La suspension dans les essais sur 2 ml doit être réalisée de façon à obtenir une boue activée dont la concentration de solides en suspension dans la liqueur mixte soit de 0.9 ± 0.1 g/litre.

16. La boue activée doit être utilisée le jour où elle est collectée. En cas d'impossibilité, tout le lot de boue native – non diluée – sera conservé au réfrigérateur à 4-7 °C pendant une semaine au maximum.

Substrat

17. Des bactéries ayant une faible tendance à s'agréger, à flocculer ou à adhérer aux floccs des boues activées peuvent être utilisées comme substrat. Des bactéries qui satisfont à ces exigences et dont il a été établi qu'elles constituaient une source de nourriture adaptée pour les organismes phagotrophes présents dans les boues sont indiquées à l'Annexe I. Toutefois, il est noté que toute autre souche bactérienne satisfaisant aux critères de validité peut être utilisée.

18. Sur la base des résultats de l'essai inter-laboratoires, une concentration finale de bactéries destinées à nourrir la boue égale à 0.36 g/l (masse sèche) peut être recommandée. Cette concentration assure des apports adéquats, et des mesures fiables de la DO (voir le chapitre 4.2 du compte rendu de l'essai interlaboratoires (1)).

Milieu d'essai

19. Pour diluer la boue activée et préparer les séries de dilutions du produit chimique, il est recommandé d'utiliser de l'eau synthétique EPA (l'Annexe II donne la composition précise du milieu d'essai recommandé).

20. Il peut être nécessaire de modifier le milieu d'essai à des fins particulières, par exemple pour réaliser des essais à différents pH. L'utilisation de milieux modifiés fera l'objet d'une description détaillée et d'une justification.

Témoins exempts de phagocytose

21. Une partie du substrat bactérien peut former des agrégats ou adhérer aux floccs de la boue, ce qui peut modifier la turbidité de la suspension surnageante. De plus, les produits chimiques testés – en particulier à concentration élevée – peuvent avoir un impact sur la structure du flocc des boues activées, se traduisant par une turbidité accrue. Des témoins sans activité phagocytaire sont donc nécessaires pour rendre compte des changements de turbidité dus à des réactions passives, non spécifiques, au sein du système d'essai. Un inhibiteur des eucaryotes, la digitonine (CAS no. 11024-24-1), s'est révélé utile comme inhibiteur spécifique de la phagocytose, permettant de défauner entièrement des échantillons de boue activée (7). Afin d'obtenir des données en l'absence de phagocytose, des échantillons parallèles contenant de la digitonine à une concentration finale de 200 mg/l (voir l'Annexe III – Préparation de la solution de digitonine) sont inclus dans l'essai, pour les témoins et pour toutes les concentrations du produit chimique.

Produit chimique testé

22. Des séries de solutions d'essai pré-diluées fraîches sont préparées au début de l'étude par dilution d'une solution mère dans le milieu d'essai. Dans le cas de produits chimiques peu solubles dans l'eau, la dispersion aux ultrasons ou d'autres méthodes physiques adaptées sont privilégiées pour dissoudre le produit chimique testé. Dans certains cas, l'usage de solvants peut être requis pour produire une solution mère à la concentration adéquate. Peuvent être utilisés pour dissoudre les produits chimiques peu solubles dans l'eau des solvants tels que l'acétone, l'alcool éthylique ou le diméthylsulfoxyde. En raison de sa faible toxicité, l'usage du diméthylsulfoxyde peut être préféré, à la concentration la plus faible possible, soit au maximum 0.1 ml/l, suivi d'une phase d'évaporation avant l'adjonction à la boue. Si un solvant est utilisé, un témoin solvant doit être inclus dans l'essai. Cependant, on évitera autant que possible de recourir à ce type de produits, et si des solvants organiques sont utilisés, ils ne doivent pas inhiber de façon significative l'activité phagocytaire.

23. L'essai est réalisé sans ajustement du pH. Si une modification marquée du pH est attendue, le pH de la solution mère sera ajusté à 7 ± 1 (HCl et NaOH peuvent être utilisés pour cet ajustement s'il y a lieu). L'ajustement du pH doit être pratiqué d'une façon qui ne modifie pas significativement la concentration de la solution mère et ne provoque pas de réaction chimique ou de précipitation du produit chimique testé.

Conditions d'exposition

24. Durée : 22 heures sous agitation continue.

Récipients : flacons en verre avec bouchons vissés perméables à l'oxygène.

Éclairage : l'essai est réalisé dans l'obscurité.

Température : 22 ± 1 °C.

Apport d'oxygène : un apport suffisant d'oxygène doit être maintenu pendant toute la durée de l'essai par agitation rapide des flacons à 250 rpm (4.17 Hz). Dans la procédure recommandée, le volume de culture ne doit pas excéder 2 ml dans des flacons de 4 ml fermés par des bouchons perméables à l'oxygène et inclinés à 40 ° par rapport à l'horizontale.

Réplicats et témoins

25. La conception de l'essai doit inclure trois réplicats à chaque concentration d'essai et six témoins. Six témoins avec solvant seront en outre nécessaires si un solvant est utilisé.

26. Pour chaque essai, un essai parallèle sans phagocytose doit être mené avec le même nombre d'échantillons (triplicats pour chaque concentration d'essai et 6 témoins) contenant de la digitonine comme inhibiteur spécifique¹ (concentration finale 200 mg/l).

27. Une série spécifique de solutions d'essai (un réplicat par concentration) doit être préparée pour les déterminations analytiques des concentrations de produit chimique testé (voir les paragraphes 32-34), s'il y a lieu.

28. Au moins cinq concentrations sont testées simultanément, formant si possible une suite géométrique (avec par exemple un facteur multiplicatif n'excédant pas 2.0). La concentration la plus faible doit être sans effet observé sur la croissance. La concentration la plus élevée doit être d'au moins 100 mg/l ; elle doit inhiber la croissance de 50 % au moins par rapport au témoin et, de préférence, arrêter complètement la croissance. Pour des raisons statistiques, toutefois, il est souhaitable de choisir les concentrations de telle sorte qu'elles encadrent le niveau efficace à 50 %.

Mesures

29. La durée de l'essai est de 22 heures. Après agitation énergique des flacons et décantation de la boue pendant 30 min, la densité optique du surnageant est mesurée par spectrophotométrie (440 nm) à l'issue de 2 h (t1) et 22 h (t2) d'incubation. Dans la mesure où, en conditions expérimentales, la densité optique est directement proportionnelle à la teneur en bactéries, l'absorbance permet une estimation rapide et non invasive de l'activité phagocytaire intervenue dans les échantillons de boue.

Détermination de la gamme de concentrations

30. Si l'on ne dispose pas de données sur la toxicité du produit chimique testé pour les bactéries, une étude est réalisée pour établir les concentrations couvrant la plage de tolérance 0-100 % de l'activité phagocytaire vis-à-vis du toxique. Elle inclura au moins 5 étapes de dilution avec un facteur de dilution de 10 à partir d'une concentration de 1000 mg/l ou à partir de la solubilité maximale du produit chimique testé. Il est préférable de conduire les essais à des niveaux inférieurs à la solubilité dans l'eau, mais les parties non solubles d'un produit chimique testé peuvent aussi contribuer à l'inhibition.

Essai limite

31. Dans certains cas, par exemple lorsqu'un test préliminaire montre que le produit chimique testé est non toxique jusqu'à une concentration de 100 mg/l ou jusqu'à sa limite de solubilité dans l'essai (selon la plus faible de ces deux valeurs), un essai limite comprenant une comparaison des réponses dans un groupe témoin et un groupe traité (à 100 mg/l ou à une concentration égale à la limite de solubilité) peut être effectué. Cette démarche devra être confortée par une analyse de la concentration d'exposition. Toutes les conditions d'essai et les critères de validité décrits dans ce qui précède s'appliquent à un essai limite, à l'exception du nombre de réplicats dans les groupes traités, qui doit être doublé. La croissance dans le

¹ La digitonine est un détergent qui rend sélectivement perméable la membrane plasmique des eucaryotes, mais pas les cellules bactériennes (Mooney, 1988). L'addition de digitonine fournit d'une part un témoin présentant une inhibition totale de l'activité phagocytaire et permet d'autre part la mesure de toute réaction passive de la suspension bactérienne, c'est-à-dire du substrat nutritif introduit dans les flacons.

groupe témoin et le groupe traité peut être analysée à l'aide d'un test statistique permettant de comparer les moyennes, par exemple le test t de Student.

Déterminations analytiques

32. Dans certains cas, il peut être nécessaire de déterminer la concentration du produit chimique testé dans les flacons (par exemple pour les produits très volatils ou fortement adsorbants). Il peut être suffisant de procéder à des analyses au début et à la fin de l'essai à une concentration faible, une concentration élevée et une concentration proche de la valeur attendue de la CE_{50} lorsqu'il est probable que les concentrations d'exposition s'écarteront de moins de 20 % des valeurs nominales au cours de l'essai. Une analyse de toutes les concentrations d'essai en début et en fin d'essai est recommandée lorsqu'il est probable que les concentrations ne resteront pas entre 80 et 120 % des valeurs nominales (par exemple pour les produits chimiques volatils ou fortement adsorbants). Dans tous les cas, il n'est nécessaire de déterminer les concentrations du produit chimique testé que sur un réplicat par concentration d'essai (ou sur les contenus des flacons d'une concentration regroupés par réplicat).

33. Les échantillons préparés spécifiquement pour l'analyse des concentrations d'exposition sont traités de la même manière que ceux utilisés pour les essais, à savoir par inoculum de boue activée, apport de nourriture et incubation dans des conditions identiques. Si une analyse de la concentration du produit chimique dissous est requise, il peut être nécessaire de séparer les constituants solides de la phase aqueuse. La séparation se fera de préférence par centrifugation, suffisante pour décanter la boue activée et le substrat bactérien nutritif en suspension.

34. S'il est établi que la concentration du produit chimique d'essai a été maintenue de façon satisfaisante pendant toute la durée de l'essai dans les limites de $\pm 20\%$ de la concentration initiale nominale ou mesurée, l'analyse des résultats peut être basée sur la concentration initiale nominale ou mesurée. Si l'écart par rapport à la concentration initiale nominale ou mesurée excède $\pm 20\%$, l'analyse des résultats sera fondée sur la moyenne des concentrations moyennes mesurées pendant l'exposition.

Autres observations

35. Des observations au microscope peuvent être réalisées pour vérifier l'apparence normale et saine de la boue activée utilisée comme inoculum et détecter toute anomalie dans l'apparence des organismes phagocytant les bactéries, en particulier des protozoaires.

RÉSULTATS ET RAPPORT

Variables étudiées

36. L'objet de l'essai est de déterminer les effets du produit chimique testé sur l'activité phagocytaire de la boue activée.

Traitement des résultats

37. La quantité de nourriture bactérienne en suspension dans les récipients d'essai est exprimée en unités du paramètre représentatif utilisé pour la mesure, à savoir la densité optique (DO_{440}).

38. Les densités optiques mesurées dans les cultures et chez les témoins sont présentées sous forme de tableau indiquant les concentrations de produit chimique et les moments où sont effectuées les mesures.

39. L'activité phagocytaire est calculée sur la base de la différence entre la densité optique initiale après 2 h d'incubation et la densité optique après 22 h d'incubation.

$$\text{soit : } \Delta DO = dDO = DO_{2h} - DO_{22h},$$

différence de densité optique entre 2 h et 22 h
(témoins et traitements sans digitonine)

40. Pour corriger ces valeurs en raison des modifications non spécifiques de la densité optique (dues par exemple à des phénomènes de liaison, à la formation de complexes avec la nourriture bactérienne ou à la lyse de celle-ci, ou encore aux effets défloculants du produit chimique testé), des échantillons parallèles défaunés par traitement à la digitonine, sans activité phagocytaire, sont inclus dans la conception de l'étude. Les modifications de leur densité optique entre 2 h et 22 h ($\Delta DO_{\text{déf}}$) sont déduites des valeurs de ΔDO :

$$\text{soit : } \Delta DO_{\text{déf}} = DO_{\text{déf } 2h} - DO_{\text{déf } 22h}$$

différence de densité optique entre 2 h et 22 h
dans les échantillons parallèles défaunés (traités avec 200 mg/ml
de digitonine, un inhibiteur spécifique des eucaryotes).

41. Pour tenir compte des modifications non spécifiques de la densité optique, la différence de DO moyenne corrigée est calculée comme suit pour tous les réplicats des groupes témoins et des groupes traités :

$$\Delta DO_{\text{corr}} = \Delta DO - \text{moyenne } \Delta DO_{\text{déf}}$$

où :

ΔDO : valeur ΔDO d'un seul échantillon sans digitonine (6 témoins et 3 échantillons par concentration de produit chimique)

moyenne $\Delta DO_{\text{déf}}$: valeur ΔDO moyenne du groupe témoin (défauné), exempt de phagocytose, contenant de la digitonine (n = 6) et du groupe traité correspondant contenant de la digitonine (n = 3)

Résultats de l'essai

42. Le pourcentage de baisse de la DO chez les témoins (important pour la validité, voir le paragraphe 10) est calculé comme suit :

$$\% \Delta DO(\text{témoin}) = \frac{\text{moyenne } \Delta DO_{\text{corr}}(\text{témoins})}{\text{moyenne } DO_{2h}(\text{témoins})} \times 100$$

où :

moyenne ΔDO_{corr} (témoins) : moyenne ΔDO (témoins) – moyenne $\Delta DO_{\text{déf}}$ (témoins) ; n=6 ;

moyenne DO_{2h} (témoins) : moyenne des DO_{2h} (DO initiales à $t_1=2h$) pour tous les réplicats témoins (n=6).

43. Le pourcentage de baisse « non spécifique » de la DO pour les témoins exempts de phagocytose, contenant de la digitonine (important pour la validité, voir le paragraphe 9), est calculé comme suit :

$$\% \Delta DO_{\text{déf}}(\text{témoins}) = \frac{\text{moyenne } \Delta DO \text{ déf}(\text{témoins})}{\text{moyenne } DO_{\text{déf}} \text{ 2h}(\text{témoins})} \times 100$$

où :

moyenne $\Delta DO_{\text{déf}}(\text{témoins})$: moyenne de la différence de DO entre 2h et 22 h pour les réplicats des témoins à la digitonine (n=6);

moyenne $DO_{\text{déf}} \text{ 2h}(\text{témoins})$: moyenne de la DO 2h (DO initiale à t1=2h) pour les réplicats des témoins à la digitonine (n=6).

44. Les effets du produit chimique testé sur la densité optique (important pour la validité, voir le paragraphe 9) sont calculés comme suit :

$$\% \Delta DO_{\text{déf}}(\text{traitement}) = \frac{\text{moyenne } \Delta DO \text{ déf}(\text{traitement})}{\text{moyenne } DO \text{ déf} \text{ 2h}(\text{traitement})} \times 100$$

où :

moyenne $\Delta DO_{\text{déf}}(\text{traitement})$: moyenne de la différence de DO entre 2h et 22h pour les réplicats d'un groupe traité (n=3) contenant de la digitonine ;

moyenne $DO_{\text{déf}} \text{ 2h}(\text{traitement})$: moyenne de la DO 2h (DO initiale à t1=2h) pour les réplicats d'un groupe traité (3 réplicats par groupe) contenant de la digitonine.

Réduction de la phagocytose

45. L'inhibition de l'activité phagocytaire pour chaque réplicat à chaque concentration du produit chimique testé est exprimée en pourcentage de la moyenne des activités phagocytaires des témoins :

$$\% \text{Inhibition}_x = 1 - \frac{\Delta DO_{\text{corr}}(\text{réplicat } x \text{ d'un groupe traité})}{\text{moyenne } \Delta DO \text{ corr}(\text{témoins})} \times 100$$

où :

$\Delta DO_{\text{corr}}(\text{réplicat}_x \text{ d'un groupe traité})$: différence corrigée entre la DO après 2h et après 22h pour le réplicat (flacon) considéré dans le groupe traité à une concentration du produit chimique testé, soit $\Delta DO_{\text{corr}}(\text{réplicat}_x \text{ du groupe traité}) = \Delta DO(\text{réplicat}_x \text{ du groupe traité}) - \text{moyenne } \Delta DO_{\text{déf}}(\text{réplicats}_{1-3} \text{ du groupe traité correspondant contenant de la digitonine})$;

moyenne $\Delta DO_{\text{corr}}(\text{témoins})$: moyenne des différences de DO corrigées entre les témoins et les témoins contenant de la digitonine, soit moyenne de $\Delta DO(\text{témoins}) - \text{moyenne } \Delta DO_{\text{déf}}(\text{témoins})$.

Lorsque des solvants sont utilisés pour préparer les solutions d'essai, des témoins solvant seront utilisés de préférence à des témoins sans solvant pour le calcul du pourcentage d'inhibition.

Tracé des courbes concentration-réponse

46. Sur un graphique, reporter pour chaque flacon (réplicat) le pourcentage d'inhibition en regard du logarithme de la concentration du produit chimique testé (n=3 pour chaque concentration), voir l'Annexe IV, Courbes concentration-réponse.

47. Inclure les modifications non spécifiques de la DO dans les échantillons parallèles défaunés pour chaque répliquat (n=3 pour chaque concentration), en appliquant :

$$\% \Delta DO_{\text{déf}}(\text{répliquat}_x) = \frac{\Delta DO_{\text{déf}}(\text{répliquat } x)}{\text{moyenne DO déf 2h (traitement)}} \times 100;$$

voir aussi la courbe d'inhibition, figure 1 de l'Annexe IV.

Évaluation des valeurs CE

48. Les valeurs CE_x sont calculées par des méthodes statistiques. Toutes les valeurs sont normalisées par division des données par les données correspondantes pour les témoins (moyenne de tous les répliquats témoins). Les courbes concentration-réponse sont ajustées par des méthodes de régression non linéaire aux concentrations (traitées par transformation logarithmique). On calculera de préférence les CE_{50} , en utilisant des fonctions sigmoïdes à trois et quatre paramètres (symétriques et asymétriques). Chaque répliquat est traité comme un point séparé. Les plateaux haut et bas sont fixés à 0 % et 100 %, respectivement (certains produits chimiques testés peuvent stimuler la croissance à de faibles concentrations, réponses désignées par le terme d'hormèse. Seuls seront pris en compte les points indiquant des effets entre 0 et 100 %). Pour les valeurs de CE, l'intervalle de confiance à 95 % sera indiqué.

49. Lorsque les données obtenues ne se prêtent pas aux méthodes standards d'ajustement des courbes pour le calcul de la CE_{50} , la concentration la plus élevée sans effet et la concentration la plus faible produisant 100 % d'inhibition seront utilisées pour l'approximation de la CE_{50} (considérée comme la moyenne géométrique de ces deux concentrations).

Rapport d'essai

50. Le rapport d'essai contient les informations suivantes :

Produit chimique testé

- Substance mono-constituant : apparence physique, solubilité dans l'eau et autres propriétés physicochimiques pertinentes ; identification chimique telle que désignation IUPAC ou CAS, numéro CAS, code SMILES ou InChI, formule structurale, pureté, identité chimique des impuretés s'il y a lieu et si cela est faisable en pratique, etc. (y compris la teneur en carbone organique s'il y a lieu).
- Substance multi-constituants, UVCB (substances de composition inconnue ou variable, produits de réaction complexes ou matériels biologiques) et mélanges : caractérisés dans la mesure du possible par l'identité chimique (voir ci-dessus), la teneur et les propriétés physicochimiques pertinentes des constituants.

Boue activée

- origine, conditions de fonctionnement et eaux traitées par la station d'épuration, masse sèche, date d'échantillonnage, conditions de stockage (s'il y a lieu), prétraitement éventuel, etc.

Conditions d'essai :

- date de début et de fin de l'essai
- concentration de la boue activée (solides en suspension dans la liqueur mixte)
- température
- souche bactérienne (méthode de culture, source/origine)
- récipients et appareillage d'essai

- véhicule et méthode utilisée pour solubiliser le produit chimique testé, et concentration du véhicule dans les solutions d'essai
- concentrations testées (mesurées ou nominales)
- informations sur les concentrations de produit chimique testé dans les solutions d'essai, méthode analytique

Résultats :

- densités optiques pour chaque récipient à chaque point de mesure
- valeurs moyennes des réplicats
- représentation graphique des relations concentration-réponse
- valeurs de la CE_{50} avec intervalle de confiance à 95 % et méthode de calcul
- autres effets observés, incidents pouvant avoir influé sur les résultats

LITERATURE

- (1) OECD (2017). Ring-Test to Validate the Protozoa Activated Sludge Inhibition Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 266. OECD, Paris.
- (2) OECD (1995). Guideline for the Testing of Chemicals, No. 105: water solubility. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (3) OECD (1995). Guideline for the Testing of Chemicals, No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (4) OECD (2006). Guideline for the Testing of Chemicals, No. 104: vapour pressure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (5) OECD (1992). Guideline for the Testing of Chemicals, No. 301: Ready Biodegradability. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- (6) OECD (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 23. OECD, Paris.
- (7) Mooney, R. A., 1988. Use of digitonin-permeabilized adipocytes for cAMP studies. *Methods Enzymol.*, pp. 193-202.
- (8) Wilfried Pauli, Viktoria Poka (2005). Development and standardization of a test system to assess chemical effects on key functions of the protozoan biocenosis in activated sludge of municipal wastewater treatment plants. Environmental Research Plan of the Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety - Environmental chemicals / toxic effects. Report 201 67 402.

ANNEXE I - SUBSTRAT

Substrat

Il a été établi que les cellules lyophilisées disponibles dans le commerce des souches de *E. coli* ATCC 9637, ATCC 8739 et K12 (Sigma-Aldrich) répondaient aux exigences énoncées pour le substrat, à savoir une faible tendance à s'agréger, à flocculer et à adhérer aux floccs des boues activées. Elles constituent en outre une source de nourriture adéquate pour les organismes phagotrophes présents dans les boues.

De plus, il a été démontré pour les deux souches ATCC qu'un substrat approprié peut aussi être produit par culture et lyophilisation subséquente des cellules : une pointe de spatule de poudre de *E. coli* a été additionnée de 2 ml de milieu TB (Terrific broth) dans un tube en verre de 12 ml à bouchon métallique ; le tube a été agité pendant une nuit dans un incubateur à 37 °C, à la vitesse de 200 rpm (3.3 Hz). Des aliquots de 100 µl ont été mélangés à de la glycérine (concentration finale 15 %) et conservés à -80 °C. 5 µl de cette culture mère de *E. coli* ont été utilisés comme inoculum dans des flacons Erlenmeyer de 200 ou 500 ml contenant 50 ou 100 ml de TB respectivement. Les cultures étaient incubées à 37 °C et aérées par agitation continue (200 rpm (3.3 Hz)). Après 16-18 h, les cellules en phase stationnaire précoce étaient centrifugées (10⁴xg), lavées au NaCl à 0.9 % (w/v) et lyophilisées, c'est-à-dire que la masse cellulaire était congelée à -80 °C et le liquide résiduel vaporisé sous vide dans un lyophilisateur (Alpha 1-4 LD, Martin Christ). Il faut toutefois noter que toutes les préparations ne donnaient pas des résultats satisfaisants² ; il convient donc de vérifier pour chaque préparation que le substrat bactérien se lie faiblement aux floccs des boues dans les conditions de l'essai.

L'utilisation d'autres souches bactériennes et d'autres méthodes de préparation est naturellement possible, si elles satisfont aux critères de validité.

² On sait que les conditions environnementales et la biodisponibilité des nutriments peuvent modifier considérablement l'adhésivité des cellules bactériennes (voir par exemple Faille et al., 2002 ; Bonaventura et al., 2008), et que les propriétés hydrophobes des souches bactériennes peuvent varier considérablement au cours de leur croissance (voir par exemple Jorand et al., 1994).

ANNEXE II – MILIEU D’ESSAI

Milieu d’essai : eau synthétique EPA de dureté modérée (EPA, 2002), tamponnée

I. Préparation des solutions mères de produit chimique

1) préparer 100 ml d’une solution mère concentrée 40 fois pour chacun des réactifs 1-5 :

réactif	conc. finale lors de l’essai	facteur de conc.	réactif pour 100 ml
(1) NaHCO ₃	96 mg/l	40x	384 mg 100 ml H ₂ O
(2) CaSO ₄ •2H ₂ O	60 mg/l	40x	240 mg 100 ml H ₂ O
(3) MgSO ₄	60 mg/l	40x	240 mg 100 ml H ₂ O
(4) KCl	4 mg/l	40x	16 mg 100 ml H ₂ O
(5) Hepes, pH 7.5	10 mM	40x	9.532 g ajust. pH → 100 ml H ₂ O

2) ajuster le pH de la solution tampon HEPES à 7.5 (NaOH)

a) dissoudre 9.532 g de réactif HEPES dans environ 90 ml d’H₂O

b) ajuster le pH à 7.5 avec une solution de NaOH concentrée (environ 2.8 ml d’une solution de NaOH 5 M (200g/l))

c) compléter à 100 ml avec de l’eau désionisée (ou distillée)

3) conserver le milieu d’essai à -20 °C (pour des raisons pratiques, un aliquotage préalable est recommandé)

II. Préparation de l’eau synthétique EPA standard de dureté modérée, tamponnée

1) Verser dans un flacon jaugé de 200 millilitres environ 160 ml d’eau désionisée (ou distillée)

2) Ajouter 5 ml de chacune des solutions mères concentrées, en suivant l’ordre de 1 à 5

3) Ajouter de l’eau désionisée (ou distillée) jusqu’à la marque de 200 ml et agiter pour homogénéiser le milieu

→ conserver le milieu d’essai (dilué) à 4-6 °C pendant 2 semaines maximum.

ANNEXE III- PRÉPARATION DE LA SOLUTION DE DIGITONINE

La *digitonine* (Numéro CAS 11024-24-1) tend à former des précipités, en solution, mais se dissout bien dans l'eau bouillante. Une fois refroidie, la solution reste limpide pendant plusieurs heures.

Ajouter 100 mg de digitonine à 10 ml d'H₂O (= 10 g/l = solution concentrée 50 fois), chauffer la solution à 95-100 °C pendant 5 minutes et mélanger doucement au vortex pour dissoudre le précipité. Laisser refroidir à température ambiante avant usage (*Note* : la digitonine en poudre du commerce est un mélange d'environ cinq glycosides (Fukunaga et al., 1988). L'un des principaux composants est la digitonine, qui représente près de 50 % de la préparation (TLC) de Sigma-Aldrich utilisée dans l'étude interlaboratoires).

ANNEXE IV – COURBES CONCENTRATION-RÉPONSE

Courbes concentration-réponse

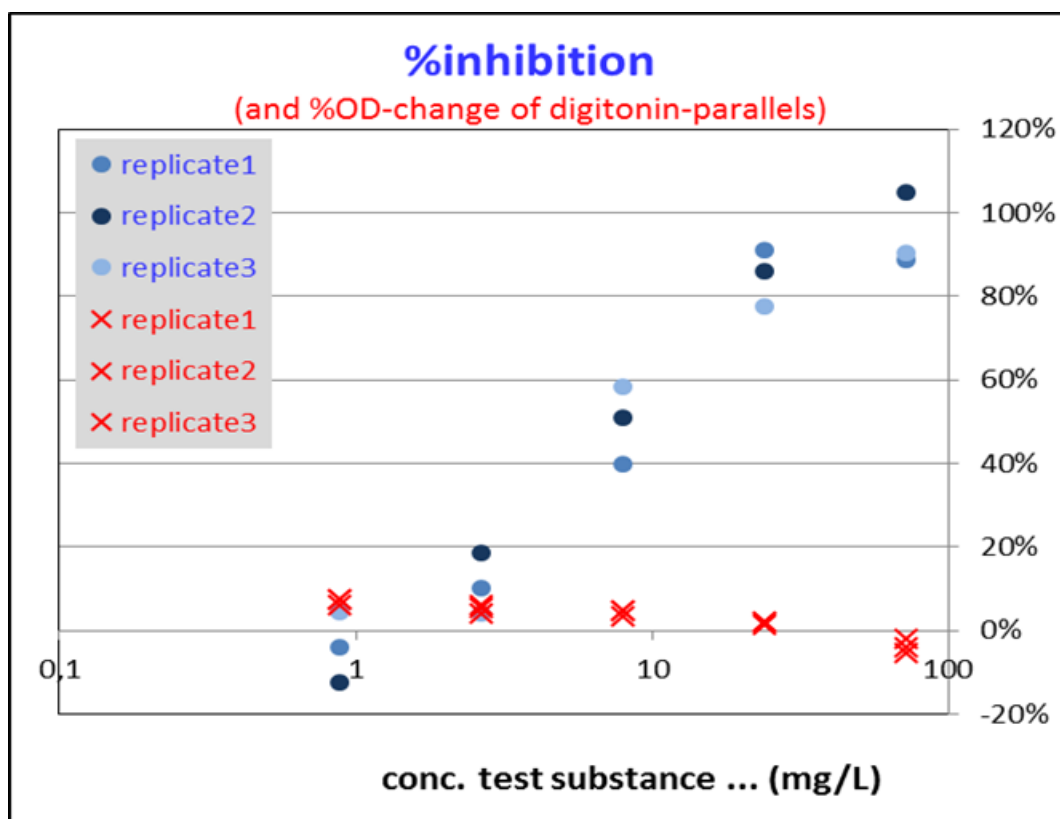


Figure 1 : Exemple de graphique concentration-réponse avec les % d'inhibition (triplicats) de l'activité phagocytaire (cercles pleins) et les % de modification chez les triplicats défaunés à la digitonine (croix).

BIBLIOGRAPHIE

Mooney, R. A., 1988. Use of digitonin-permeabilized adipocytes for cAMP studies. *Methods Enzymol.*, pp. 193-202.