

Les biocapteurs appliqués au contrôle des eaux: Revue - État de l'art

Biosensors for Environmental Monitoring and Water Control: Review - State of the Art

D. Osbild, M. Babut et P. Vasseur

Volume 8, numéro 4, 1995

URI : <https://id.erudit.org/iderudit/705236ar>

DOI : <https://doi.org/10.7202/705236ar>

[Aller au sommaire du numéro](#)

Éditeur(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

0992-7158 (imprimé)

1718-8598 (numérique)

[Découvrir la revue](#)

Citer cet article

Osbild, D., Babut, M. & Vasseur, P. (1995). Les biocapteurs appliqués au contrôle des eaux: Revue - État de l'art. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 8(4), 505–538. <https://doi.org/10.7202/705236ar>

Résumé de l'article

Cet article présente l'ensemble des biocapteurs en cours d'étude et proposés pour le contrôle en continu, automatisé et *in situ* de la qualité des eaux. Le principe des systèmes, étudiés jusqu'ici majoritairement en laboratoire et sur pilote, sera donné avec leurs performances au plan sensibilité et spécificité de détection des polluants hydriques. Ces performances conditionnent leur domaine d'application : les systèmes très sensibles étant affectés au contrôle des eaux d'alimentation et des eaux souterraines, les moins sensibles au contrôle des effluents très contaminés.

Les biocapteurs peuvent se caractériser par deux de leurs composantes principales :

- le réactif biologique ou *biocatalyseur*, sensible au(x) polluant(s);
- le détecteur appelé *transducteur*, qui traduit la réponse biologique du biocatalyseur en un signal électrique. Le transducteur peut être de type optique, électrochimique, ampérométrie principalement, ou piézoélectrique.

Trois grands types de biocapteurs peuvent être distingués selon la nature du biocatalyseur :

- les bioréacteurs, basés sur l'étude des réponses comportementales des vertébrés (poissons) et d'autres organismes aquatiques (microcrustacés, bivalves);
- les biosondes cellulaires reposant sur l'étude des fonctions métaboliques telles que la respiration, la bioluminescence, la photosynthèse de microorganismes immobilisés (bactéries, microalgues, levures) ou libres (boues activées) dans le milieu analysé;
- les biocapteurs "d'affinité" basés sur l'utilisation d'enzymes ou d'anticorps, chargés de détecter respectivement les substrats et inhibiteurs enzymatiques spécifiques, ou les substances antigéniques vis à vis desquelles les anticorps ont été développés. Ces systèmes sont, par principe, les plus spécifiques mais aussi les plus sensibles. Ils ne couvrent, cependant, qu'une gamme encore très limitée de micropolluants hydriques.

Le degré d'autonomie d'un biocapteur, sa facilité d'utilisation et de maintenance et sa fiabilité, sont des éléments qui rentrent en ligne de compte dans les performances. Ces qualités devront être évaluées lors de la phase de validation *in situ*, essentielle et déterminante pour juger de l'intérêt du système en conditions de fonctionnement réel.

REVUE – ÉTAT DE L'ART

Les biocapteurs appliqués au contrôle des eaux

REVIEW – STATE OF THE ART

Biosensors for environmental monitoring and water control

D. OSBILD¹, M. BABUT² et P. VASSEUR^{1*}

Reçu le 9 février 1995, accepté le 6 juillet 1995**.

SUMMARY

This paper reviews the use of biosensors for environmental biomonitoring and especially for the detection of water pollutants. These systems are developed in view of on-line applications, continuous and real time analysis. The principle and the design of the different systems proposed for this purpose are described with their performances deduced from pilot or *in situ* studies carried out up to now. Automation and autonomy, sensitivity and specificity are critical points that will determine the success of their applications in biomonitoring and the kind of application that can be envisaged. It is necessary they require minimal human intervention for maintenance and working. The more sensitive systems can be used for the monitoring of drinking and ground waters, the less sensitive ones for the monitoring of complex effluents, more heavily contaminated.

Biosensors can be distinguished on the basis of the type of *biocatalyst* associated with the *transducer*: the biological signal delivered by the biocatalyst is transmitted to a detector, also called transducer. The transducer, which may be an optical, electrochemical or piezoelectrical detector, transforms the biological response into an electric signal. This signal can be easily amplified and interpreted in terms of the toxicity and level of pollution of the analyzed sample.

Three categories of biosensors can be defined:

– biosensors using aquatic vertebrates and invertebrates: fish, microcrustacea, bivalves. Their behavior in the tested medium is studied as the criterion for toxicity;

1. Centre des Sciences de l'Environnement, BP 4025, 57040 Metz Cédex.

2. Agence de l'Eau Rhin Meuse, BP 19, 57061 Moufins les Metz.

* Auteur correspondant.

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 15 juillet 1996.

*** Communication présentée au Colloque Européen « Surveillance biologique en continu de la qualité des eaux », les 13-14 octobre 1994 à Nancy.

– cellular sensors, measuring physiological and biochemical functions such as respiration, bioluminescence, and photosynthesis, in microorganisms immobilized on the transducer (bacteria, yeast, microalgae,...) or suspended in the tested medium (activated sludge);

– biosensors measuring an « affinity » response and a specific binding between enzyme/substrate or antibody/antigen. These systems use enzymes or antibodies immobilized in close contact with the transducer; they may detect the (analogs of) enzymatic substrates and inhibitors, or the (analogs of) antigenic substances binding to the antibody. These systems appear promising on the basis of their sensitivity. At present they can be applied for the detection of triazines and phenols. Such systems need to be developed and extended to other pollutants in order to cover the wide range of aquatic contaminants.

User-friendliness, attendance and maintenance requirements, and service life are other critical aspects affecting the performances of a biosensor. These qualities need to be evaluated during the validation step of the equipment. *In situ* validation is essential for evaluating the relevance of the system in environmental biomonitoring and its applications. It is probable that among the numerous systems proposed as biosensors, only a few will be considered as suitable tools for on-line monitoring of waters.

Key-words : biosensors, environmental biomonitoring, bioelectrodes, fish, daphnids, bivalves, bacteria, microalgae, enzymes, antibodies.

RÉSUMÉ

Cet article présente l'ensemble des biocapteurs en cours d'étude et proposés pour le contrôle en continu, automatisé et *in situ* de la qualité des eaux. Le principe des systèmes, étudiés jusqu'ici majoritairement en laboratoire et sur pilote, sera donné avec leurs performances au plan sensibilité et spécificité de détection des polluants hydriques. Ces performances conditionnent leur domaine d'application : les systèmes très sensibles étant affectés au contrôle des eaux d'alimentation et des eaux souterraines, les moins sensibles au contrôle des effluents très contaminés.

Les biocapteurs peuvent se caractériser par deux de leurs composantes principales : (i) le réactif biologique ou *biocatalyseur*, sensible au(x) polluant(s) ; (ii) le détecteur appelé *transducteur*, qui traduit la réponse biologique du biocatalyseur en un signal électrique. Le transducteur peut être de type optique, électrochimique, ampérométrique principalement, ou piézoélectrique.

Trois grands types de biocapteurs peuvent être distingués selon la nature du biocatalyseur :

– les bioréacteurs, basés sur l'étude des réponses comportementales des vertébrés (poissons) et d'autres organismes aquatiques (microcrustacés, bivalves) ;

– les biosondes cellulaires reposant sur l'étude des fonctions métaboliques telles que la respiration, la bioluminescence, la photosynthèse de microorganismes immobilisés (bactéries, microalgues, levures) ou libres (boues activées) dans le milieu analysé ;

– les biocapteurs « d'affinité » basés sur l'utilisation d'enzymes ou d'anticorps, chargés de détecter respectivement les substrats et inhibiteurs enzymatiques spécifiques, ou les substances antigéniques vis-à-vis desquelles les anticorps ont été développés. Ces systèmes sont, par principe, les plus spécifiques mais aussi les plus sensibles. Ils ne couvrent, cependant, qu'une gamme encore très limitée de micropolluants hydriques.

Le degré d'autonomie d'un biocapteur, sa facilité d'utilisation et de maintenance et sa fiabilité, sont des éléments qui rentrent en ligne de compte dans les

performances. Ces qualités devront être évaluées lors de la phase de validation *in situ*, essentielle et déterminante pour juger de l'intérêt du système en conditions de fonctionnement réel.

Mots clés : biocapteurs, contrôle des eaux, bioélectrodes, poissons, daphnies, bivalves, bactéries, microalgues, enzymes, anticorps.

1 – GÉNÉRALITÉS

Les biocapteurs appliqués à l'environnement sont étudiés actuellement pour le contrôle des eaux et des effluents hydriques ; leur développement s'est imposé afin de suppléer les essais écotoxicologiques et physico-chimiques conventionnels, inadaptés à la détection *in situ* et en continu des polluants. Cet article est une revue des principaux systèmes proposés ou en cours d'étude dans le domaine de l'eau, avec leur principe et leurs performances.

Un *biocapteur* est un analyseur biologique conçu pour fonctionner en continu ou semi-continu et donner une réponse en temps réel sur la qualité des flux au sein desquels il est placé. Le système doit être automatisable et capable de déclencher une alarme en cas de réponse sortant de limites standards préétablies.

L'analyseur se compose d'un élément biologique, le *biocatalyseur*, dont la réponse sera captée par un détecteur appelé *transducteur*, chargé de transformer un signal biologique en un signal électrique aussitôt amplifié et traité. Le terme de biocapteur regroupe les biosondes et les bioréacteurs (NEUJAHN, 1984). Dans le cas des biosondes, le biocatalyseur est directement immobilisé sur le transducteur, souvent par l'intermédiaire d'un support : l'immobilisation résulte d'un simple contact ou de l'adsorption des organismes biologiques tissulaires et cellulaires sur une membrane ; elle peut aussi mettre en jeu des liaisons covalentes ou l'inclusion dans un gel pour les biomolécules (enzymes et anticorps,...). Dans le cas des bioréacteurs, la composante biologique est physiquement séparée du détecteur par le flux circulant, mais sa réponse reste enregistrée en permanence : l'organisme biologique évolue alors librement dans le milieu analysé.

Les biocatalyseurs peuvent être classés en trois catégories :

- les vertébrés ou invertébrés aquatiques : poissons, microcrustacés (daphnies), bivalves, utilisés principalement dans les bioréacteurs,
- les réactifs pluricellulaires (tissus végétaux et animaux), cellulaires (bactéries, microalgues, levures,...) et les organites subcellulaires (chloroplastes, membranes thylakoïdiennes,...),
- les biomolécules (enzymes, anticorps, récepteurs, acides nucléiques,...) dont l'affinité pour leur ligand spécifique est mise à profit dans les biosondes. Les électrodes enzymatiques dont le principe repose sur la réaction enzyme-substrat ont été les premiers biocapteurs mis en place.

Les signaux biologiques sont détectés à l'aide de transducteurs principalement électrochimiques et optiques, calorimétriques et mécaniques éventuellement. Les transducteurs *électrochimiques* incluent les transducteurs *ampérométriques* qui enregistrent la variation de l'intensité du courant appliqué à potentiel constant, et *potentiométriques* qui mesurent les changements de potentiel à intensité de courant constant. Les transducteurs *optiques* enregistrent l'absorption ou l'émission de photons et sont particulièrement intéressants pour leur sensibilité dans le domaine de la fluorescence et de la luminescence.

Les transducteurs *calorimétriques* basés sur la mesure des variations d'énergie thermique qui accompagnent les réactions biologiques sont encore peu utilisés. Récemment des transducteurs de type *piézoélectrique* ont été proposés. Leur principe repose sur l'augmentation de masse du transducteur suite à la fixation d'un ligand ou du produit de la réaction biologique sur le biocatalyseur d'une biosonde.

La figure 1 résume les composants possibles d'un biocapteur.

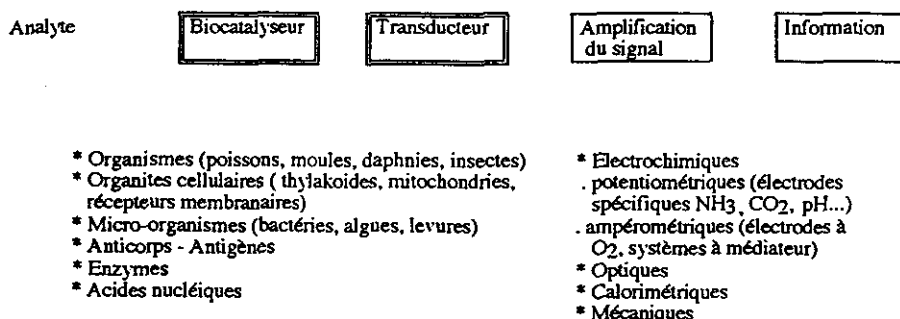


Figure 1 Schéma général d'un biocapteur et combinaisons biocatalyseur - transducteur possibles.

Principle of biosensors and possible biocatalyst - transducer combinations.

Les biocapteurs sont caractérisés par leur spécificité, leur sensibilité et leur degré d'autonomie. La spécificité est fonction de la composante biologique alors que la sensibilité dépend aussi du transducteur et de la qualité de l'interaction biocatalyseur-transducteur. Ces deux caractéristiques détermineront des domaines d'utilisation du biocapteur : une sensibilité élevée permettra une application au contrôle de la qualité des eaux potables et des eaux souterraines, alors qu'une sensibilité plus faible orientera vers le contrôle des effluents industriels dont le niveau de contamination est en général nettement plus élevé.

Il est également essentiel que le système automatisé soit doté d'un degré d'autonomie suffisant pour pouvoir fonctionner en continu ou en semi-continu, sans temps morts et avec le minimum d'intervention humaine.

CAIRNS et VAN DER SCHALIE (1980), KRAMER et BOTTERWEG (1991) et BALDWIN et KRAMER (1994) ont publié d'excellentes synthèses sur les biocap-

teurs utilisant des organismes aquatiques. Dans l'article qui suit, nous présentons l'ensemble des biocapteurs en cours de développement pour le contrôle en continu de la qualité des eaux, avec leurs applications possibles compte tenu de leur sensibilité.

2 – BIOCAPTEURS UTILISANT DES VERTÉBRÉS ET INVERTÉBRÉS AQUATIQUES

Les trois types d'organismes les plus couramment utilisés sont les poissons, les daphnies et les moules, dont sont étudiées les réactions comportementales et physiologiques.

Utilisation de poissons en tant que biocatalyseur

Le comportement des poissons, la mobilité, le rhéotactisme c'est-à-dire leur capacité à nager à contre-courant, la respiration et les impulsions électriques naturelles sont les principaux paramètres contrôlés.

Etude de la mobilité et du comportement

WALLER et CAIRNS (1972) ont été parmi les premiers à s'intéresser à des systèmes de ce type constitués d'aquariums traversés de toute part par des rayons lumineux. Les interruptions du rayonnement, consécutives au passage des poissons (*Lepomis macrochirus*), sont comptabilisées à intervalles réguliers et interprétées en terme de mobilité des organismes. Toute augmentation ou diminution est considérée comme un stress si elle est enregistrée dans au moins deux aquariums sur les six mis en parallèle.

Le même principe de détection par infra-rouge est utilisé dans le dispositif appelé « Fischwarntest » mis en place sur le Rhin et utilisant *Leuciscus idus*.

La mobilité est mesurée par effet Doppler dans le « Truitosem » développé par la Société des Eaux de Marseille.

KRESS et NACHTIGALL (1989) ont étudié les critères les plus sensibles de l'activité natatoire de *Oncorhynchus mykiss* : distance parcourue, position en hauteur de l'animal dans l'aquarium, axe du corps du poisson par rapport à l'horizontale, ouverture/fermeture de la gueule, mouvements des nageoires et capacité au changement d'orientation. Dans le cas d'une intoxication au phénol, les deux seuls paramètres significativement différents du témoin sont la position du poisson en hauteur dans l'aquarium et les mouvements des nageoires.

Etude du rhéotactisme

Un biocapteur actuellement en place sur le Rhin, le « BehavioQuant », étudie le rhéotactisme d'un banc de poissons (*L. idus*) en enregistrant le

nombre de passages du banc, sa mobilité globale, le nombre de demi-tours pouvant être effectués par les organismes, leur position dans la hauteur de la colonne d'eau.

Dans d'autres systèmes basés sur le même principe, l'alarme est déclenchée lorsque les poissons affaiblis incapables de lutter contre le courant, viennent par exemple :

- percuter une grille reliée au détecteur, comme dans l'« Aqua-Tox-Control » à l'étude sur le Rhin (fig. 2),

- obstruer le conduit d'aspiration du milieu et faire ainsi augmenter le niveau de l'eau du container, comme dans le système utilisant des truites (*O. mykiss*) exploité par la Société Nancéenne des Eaux (THOMAS et al., 1994).

Dans tous les cas, les poissons doivent être renouvelés régulièrement, tous les huit jours en général, afin d'éviter les problèmes de fatigue et d'adaptation.

Etude de la respiration

La fréquence de ventilation des poissons (*O. mykiss*) est mesurée dans le « WRc Fischmonitor » en suivant la contraction musculaire au niveau des opercules à l'aide d'un couple d'électrodes (EVANS et WALLWORK, 1988).

Etude des signaux électriques

Les Poissons de l'ordre des Gymnotiformes ont en général la particularité d'émettre un signal électrique de type ondulatoire extrêmement régulier dans des conditions environnementales stables. Cette particularité peut être utilisée pour détecter toute altération de la qualité physico-chimique de l'eau qui modifiera la fréquence et la forme du signal. THOMAS et al. (1994) utilisent *Apteronotus albifrons*, KAY et LEWIS (1994) au contraire utilisent des poissons du genre *Gnathonemus* (*petersii* et *tamandua*) qui émettent un signal de type pulsatoire.

Les performances des principaux biocapteurs dont les biocatalyseurs sont des poissons sont résumées dans le tableau 1.

Utilisation de daphnies en tant que biocatalyseur

Plusieurs biocapteurs mesurant la mobilité des daphnies dans une enceinte traversée de sources lumineuses ou infra-rouge sont en cours d'étude. Le « Dynamischen Daphnien-test » est installé sur le Rhin depuis plusieurs années (BUND/LÄNDER-PROJEKTGRUPPE 1994). Les seuils de sensibilité de ce biocapteur pour une gamme de substances testées en laboratoire par HENDRIKS et STOUTEN (1993) sont en général supérieurs aux valeurs de CL50 du test daphnies-24 heures, tout en restant du même ordre de grandeur (tabl. 2). VAN HOOFF et al. (1994) étudient actuellement un système du même type basé sur le mouvement des daphnies induit par deux sources lumineuses situées en haut et en bas de l'enceinte et suivi à l'aide de récepteurs infra-rouges.

Tableau 1 Caractéristiques des principaux biocapteurs dont les biocatalyseurs sont des poissons. Comparaison des seuils de réponse aux valeurs de CL_{50-96h} ou NOEC chronique, pour la même espèce, fournies par les mêmes auteurs ou trouvées dans la littérature.

Table 1 Characteristics of the main biosensors using fish as biocatalysts. Comparison with LC_{50-96h} or chronic NOEC, for the same species, given by the authors or found in the literature.

Réponse enregistrée	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse* $\mu g/l$	Durée d'exposition	CL_{50-96h}	NOEC chronique $\mu g/l$	Références
Espèce utilisée						
Mouvement						
<i>Notemigonus crysoleucas</i>	Zn^{2+}	$5,93 \cdot 10^3$	12 h			WALLER et CAIRNS, 1972
<i>Carassius auratus</i>		$2,93 \cdot 10^3$	pas de réponse			
	NH_3	21				
	Phénol	$5,01 \cdot 10^3$		$5 \cdot 10^3 - 9,9 \cdot 10^3$ (b)		PETRY, 1982
	Alkylsulfonate	$2,79 \cdot 10^3$				
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Distéaryl-diméthyl-ammonium	$2,71 \cdot 10^3$				
	chloride	$1,51 \cdot 10^3$		$2,2 \cdot 10^3$ (b)		
	Zn^{2+}					
Rhéotactisme						
	Isophorone	3				
	dichloride-nitrométhane	$4 \cdot 10^{-3}$				
	composés N aromatiques	1				
	pirimicarb/simazine	2,3/1,3				
	diméthoate/pirimicarb	0,21/0,26				
<i>Leuciscus idus</i>	butylbenzene-sulfanamide	8,8				
(in situ)	diméthoate/pirimicarb/	2,0/0,5/1,6	50 min de contact			BOTTERWEG et al., 1989
	tétrachloride-éthane					
	tétrachloride-éthane/tétra-	10/0,2/0,4/0,3/1,3				
	chloride-éthène/fluoranthène/					
	pyrène/paraoxon-equivalent					
	trioxane/fluoranthène/	2,0/0,5/0,4/0,5/0,5				
	pyrène/alk-oxy-alkane/					
	terpénolide					

Tableau 1 Suite

Réponse enregistrée	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse* µg/l	Durée d'exposition	CL _{50-95%}	NOEC chronique µg/l	Références
Espèce utilisée						
<i>Leuciscus idus</i>	3,4-Dichloroaniline	500	19,2 h	2 · 10 ⁴ (24 h)		HENRIKS et STOUTEN, 1993
	NH ₃	1,2 · 10 ³	2,4 h	2,8 · 10 ⁴ (24 h)		
	Cadmium	300	19,2 h	680 (24 h)		
	Disulfoton	7 · 10 ³	19,2 h	10 · 10 ³ (24 h)		
	Endosulfan	5	24 h	6 (24 h)		
	Endrine	15	24 h	12 (24 h)		
	Alkylbenzènesulfonate linéaire	5,4 · 10 ³	76,8 h	7,5 · 10 ³ (24 h)		
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	KCN	70 (35 % des poissons réagissent)	21 min	150 (b)		THOMAS et al., 1994
Ventilation						
<i>Lepomis macrochirus</i> statique	Nitroglycérine/Diéthylphthalate/Pb 2+	1,20 · 10 ³ /20/50	25 à 45 min			GRUBER et CARINS, 1981
<i>Oncorhynchus mykiss</i> « WRC Fish monitor »	Ammonium	110	17 min			EVANS et WALLWORK, 1988
	Phénol	2 · 10 ³	28 min	9,3 · 10 ³ (48 h)		
	Paraquat	800	26 min	3,2 · 10 ⁴		
	2,4,6-trichlorophénol	200	20 min	10 · 10 ³ (24 h)		
	Lindane	3	21 min	60		
	PCP	140	33 min	250 (48 h)		
	Formaldéhyde	10 ⁶	38 min	8,1 · 10 ⁵		
	Huile diesel	11	35 min			
<i>Lepomis macrochirus</i>	Pétrole	3	60 min			DIAMOND et al., 1990
	Zn ²⁺	400	15 min			
	Cd ²⁺	4	30 min	80 (c)		
	Trichloroéthylène	24	30 min			
<i>Lepomis macrochirus</i>	Dieldrine	27	45 min			GARDNER et al., 1990
	1,3,5-trinitrobenzène	172	6 jours			
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aniline	5 · 10 ³	immédiate	4,3 · 10 ⁴		BALDWIN et al., 1994
	Diphényl-1,3-guanidine	> 10 ³				
	Ethanol	> 5 · 10 ⁴		11,2 · 10 ⁶		

<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Ethylène glycol	$> 1,05 \cdot 10^5$		$4,7 \cdot 10^4$	BALDWIN <i>et al.</i> , 1994
	Formaldéhyde	$1,5 \cdot 10^5$	45 à 95 min	$6,1 \cdot 10^5$	
	Lindane	25	8 min	27	
	2-mercaptobenzothiazole	$1,8 \cdot 10^3$	Immédiate	750	
	Méthanol	$1,2 \cdot 10^5$	36 min	$20,1 \cdot 1,10^5$	
	Morpholine	$> 10^4$		$3,8 \cdot 10^5$	
	PCP	240	21 à 36 min	200	
Signaux électriques (fréquence en Hz)	Hg ²⁺	100	20 h		GELLER, 1984
		500	4 h		
		500	4 h		
	Cu ²⁺	100	4 h		
		$1,2 \cdot 10^4$	28 h		
		$1,8 \cdot 10^4$	24 h		
		$4,1 \cdot 10^4$	11 h		
		$5,8 \cdot 10^4$	8 h		
	NaAsO ₂	$9,8 \cdot 10^4$	5 h		
<i>Gnathonemus petersii</i>	Phénol	10 ³	4 à 6 h		LEWIS <i>et al.</i> , 1990
<i>Gnathonemus petersii</i>	Phénol	100	30 min		KAY et LEWIS, 1994
	CN ⁻	5	60 min		
		25	15 min		
	Cr ³⁺	200	15 min		
	Cr ⁶⁺	200	15 min		
	Phosphate	50	15 min		
	Cu ²⁺	5	15 min		
	Cd ²⁺	200	15 min		
	Lindane	100	15 à 45 min		
<i>Apteronotus albifrons</i>	TBTO	10	15 à 30 min		THOMAS <i>et al.</i> , 1994
	KCN	35 (50 % des poissons réagissent)	20 min		

* Concentration la plus faible induisant une réponse au cas où plusieurs concentrations auraient été testées pour une même substance. Les teneurs pour les éléments minéraux sont exprimées en µg/l ou µM du cation ou de l'anion correspondant.

* Lowest concentration inducing a response (LOEC). The concentrations of inorganic elements are expressed as µg/l or µM of the corresponding cation or anion.

(a) EVANS et WALLWORK, 1988. (b) MUNKITTRICK *et al.*, 1991. (c) ATCHISON *et al.*, 1987.

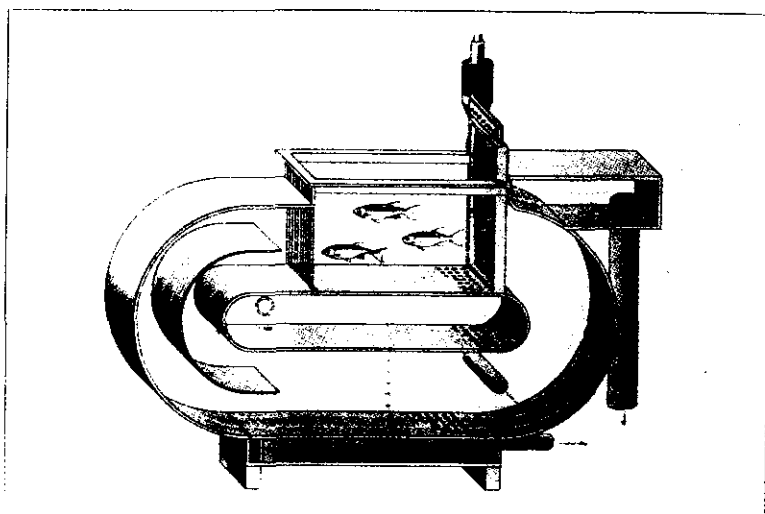


Figure 2 Principe général des biocapteurs basés sur l'étude du rhéotactisme des poissons (d'après BOTTERWEG *et al.*, 1989).

*Principle of fish biosensors measuring rheotaxis (BOTTERWEG *et al.*, 1989).*

Tableau 2 Seuils de réponse d'un biocapteur à daphnies et comparaison aux valeurs de CI_{50-24h} pour la même espèce (HENDRIKS et STOUTEN, 1993).

Table 2 Results of a biosensor using waterfleas as biocatalysts and comparison with IC_{50-24h} obtained under static conditions (HENDRIKS and STOUTEN, 1993).

Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse* $\mu g/l$	Durée d'exposition (heures)	CI_{50-24h} $\mu g/l$
1,2-dichloroéthane	$10 \cdot 10^4$		$3,6 \cdot 10^5$
3,4-dichloroaniline	$3,6 \cdot 10^3$	26,4	700
Cadmium	360	9,6	130
ChlorophénoI	$2 \cdot 10^4$		$10 \cdot 10^3$
Diazinon	8	7,2	2
Disulfoton	100	12	< 60
Endosulfan	400	12	510
Etrinfos	4		4
Alkylbenzènesulfonate linéaire	480	2,4	$7,8 \cdot 10^3$
Paraquat	$> 7,4 \cdot 10^3$	7,2	$4,8 \cdot 10^3$
Parathion-éthyl	5	2,4	2
Parathion-méthyl	5	4,8	4
PentachlorophénoI	280	14,4	$1,1 \cdot 10^3$
Propéthamphos	100	12	
Thiométhon	400	12	< $8,2 \cdot 10^3$

* Concentration la plus faible induisant une réponse au cas où plusieurs concentrations auraient été testées pour une même substance.

* Lowest concentration inducing a response (LOEC).

Utilisation de mollusques bivalves en tant que biocatalyseur

Les mouvements valvaires, l'activité cardiaque et l'activité de filtration de l'eau constituent des critères utiles pour des biocapteurs hydriques utilisant des bivalves. Les organismes peuvent être d'origine marine (*Mytilus edulis*, *Scrobicularia plana*) ou dulçaquicole (*Dreissena polymorpha*, *Corbicula fluminea*, *Unio pictorum*).

Etude des mouvements valvaires

Les biocapteurs de ce type utilisent le fait que les bivalves en période d'immersion aspirent et refoulent l'eau quasiment en permanence par leur siphons inhalant et exhalant lorsque les valves sont entrouvertes. La période d'ouverture des valves est entrecoupée de mouvements de fermeture intermittents. Une modification de la fréquence d'ouverture et de fermeture traduit une altération du milieu et une tentative des animaux d'échapper à un environnement hostile. La fermeture des valves peut aussi résulter d'un ralentissement du rythme cardiaque (AKBERALI et BLAKE, 1980/1981).

Les systèmes développés par SLOOFF *et al.* (1983) avec *D. polymorpha*, par HAM et PETERSON (1994) sur *C. fluminea* et le valvomètre de l'IFREMER et MIGLEC sont apparentés (fig. 3) : en pratique, la moule est immobilisée par l'une de ses valves fixée sur un socle, l'autre valve est reliée à un système d'enregistrement des mouvements valvaires constitué d'un détecteur électrique (SLOOFF *et al.*, 1983), mécanique et graphique (valvomètre), ou optique (HAM et PETERSON, 1994).

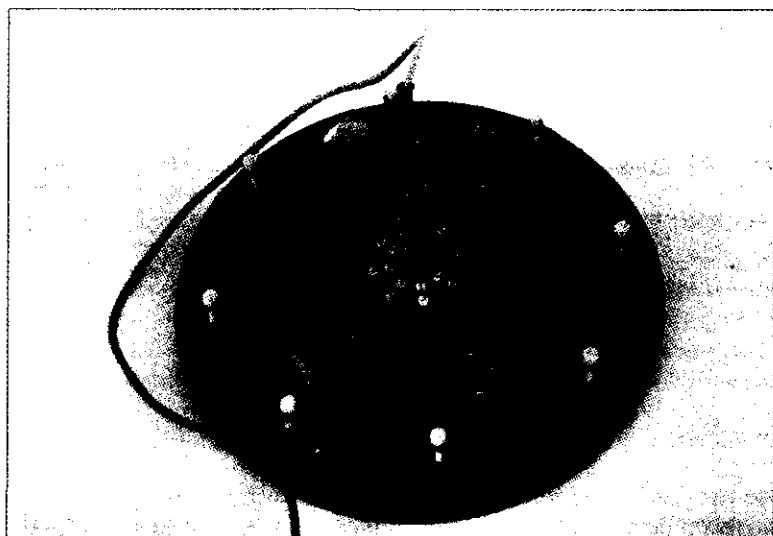


Figure 3 Le valvomètre développé par IFREMER et MIGLEC.

The valvomètre developed by IFREMER and MIGLEC.

Les deux valves peuvent aussi être reliées au détecteur comme dans le « Mossel monitor » (JENNER *et al.*, 1989) actuellement à l'étude sur le Rhin.

Etude de l'activité de filtration

La filtration des moules est mesurée à l'aide d'une sonde placée à bonne distance des siphons, qui enregistre les variations de vitesse du fluide et les échanges thermiques induits entre la sonde et le milieu. Ce système a été utilisé par MOUABAD et PIHAN (1993) sur *D. polymorpha*.

Les différents systèmes utilisant les bivalves et leurs performances sont présentés sur le tableau 3.

Utilisation de larves de diptères en tant que biocatalyseur

La fuite de larves d'*Aedes aegypti* en présence de lumière est utilisée comme signal, la vitesse de déplacement des larves étant diminuée en présence de toxiques (CAIRNS et VAN DER SCHALIE, 1980).

3 - BIOCAPTEURS CELLULAIRES OU SUBCELLULAIRES

Le matériel de choix est représenté par les bactéries, les levures et les microalgues qui sont des formes unicellulaires particulièrement robustes. En revanche, les cellules issues d'organismes pluricellulaires ou les tissus animaux, plus difficiles à isoler ou à maintenir en survie, sont peu adaptées à ce type d'usage.

Les réactifs cellulaires sont utilisés généralement immobilisés au contact du détecteur ce qui présente un double avantage : (i) d'éviter l'élimination du biocatalyseur avec le milieu circulant et (ii) d'augmenter la sensibilité du système en optimisant le rendement de transduction du signal biologique.

Les réactions biologiques contrôlées pour rendre compte de la toxicité sont basées sur la mesure du métabolisme cellulaire ; il peut s'agir de :

- mesure globale comme le contrôle de la respiration cellulaire par évaluation de l'oxygène consommé ou du gaz carbonique produit ;
- mesure plus caractéristique du microorganisme utilisé comme :
 - l'activité dénitrifiante,
 - la bioluminescence,
 - l'activité photosynthétique,
- ou de mesure très spécifique comme une activité enzymatique ou l'activation de gènes particuliers en réponse à une exposition toxique.

La disponibilité d'électrodes spécifiques à O_2 , CO_2 , NH_3^+ et H^+ a été à l'origine du développement des biocapteurs, initialement à des fins biotechnologiques pour le contrôle des réactions de fermentation dans l'industrie alimentaire. Cette nouvelle technologie a ensuite été transférée au domaine de l'environnement.

Tableau 3 Caractéristiques des principaux biocapteurs dont les biocatalyseurs sont des bivalves d'eau douce ou marine.

Table 3 Characteristics of the main biosensors using freshwater or marine bivalves as biocatalysts.

Réponse enregistrée Espèce utilisée	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse* µg/l	Durée d'exposition	Références
Mouvements des valves et rythme cardiaque une valve fixée <i>Scrobicularia plana</i>	Cu ²⁺	10	2-3 h	AKBERALI et BLACK, 1980-81
<i>Dreissena polymorpha</i>	Cadmium** Cuivre Cyanure 1,3-dichlorobenzène Chloroforme Phénol PCP Toluène Xylène Trichloroéthylène Hexachlorobutadiène Lindane	200 18 400 1,4 · 10 ³ 4,32 · 10 ⁴ 1,46 · 10 ⁴ 140 6,1 · 10 ³ 1,19 · 10 ⁴ 8 · 10 ³ 150 60	8 h	SLOOFF <i>et al.</i> , 1983
<i>Dreissena polymorpha D</i> <i>Mytilus edulis M</i>	Cuivre** Cadmium Selenium Zinc Plomb TBTO Hypochlorite Huile	< 10 D M < 100 D M < 100 D < 500 D M < 500 D M < 10 D M < 10 D M < 6 · 10 ³ M		KRAMER <i>et al.</i> , 1989
<i>Corbicula fluminea</i>	Chlore	20	immédiate	HAM et PETERSON, 1994
deux valves fixées <i>Dreissena polymorpha D</i> <i>Unio pictorum U</i>	Hypochlorite TBTO	> 37 D > 30 U 6 D	1 h 1 h	JENNER <i>et al.</i> , 1989
Activité de siphons <i>Dreissena polymorpha</i>	Cuivre** Mercure Cadmium Zinc Plomb Détergent Lindane	15 10 100 200 400 100 100	Intoxication continue sur 24 h (mais réponse en 10 h possible)	MOUABAD et Pihan, 1993

* Concentration la plus faible induisant une réponse au cas où plusieurs concentrations auraient été testées pour une même substance. Les teneurs pour les éléments minéraux sont exprimées en µg/l du cation ou de l'anion correspondant.

** Speciation non précisée par l'auteur.

* Lowest concentration inducing a response (LOEC). The concentrations of inorganic elements are expressed in µg/l or µM of the corresponding cation or anion.

** Speciation non mentioned by the authors.

Etude de la respiration cellulaire

Les systèmes les plus usuels sont ceux qui contrôlent l'activité respiratoire, à l'instar des essais de DBO (demande biologique en oxygène) effectués pour évaluer la charge globale en micropolluants organiques biodégradables d'une eau. Certains systèmes peuvent mettre en jeu des bactéries, des levures ou des organismes mutants.

La sensibilité des biosondes ou bioélectrodes dépendra du détecteur (électrode à O_2 ou à CO_2) et des caractéristiques de la membrane biologique : espèce(s) bactérienne(s), nombre de bactéries immobilisées, procédé de fixation (tabl. 4). En fait, la différence de sensibilité entre espèces est moins nette que celle qui existe entre les souches pures (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aminovorans*, *P. putida* ou *P. aeruginosa*) et les boues activées souvent moins sensibles ; peut-être faut-il voir dans cette sensibilité plus faible des boues activées, un reflet de l'adaptation et donc de la résistance des microorganismes aux polluants hydriques dans les stations d'épuration.

Les microorganismes, souches pures ou boues activées, ne sont pas systématiquement immobilisés, mais peuvent aussi être utilisés en suspension dans des bioréacteurs. Il est net que les capteurs utilisant des boues activées libres sont moins sensibles ; le principe du détecteur basé sur la mesure des variations de pression d' O_2 ou de CO_2 est probablement en cause, ces systèmes ne permettant pas des contrôles aussi fins que les détecteurs ampérométriques ou potentiométriques.

Les levures ont été proposées au lieu des bactéries dans des systèmes apparentés mesurant la consommation d'oxygène. CAMPANELLA *et al.* (1994) ont utilisé *Saccharomyces cerevisiae* immobilisée dans un gel d'agar pour la détection des effets du cuivre en milieu hydrique.

Des mutants bactériens ont aussi été envisagés pour la construction de bioélectrodes à O_2 ou CO_2 pour la détection de composés mutagènes. Le principe du procédé est le suivant : les mutants incapables de se multiplier sur milieu carencé retrouvent le type sauvage à la suite de l'exposition à des agents mutagènes et récupèrent simultanément le pouvoir de se développer sur ce milieu. La croissance s'accompagne d'une consommation d'oxygène enregistrée par la bioélectrode. *Salmonella typhimurium his*⁻ a été utilisée par KARUBE *et al.* (1982) sur le principe du test d'Ames. *Bacillus subtilis Rec*⁻ et *Rec*⁺ ont été proposés par le même auteur en 1981 dans un système différentiel à double électrode qui enregistre la différence de consommation d' O_2 entre la souche *Rec*⁻, sensible aux mutagènes car déficiente en système de réparation de l'ADN, et la souche *Rec*⁺, insensible car dotée des réparases leur permettant de réparer l'ADN altéré et donc de croître en présence de ces agents génotoxiques.

Etude de l'activité dénitrifiante

D'autres systèmes basés sur la mesure d'activités dénitrifiantes à l'aide d'une électrode à NH_3 ont été utilisés par KOBOS *et al.* (1979) pour le contrôle des fermentations. Le principe a été repris par RAWSON et ROGERSON (1994) et appliqué à des boues activées en suspension pour la détection du 3,5-dichlorophénol. L'activité dénitrifiante était inhibée de 50 % pour une concentration de l'ordre de 3 mg/l après 4 h d'exposition.

Tableau 4 Caractéristiques des biocapteurs dont les biocatalyseurs sont des bactéries et dont le signal de toxicité est une modification de la respiration.

Table 4 Characteristics of the main biosensors using bacteria as biocatalysts and respiration as the toxic criterion.

Paramètre ou Réponse enregistrés	Espèce utilisée	Bactéries utilisées sous forme	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse*		Délai de réponse	Références
				μM	$\mu\text{g/l}$		
O_2	<i>Pseudomonas aminovorans</i>	Immobilisées Membrane en nylon	Triméthylamine	2,6		10 min	GAMATI <i>et al.</i> , 1991
	Boues activées « RODTOX »	Libres 10 litres	3,5 dichlorophénol Cu^{2+} CN-		$1,17 \cdot 10^4$ (Cl_{50}) $11,4 \cdot 10^3$ 780	5 min 15 min 5 min	KONG <i>et al.</i> , 1993
	<i>Pseudomonas putida</i> « Toxalarm » <i>Pseudomonas putida</i> « Stiptox-norm » Boues activées « Toxiguard » Boues activées « Biox-1000T »	Libres Libres Biofilm Fixées sur anneaux	PCP		10^3 $1,5 \cdot 10^3$ 50 10^3	Immédiate	SCHMITZ <i>et al.</i> , 1993
	<i>Escherichia coli</i>	Immobilisées	PCP Chlorure d'étain-tributyrique Formaldéhyde Phénol 2-chlorophénol MCPA Chlorure de mercure Atrazine Cadmium Chlorure de cuivre		9 11 $4,6 \cdot 10^3$ $> 10^3$ 50 150 27 $> 10^3$ $> 10^3$ 500		HATTON <i>et al.</i> , 1994
	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	Immobilisées Membrane en polycarbonate	DBO		$0 \text{ à } 7 \cdot 10^4$		LI et TAN, 1994
	Boues activées	Libres	3,5-DCP		$5,5 \cdot 10^3$ (Cl_{50})	30 min	RAWSON et ROGERSON, 1994

Tableau 4 Suite

Paramètre ou Réponse enregistrés	Bactéries utilisées sous forme	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse*		Délai de réponse	Références
			μM	$\mu\text{g/l}$		
	<i>Pseudomonas putida</i>	Membrane en acétate de cellulose	Benzène	71	2-10 min	TAN <i>et al.</i> , 1994
	Boues activées « Biox-1000T »	Fixées sur anneaux	DBO	$5 \cdot 10^3$	3 min	TEUTSCHER et GROSSER, 1994
	Boues activées « RODTOX »	Libres 10 litres	DBO PCP Hg^{2+} Cu^{2+} CN^- 3,5-DCP o-crésol Toluène	10^4 à $5 \cdot 10^8$ 10^3 10^4 10^4 10^4 10^4 10^6 10^6	30 min 1 h *	VANROLLEGHEM <i>et al.</i> , 1994
CO_2	<i>Escherichia coli</i>	Immobilisées Membrane nucléopore	Phénol HCN Cd^{2+} AsO_4^{3-} Pb^{2+} Cu^{2+}	$1,2 \cdot 10^6$ (Cl_{50}) $3,5 \cdot 10^3$ 300 $1,5 \cdot 10^3$ 130 $1,1 \cdot 10^3$	5 à 30 min	DORWARD et BARISAS, 1984
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Immobilisées Membrane en nylon	Nitrate	$8 \cdot 10^3$	15 min	HIKUMA <i>et al.</i> , 1993
Transport d'électrons de la chaîne respiratoire	<i>Escherichia coli</i> « Eucyano-Bacteria Electrode »	PCP		10^3		SCHMITZ <i>et al.</i> , 1993
	<i>Escherichia coli</i> E <i>Pseudomonas putida</i> P	PCP PCP		500 E 10^3 P		HANSEN, 1994

* Concentration la plus faible induisant une réponse au cas où plusieurs concentrations auraient été testées pour une même substance. Les teneurs pour les éléments minéraux sont exprimées en $\mu\text{g/l}$ ou μM du cation ou de l'anion correspondant.

* Lowest concentration inducing a response (LOEC). The concentrations of inorganic elements are expressed as $\mu\text{g/l}$ or μM of the corresponding cation or anion.

Etude de la bioluminescence

Les mesures de luminescence, intéressantes de par leur sensibilité et la facilité d'enregistrement à l'aide de capteurs optiques, peuvent être mises à profit dans la technologie des biocapteurs (tabl. 5).

La luminescence *physiologique* des bactéries *Vibrio fischeri* est utilisée dans l'Auto-Microtox qui est un automate reproduisant les différentes étapes du test Microtox à la fréquence globale d'une mesure toutes les 50 minutes : l'intensité de la luminescence liée à la respiration cellulaire est inhibée en présence de substances toxiques proportionnellement à leur concentration dans le milieu cellulaire (HENRIET *et al.*, 1990).

La luminescence peut être *acquise artificiellement* par insertion du gène « lux » de la luminescence dans le génôme bactérien sous le contrôle du promoteur d'un gène spécifique. La luminescence est émise lors de la transcription du gène. Les gènes intéressants pour la détection des substances toxiques en général seraient ceux qui codent pour les protéines de stress (HSP) ou les métallothionéines dont la transcription est induite suite à l'exposition à des facteurs toxiques et à des métaux respectivement (VAN DYK *et al.*, 1994).

Etude de l'activité photosynthétique

Elle peut être quantifiée au moyen de l'oxygène produit par photolyse de l'eau, du flux d'électrons ou de la fluorescence spontanée ou retardée, résultant de l'illumination des systèmes photosynthétiques. Des électrodes à oxygène de Clark en particulier, et des capteurs optiques permettent de faire des mesures non destructrices avec une bonne sensibilité. Par contre, la mesure des flux électroniques nécessite un médiateur chimique qui perméabilise les structures cellulaires aux électrons et assure leur transfert des membranes photosynthétiques jusqu'à l'électrode ; ce procédé pose un problème, dans la mesure où le médiateur, souvent un dérivé quinonique, n'est pas lui-même exempt de toxicité (PANDARD, 1992). Dans le cas de l'utilisation des électrodes, celles-ci doivent être protégées par une membrane de téflon perméable exclusivement aux électrons et placée entre le corps de l'électrode et la membrane biologique photosynthétique, afin d'éviter l'interférence des substances oxydo-réductibles du milieu susceptibles de perturber les mesures ampérométriques.

Les Cyanophycées et les Chlorophycées sont les organismes photosynthétiques les plus utilisés en tant que biocatalyseur, en particulier : *Synechococcus leopoliensis*, *Synechococcus sp.*, *Anabaena variabilis* (RAWSON *et al.*, 1987 ; WESTON et ROBINSON, 1991 ; SCHMITZ *et al.*, 1993), *Chlorella vulgaris* (MATSUNAGA *et al.*, 1984 ; WESTON et ROBINSON, 1991 ; PANDARD *et al.*, 1993), *Chlamydomonas reinhardtii* (SCHMITZ *et al.*, 1993), *Scenedesmus subspicatus*, *S. obliquus*, *S. quadricauda*, *Selenastrum capricornutum* (PANDARD et VASSEUR, 1992). Les algues marines, chlorophycées (*Dunaliella bioculata*) et diatomées (*Phaeodactylum tricornutum*), ont été utilisées aussi avec succès (PANDARD, 1992).

Tableau 5 Caractéristiques des biocapteurs bactériens dont le signal de toxicité est une modification de la luminescence.

Table 5 Characteristics of the main biosensors using luminescent bacteria as biocatalysts.

Réponse enregistrée	Bactéries utilisées sous forme	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse*	Durée d'exposition	Références
Espèce utilisée			μM	$\mu\text{g/l}$	
Lux CDABE/ <i>Vibrio fischeri</i> dans :		Bismuth	1 E	120 min S	
• <i>Staphylococcus aureus</i> S	Libres	Cd ²⁺	2 E 3 S	60 min E	CORBISIER <i>et al.</i> , 1993
• <i>Escherichia coli</i> E		Pb ²⁺	1 E 10 S		
<i>Escherichia coli</i>	Libres	Hg ²⁺	$5 \cdot 10^{-4}$ à 10^{-3}	40 min à 100 min	SELIFONOVA <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Immobilisées dans un gel d'alginate-glycérol	Naphtalène		21 min	
		Salicylate		24 min	HEITZER <i>et al.</i> , 1994
<i>Escherichia coli</i> protéines de stress	Libres Microplaques	Cu ²⁺		10 min	
		Acide 2,4-dichloro phénoxyacétique			VAN DYK <i>et al.</i> , 1994
		Méthanol			
		2-nitrophénol			
		4-nitrophénol			
		Phénol			
		Xylène			

Tableau 5 Suite

Paramètre ou Réponse enregistrés	Bactéries utilisées sous forme	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse*	Délai de réponse	Références
Espèce utilisée			μM	$\mu\text{g/l}$	
<i>Vibrio fischeri</i>		Laurylsulfate de sodium	$2 \cdot 10^3$ (CI_{50})	15 min	
		Toluène	$1,57 \cdot 10^4$	15 min	
« Automicrotox »		Chlorobenzène	$7,5 \cdot 10^3$	15 min	
		Manèbe	23	15 min	
	Libres	Phénol	$2,13 \cdot 10^4$	15 min	HENRIET <i>et al.</i> , 1990
	Lyophilisées	Cyanures	$1,8 \cdot 10^3$	15 min	
		Zn^{2+}	580	15 min	
		Cu^{2+}	730	15 min	
		Cd^{2+}	$7,1 \cdot 10^3$	15 min	
		Cr^{6+}	$2,23 \cdot 10^4$	30 min	
		Pb^{2+}	900	15 min	
				Durée total d'un test : 50 min	
	Fixées	Chlorure de benzalkonium	23 (CI_{50})		
	Membrane en nitrate de cellulose	(bactéricide)		Quelques minutes	LEE <i>et al.</i> , 1992
		Cr^{6+}	85 (CI_{50})		
« Photox » = RBT	Libres Lyophilisées			50	
« Biotoximeter »	Libres Bactéries de batch	PCP		$1,5 \cdot 10^3$	SCHMITZ <i>et al.</i> , 1993
« Automicrotox »	Libres	Malathion	50 (CI_{39})		
	Lyophilisées	Chrome	10^5 (CI_{51})		CHEVILLON, 1994
		Formaldéhyde	65 (CI_{74})		
		Diesel	750 (CI_{51})		

* Concentration la plus faible induisant une réponse au cas où plusieurs concentrations auraient été testées pour une même substance. Les teneurs pour les éléments minéraux sont exprimées en $\mu\text{g/l}$ ou μM du cation ou de l'anion correspondant.

* Lowest concentration inducing a response (LOEC). The concentrations of inorganic elements are expressed as $\mu\text{g/l}$ or μM of the corresponding cation or anion.

Le tableau 6 ci-contre donne les résultats obtenus avec les bioélectrodes algales répertoriés à ce jour dans la littérature.

Des organites subcellulaires support de la photosynthèse ont été utilisés également à titre expérimental comme biocatalyseur, par exemple :

- des thylakoïdes d'épinards, fixés sur une matrice d'albumine-glutaraldéhyde et sensibles à $1\mu\text{M}$ d'atrazine et $0,07\mu\text{M}$ de diuron (PURCELL *et al.*, 1990) ;
- des chloroplastes d'épinards, immobilisés de manière analogue, qui se sont révélés sensibles au plomb ($1\,000\mu\text{M PbCl}_2$), au cadmium ($1\,000\mu\text{M CdCl}_2$) et au diuron ($0,12\mu\text{M}$), avec un temps de réponse inférieur à 5 min (CARPENTIER *et al.*, 1991) ;
- des chloroplastes de *Vicia faba* immobilisés dans l'alginate, sensibles à $0,21\mu\text{M}$ d'atrazine.

Ce système est en place actuellement sur le Rhin.

4 - BIOCAPTEURS UTILISANT DES BIOMOLÉCULES

Ces systèmes sont basés sur l'affinité de certains polluants pour des molécules enzymatiques ou des anticorps. La liaison spécifique enzyme-substrat ou antigène-anticorps constituera le signal biologique dont l'intensité pourra être mesurée à l'aide de détecteurs ampérométriques, optiques ou piézoélectriques.

Ces biocapteurs se différencient donc des systèmes précédents, cellulaires ou pluricellulaires, par leur spécificité pour des polluants de catégorie donnée, voire pour un polluant déterminé. Ils seront utilisés pour la détection de substances définies au sein de milieux complexes.

La qualité des biomolécules mises en jeu conditionne les performances de ces systèmes. Il est donc impératif que les molécules utilisées présentent un degré de pureté élevé et que les procédés de fixation, par covalence ou par inclusion dans une matrice, respectent l'intégrité des sites actifs ou des sites de reconnaissance antigéniques et leur accessibilité par les ligands. Il faut aussi retenir que les facteurs tels que le pH, la force ionique du milieu, la présence de détergents et de solvants sont autant d'interférences possibles susceptibles de modifier la stéréochimie des molécules et leur affinité pour les ligands.

Biocapteurs enzymatiques

Si tous les capteurs enzymatiques reposent sur l'affinité de certains polluants pour un enzyme, la conception des systèmes peut être différente selon la nature des réactions mises en jeu. Deux situations peuvent être distinguées selon que :

- (1) le polluant est l'un des substrats naturels de l'enzyme ; l'enzyme catalyse sa transformation et ressort intact de la réaction. C'est le cas de H_2O_2 décomposé par la catalase, et des phénols oxydés par la tyrosinase ;

Tableau 6 Caractéristiques des principaux biocapteurs dont les biocatalyseurs sont des organismes photosynthétiques.

Table 6 Characteristics of the main biosensors using photosynthetic organisms as biocatalysts.

Réponse enregistrée	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse*	Durée d'exposition	Références
Espèce utilisée		μM		
Production d'O₂				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Phosphates	$8 \cdot 10^3$ à $7 \cdot 10^4$	1 min	MATSUNAGA <i>et al.</i> , 1984
	Isoproturon	100 (CI ₅₀)	30 min	
	Propanil	500 (CI ₅₀)	30 min	
	Hg ²⁺	$1,5 \cdot 10^3$ (CI ₅₀)	180 min	
<i>Chlorella vulgaris</i>	CN ⁻	$> 3,3 \cdot 10^3$ (CI ₅₀)	30 min	PANDARD et VASSEUR, 1992
	Chlortoluron	100 (CI ₆₀)	30 min	PANDARD <i>et al.</i> , 1993
	Atrazine	100 (CI ₂₇)	30 min	
	Cu ²⁺	$1,5 \cdot 10^3$ (CI ₇₀)	420 min	
Mesure combinée de la fluorescence et de l'oxygène				
<i>Chlorella reinhardtii</i> « Fluox-algae »	Atrazine	0,85		SCHMITZ <i>et al.</i> , 1993
Fluorescence spontanée				
<i>Chlorella vulgaris</i>	Simazine	12	5 min	WESTON et ROBINSON, 1991
<i>Chlorella reinhardtii</i> « Biosens-algae-toximeter »		1,9		
<i>Chlorella reinhardtii</i> « fFW-fluorometer »	Atrazine	5	5 min	SCHMITZ <i>et al.</i> , 1993
Fluorescence retardée				
<i>Chlorella reinhardtii</i> « DF-algae-toximeter »		0,4		
Transport d'électrons				
	DCMU	223		
	Chlortoluron	$2 \cdot 10^3$	10 min	RAWSON <i>et al.</i> , 1987
<i>Synechococcus</i>	Linuron	17		
<i>Synechococcus</i>	Atrazine	33		SCHMITZ <i>et al.</i> , 1993
	Atrazine	10		
	Chlortoluron	10		
	Metamifron	200		
<i>Synechococcus</i>	Diuron	2,5		
	Linuron	50	2 min	HANSEN, 1994
	Terbutylatrazine	25		
	Simazine	10		
	Crimidine	25		
	Isoproturon	25		

* Concentration la plus faible induisant une réponse au cas où plusieurs concentrations auraient été testées pour une même substance, sauf mention particulière (ex. : CI₅₀ : concentration inhibant 50 % de la croissance algale). Les teneurs pour les éléments minéraux sont exprimées en $\mu\text{g/l}$ du cation ou de l'anion correspondant.

* Lowest concentration inducing a response except CI₅₀ (concentration which inhibits 50% of the algal growth). The concentrations of inorganic elements are expressed in $\mu\text{g/l}$ or μM of the corresponding cation or anion.

(2) le polluant est un inhibiteur de l'enzyme et se lie ou réagit avec l'une des composantes du site actif ; la liaison peut résulter d'une analogie structurale avec le substrat ou d'une affinité chimique spécifique. Dans ce cas, l'enzyme est bloquée quasi irréversiblement : une régénération satisfaisante est difficile de sorte que l'ensemble des réactifs doit être renouvelé à chaque essai ; c'est le cas :

- des organophosphorés et des carbamates inhibiteurs des cholinestérases par liaison aux hydroxyles des sérines du site estérasique de l'enzyme,
- des cyanures qui par affinité avec les ions cuivriques bloquent les métalloenzymes comme la cytochrome oxydase et la tyrosinase.

Dans les deux situations on mesure une activité enzymatique après avoir ajouté dans la cellule réactionnelle les cofacteurs et les substrats nécessaires à la réaction et à la production d'une substance oxydoréductible détectable par ampérométrie : le flux d'électrons produit ou capté par l'électrode, selon le potentiel choisi et les modalités expérimentales, permettra de quantifier l'activité enzymatique et d'en déduire indirectement soit la concentration des substrats dans le cas (1), soit celle des inhibiteurs dans le cas (2).

La plupart des bioélectrodes enzymatiques rentrent dans la catégorie (2). Elles sont dotées d'une bonne sensibilité pour certains dérivés comme les organophosphorés décelés à des concentrations de l'ordre de $1 \mu\text{M}$ (*tabl. 7*), voire $10^{-4} \mu\text{M}$ dans le cas du paraoxon (MARTY *et al.*, 1993 ; 1995). Toutefois, le faible degré d'autonomie de ces systèmes freine leur développement et leur utilisation en routine. L'évolution va naturellement vers les systèmes les plus simples : c'est ainsi que les systèmes requérant plusieurs enzymes agissant séquentiellement ont cédé la place aux systèmes à un seul enzyme. L'idéal est représenté par les capteurs où l'enzyme est intégré au matériau composite de l'électrode : ils peuvent donc fonctionner réellement en continu sans nécessiter de changement de membrane entre deux mesures successives. Les électrodes à tyrosinase répondent à ces critères : ces systèmes ont été proposés récemment par COSNIER et INNOCENT (1992), BESOMBES *et al.* (1994, 1995) et WANG *et al.* (1994) pour la détection des substrats phénoliques. La figure 4 schématise le principe des différents capteurs fonctionnant avec plusieurs (a) ou un seul enzyme (b).

Biocapteurs immunologiques

Le réactif biologique est constitué des anticorps spécifiques dirigés contre le polluant recherché. Ces anticorps sont préparés par procédés biotechnologiques ; leur degré de spécificité vérifié préalablement conditionnera les performances du capteur.

La présence du polluant dans le milieu analysé traduite par sa fixation sur l'anticorps pourra être suivie directement si les anticorps sont fixés sur une membrane piézoélectrique.

A coté des détecteurs piézoélectriques il existe des transducteurs optiques et ampérométriques. La liaison à l'anticorps est mesurée indirectement à l'aide d'un traceur facile à analyser quantitativement. L'analyse en système compétitif nécessite deux réactifs : l'anticorps spécifique et la substance antigénique analogue au polluant recherché mais marquée par le traceur ; la

Tableau 7 Caractéristiques des bioélectrodes enzymatiques utilisant des détecteurs électrochimiques ampérométriques.

Table 7 Characteristics of enzymatic biosensors using amperometric transducers.

Réactifs ajoutés au milieu à analyser	Electrode		Substance détectée Seuils	Références
	Enzyme immobilisé ou incorporé	Réaction à l'électrode		
système à 2 enzymes	butyrylcholine butyrylcholinestérase ^(a)	Pt/650 mV $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	Organophosphorés Paraoxon 0,2 µg/l	BERNABEI <i>et al.</i> , 1993
	aldéhyde déshydrogénase ^(a) diaphorase	Pt/81 mV $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 \rightarrow \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 + \text{K}^+ + \text{e}^-$	Carbamates Manèbe 50 µg/l	MARTY <i>et al.</i> , 1993
système à 1 enzyme	acétylcholine acétylcholinestérase ^(a)	Pt/410 mV thiocholine réduite $\rightarrow$ thiocholine oxydée	Parathion méthyl 10 ² µM Fonofos 1 µM Monocrotopos 1 µM Paraoxon 10 ⁻⁴ µM Aldicarb 10 ⁻² µM Carbofuran 10 ⁻⁴ µM	MARTY <i>et al.</i> , 1993
	acétylthiocholine butyrylthiocholine acétylcholinestérase ^(a) butyrylcholinestérase		Carbaryl 8 µM	SKLADAL <i>et al.</i> , 1994
enzyme incorporé	tyrosinase ^(b)	graphite quinone oxydée $\rightarrow$ quinone réduite -200 mV	p-crésol 10 µM p-chlorophénol 10 µM Phénol 2 µM Catéchol 10 µM	WANG <i>et al.</i> , 1994
au compo- site	tyrosinase ^(a)	quinone oxydée $\rightarrow$ quinone réduite	Cyanide 0,5 µM Atrazine 2 µM 3,5-dichlorophénol 5 µM chloroisopropyl- phenylcarbamate 1 µM	BESOMBES, 1994

(a) enzyme inhibé par le polluant recherché. (b) le polluant recherché est le substrat de l'enzyme, incorporé dans le composite de l'électrode.

Les teneurs pour les éléments minéraux sont exprimées en µg/l ou µM du cation ou de l'anion correspondant.

The concentrations of inorganic elements are expressed as µg/l or µM of the corresponding cation or anion.

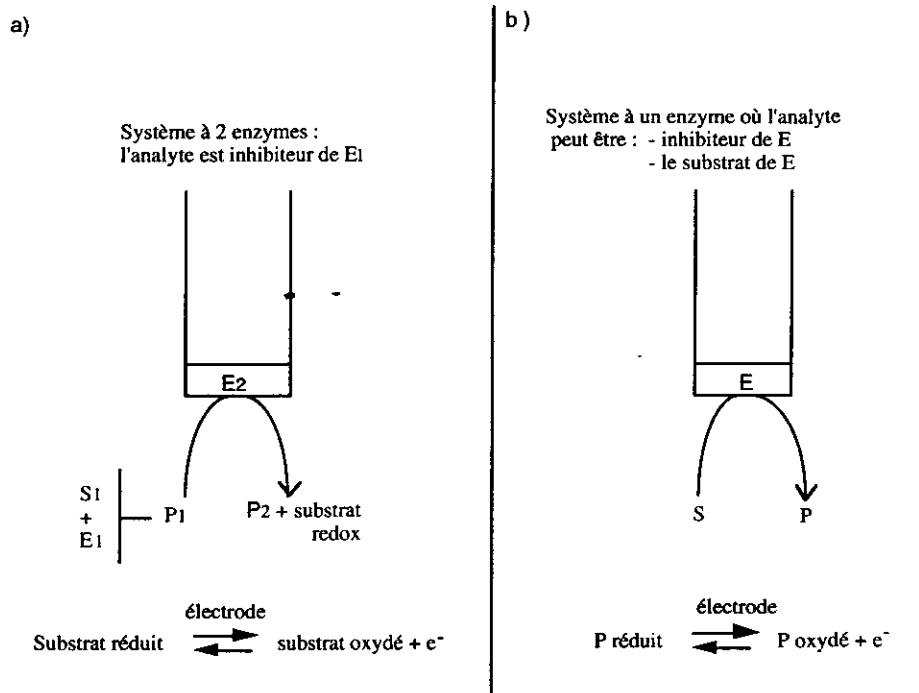


Figure 4 Principe des bioélectrodes à enzymes mesurant une activité enzymatique pour la transformation d'un substrat S en produit P. La réaction produit une substance oxydoréductrice mesurée à l'aide d'un détecteur ampérométrique.

a) système à deux enzymes, où E_1 est la cible spécifique du polluant recherché.

b) système à un enzyme immobilisé au contact de l'électrode (polluant inhibiteur de E_1) ou incorporé au composite du détecteur (le polluant est le substrat de E).

Principle of enzymatic biosensors. The enzyme activity is followed by the catalytic production of P from a substrate S. A redox substance is produced and measured by an amperometric biosensor.

a) system with 2 enzymes: E_1 is the specific target of the searched pollutant(s).

b) system with 1 enzyme:

- E is immobilized on the transducer (the pollutant is inhibitor of E),

- E is incorporated on the composite of the transducer (the pollutant is a substrate of E).

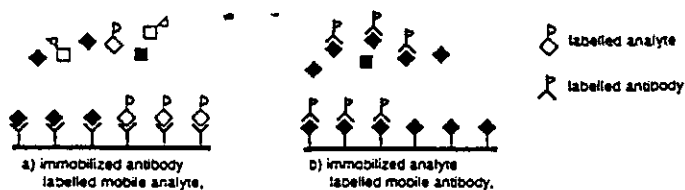
substance marquée entrera en compétition avec le polluant pour les sites de liaison à l'anticorps. La quantité de traceur fixée aux anticorps sera inversement proportionnelle à la concentration du polluant dans le milieu (fig. 5).

Ces systèmes ont été développés pour la détection des pesticides dans les eaux, des triazines en particulier. Leur sensibilité est élevée (tabl. 8) : la détection est de l'ordre de la fraction du microgramme par litre pour certains dérivés comme l'atrazine (KRÄMER et SCHMID, 1991 ; GUILBAULT et al., 1992).

1) occupancy of antibody binding sites by the analyte



2) competitive assays (limiting antibody concentration)



3) non-competitive assays (antibody excess)

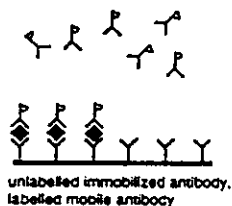


Figure 5

Principe de base des immunoessais. 1) La liaison analyte-anticorps reflète la concentration en analyte dans l'échantillon à analyser. Un « traceur » est nécessaire pour mettre en évidence cette liaison. 2) Essais compétitifs où sont quantifiés les sites non occupés par l'analyte. 3) Essais non compétitifs quantifiant le nombre de sites occupés (HOCK *et al.*, 1994).

Basic principle of immunoassays: 1) The occupancy of Ab-binding sites reflects the analyte concentration in the sample. A « tracer » is required to trace the occupancy. 2) Competitive assays rely on the measurement of residual, unoccupied binding sites and use limiting Ab concentrations. 3) Noncompetitive assays measure the occupied binding sites and use excess concentrations of Ab.

5 – SENSIBILITÉ, DOMAINES D'APPLICATION ET PERFORMANCES DES DIFFÉRENTS BIOCAPTEURS

D'après les données publiées jusqu'ici, il apparaît que les biocapteurs les plus sensibles sont les capteurs immunochimiques. Leur développement ne concerne encore que quelques types de contaminants hydriques et mériterait d'être étendu à une gamme plus importante de polluants.

Tableau 8 Caractéristiques de biocapteurs dont le biocatalyseur est un anticorps ou un antigène.

Table 8 Characteristics of the main biosensors using an antibody or an antigen as biocatalyst.

Anticorps	Substance(s) étudiée(s)	Concentration effective la plus basse*	Délai de réponse	Nombre de réutilisations possibles	Références
Type de détection		µg/l			
Antigène fixé sur cristal					
Piézoelectrique compétitif	2,4-D	1	10 min		MINUNNI <i>et al.</i> , 1994
Anticorps fixé sur cristal					
Piézoelectrique	Atrazine	0,03 à 100			
	Méthyl paraoxon	100			
	Carbofuran	4 · 10 ³			
	Propazine	0,03 à 100	15 min	8 à 9	GUILBAULT <i>et al.</i> , 1992
	Prométhrine	0,1			
	Simazine	0,1			
	Ethidimuron	100			
	2,4-D	10			
Anticorps de l'atrazine fixé sur membrane	Atrazine	0,02	15 min	1	KRÄMER et SCHMID, 1991
Ampérométrique					
Système compétitif utilisant l'atrazine marquée à la peroxydase					

* Concentration la plus faible induisant une réponse au cas où plusieurs concentrations auraient été testées pour une même substance. Les teneurs pour les éléments minéraux sont exprimées en µg/l du cation ou de l'anion correspondant.

* Lowest concentration inducing a response (LOEC). The concentrations of inorganic elements are expressed in µg/l or µM of the corresponding cation or anion.

Dans l'ensemble, le classement des principaux biocapteurs par ordre de *sensibilité* décroissante, sans tenir compte de leur spécificité peut s'établir comme suit :

- biocapteurs à anticorps antitriazines pouvant détecter des concentrations en triazines de l'ordre du microgramme par litre (KRÄMER et SCHMIDT, 1991 ; GUILBAULT *et al.*, 1992) ;

- bioélectrodes algales basées sur les mesures de fluorescence ; les performances sont moins élevées avec des détecteurs électrochimiques, type électrode à pH ou à oxygène ;

- électrodes enzymatiques à acétylcholinestérase qui permettent la détection des organophosphorés et des carbamates à des concentrations de 10 à 100 µg/l et plus (MARTY *et al.*, 1993) ;

- capteurs utilisant les bivalves dont les capacités de détection se situent à des concentrations de 100 µg/l et plus, sauf sensibilité plus élevée dans le cas spécifique des dérivés organiques de l'étain (oxyde de tributylétain, TBTO) et du cuivre (KRÄMER *et al.*, 1989) ;

- biocapteurs mettant en jeu les poissons dont le seuil de détection est assez variable et se situe entre 10 et 1000 µg/l en général. La sensibilité

diffère selon les conditions expérimentales, et il est difficile de dire si le paramètre contrôlé ou l'espèce utilisée est le facteur le plus déterminant : lors d'études *in situ*, une sensibilité élevée a été obtenue en étudiant le rhéotactisme de *Leuciscus idus* exposés à des micropolluants organiques (BOTTERWEG *et al.*, 1989) ; dans d'autres études, une bonne sensibilité a été observée en présence de métaux ;

– biocapteurs bactériens qui s'appliqueraient plus au contrôle des effluents hydriques dont le niveau de contamination, nettement plus élevé que celui des eaux de surface, peut atteindre et dépasser 1 mg/l. La sensibilité de ces capteurs dépend non seulement de la conception du système, du type de détecteur utilisé mais aussi du réactif bactérien : les boues activées en suspension dans le milieu liquide avec un contrôle de l'activité respiratoire basé sur des mesures de pression d'O₂ ou de CO₂ donnent des résultats nettement moins intéressants que des membranes bactériennes constituées de souches bactériennes pures immobilisées au niveau d'un détecteur électrochimique pour le contrôle du même paramètre.

On peut être tenté de comparer les seuils de réponse des biocapteurs aux résultats des essais de toxicité létale (CL₅₀, CI₅₀) ou chronique (NOEC long terme) sur poissons et daphnies, habituellement utilisés en écotoxicologie aquatique. Ces données figurent dans les tableaux 1 et 2. La comparaison montre que le seuil de réponse des biocapteurs utilisant des poissons et analysant leur comportement, correspond en général à des valeurs inférieures aux concentrations létales 50 évaluées après 96 heures d'exposition, en système statique, et en conditions de température et de milieu standardisées. Ces résultats soulignent la sensibilité satisfaisante des biocapteurs s'ils sont comparés aux essais de toxicité aiguë conventionnels ; ils sous-entendent aussi que les critères de comportement lors d'une exposition courte ont une réelle signification en terme de toxicité et de viabilité.

La comparaison à des valeurs de CL_{50-96h} est envisageable dans le cas d'effluents complexes dont la charge en polluants peut entraîner des effets de toxicité aiguë. Cependant, dans le cadre d'une application au contrôle des eaux de surface et des eaux souterraines où des effets de toxicité à long terme sont plutôt attendus compte tenu d'une contamination beaucoup plus faible, la comparaison à des valeurs de NOEC chronique serait plus justifiée. Ces valeurs de NOEC chronique manquent dans la plupart des cas pour faire des comparaisons valables.

Dans le cadre du biomonitoring, il est indispensable de bien connaître la sensibilité du biocapteur qui peut être simplement utilisé comme un détecteur d'une augmentation du taux des contaminants, sans connaissance des implications biologiques du signal. Il faut surtout que la sensibilité du capteur soit appropriée aux milieux à analyser et en rapport avec le degré de contamination probable. La sensibilité du système déterminera donc son domaine d'application.

La figure 6 situe l'ordre de sensibilité relative des différents systèmes en cours de développement par rapport aux niveaux de contamination des eaux et des effluents à contrôler. Les systèmes particulièrement sensibles seront utilisés pour la recherche des micropolluants traces et pourront donc être appliqués au contrôle des eaux souterraines et des eaux de surface. Les

systèmes dotés d'une sensibilité plus faible serviront plutôt de systèmes d'alerte à la pollution aiguë des rejets et des effluents hydriques, ceux-ci pouvant présenter un risque pour l'environnement aquatique en cas de défaillance des traitements d'épuration.

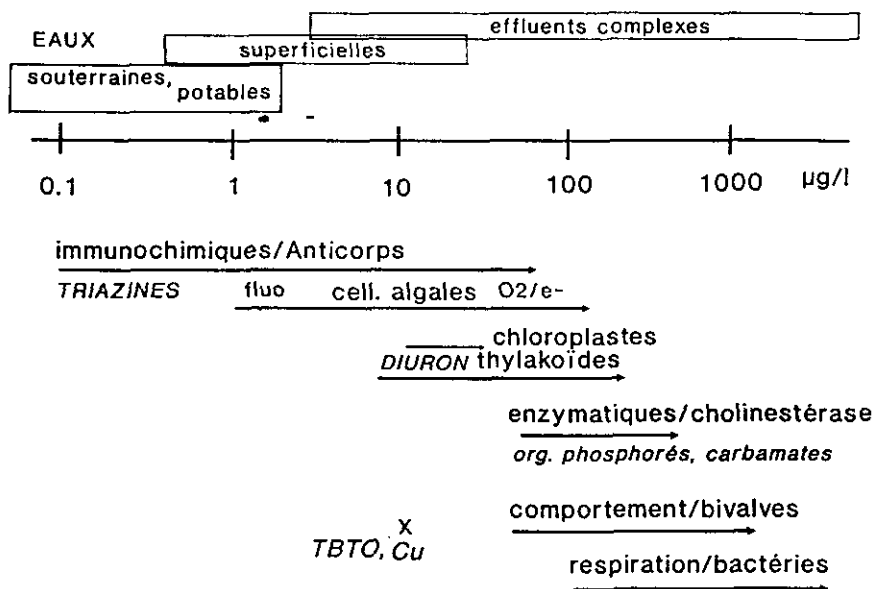


Figure 6 Comparaison des niveaux de sensibilité des biocapteurs et applications au contrôle des eaux et des effluents.

Comparison of the sensitivity of biosensors applied to water quality control.

Lorsque la nature des polluants recherchés est connue, un seul biocapteur peut suffire à la détection. Si au contraire on ne connaît pas la nature des contaminants éventuels, il faut pouvoir détecter une large gamme de polluants : il apparaît d'ores et déjà que, dans ce cas, l'association de plusieurs biocapteurs sensibles et complémentaires de par leur spectre de détection sera nécessaire. La conception de batteries de biocapteurs et de biocapteurs multiples immunologiques ou immunoenzymatiques est envisagée actuellement.

D'autres qualités que la sensibilité sont requises pour une application *in situ*, en continu des biocapteurs en station automatisée. Les critères de *temps de réponse*, *autonomie*, *convivialité*, *exigences de maintenance*, *périodes d'inactivité liée à l'auto-entretien*, *incidents*, *facilité de traitement des résultats*, *encombrement* et *coûts d'achat de l'appareil*, interviennent également pour juger des performances des biocapteurs. L'ensemble de ces critères a été évalué lors d'une étude réalisée en Allemagne par le Ministère Fédéral de la Recherche et de la Technologie et l'Agence Fédérale de l'Environnement,

dans le cadre du Plan d'Action Rhin & Main. Cette étude portait sur près de 22 biocapteurs qui ont été testés pour leurs performances et leur applicabilité en routine, de 1990 à 1993 ; ces systèmes utilisaient des microorganismes (bactéries, algues), des invertébrés (microcrustacés, bivalves), des vertébrés (poissons). Ces essais ont souligné les performances des biocapteurs à microalgues, particulièrement sensibles avec un détecteur à fluorescence, ainsi que ceux basés sur l'étude de la mobilité des daphnies (SCHMITZ *et al.*, 1993).

Il faut rappeler l'importance de l'étape de *validation* d'un biocapteur : (i) sur pilote de laboratoire d'abord, à l'aide de polluants de concentration connue, afin de déterminer le champ d'application, le domaine de sensibilité du biocapteur et les interférences possibles comme celles de la température, du débit, de l'oxygène, du pH, des matières en suspension, de la lumière... ; (ii) sur sites ensuite, afin d'identifier les situations générant des fausses alarmes, améliorer en conséquence la conception du capteur et donc garantir la fiabilité du système.

Il est possible que parmi les multiples biocapteurs à l'étude actuellement au laboratoire ou sur pilote, peu d'entre eux franchiront l'épreuve de la validation *in situ*, laquelle est déterminante pour juger des performances du système en fonctionnement réel.

6 – CONCLUSION

Si les biocapteurs immunochimiques doivent encore faire leurs preuves sur le terrain, le développement des bioélectrodes algales et de certains capteurs utilisant les vertébrés et invertébrés aquatiques est par contre à un stade plus avancé de la validation en milieu aquatique. Les bioélectrodes algales présentent l'intérêt de détecter, avec une bonne sensibilité, les substances dotées d'une toxicité spécifique pour les espèces végétales, étant donné leur principe basé sur l'étude de l'activité photosynthétique. Les biocapteurs cellulaires ou animaux ont un champ d'investigation assez vaste, compte tenu de leur caractère aspécifique leur permettant de détecter une toxicité globale. Leur sensibilité les oriente pour le contrôle des eaux de surface contaminées et des effluents industriels. Les biocapteurs bactériens à boues activées sont robustes mais aussi moins sensibles. Leur domaine d'utilisation est celui du contrôle des effluents contaminés et la prévention des accidents de pollution aiguë.

Les biocapteurs, par leur fonction même, sont des outils d'avenir au développement prometteur. Ils répondent à un besoin dans le cadre du biomonitoring environnemental ; d'autant que les réglementations européennes se mettent en place en ce qui concerne l'environnement aquatique et en particulier les effluents industriels.

Certaines grandes sociétés ont bien compris le parti qu'elles pouvaient tirer d'un contrôle en continu : les Sociétés de traitement des eaux en particulier, qui utilisent les biocapteurs pour le contrôle des prises d'eau servant à la potabilisation. Le Ministère de l'Environnement, l'ADEME, les Agences de l'Eau manifestent également un net intérêt pour les biocapteurs : ces organismes ont été les premiers en France à financer des recherches pour leur développement et leur validation.

Il existe un enjeu commercial énorme pour les biocapteurs environnementaux. Quelques entreprises françaises ont déjà investi dans ce domaine. Mais il reste aussi beaucoup à faire pour mettre au point ces outils de conception nouvelle. Les efforts conjugués des scientifiques, des ingénieurs, et des entreprises industrielles sont nécessaires pour que cette nouvelle technologie trouve son plein développement.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CI₅₀ = EC₅₀ : concentration inhibant 50 % du paramètre étudié.

CL₅₀ : concentration entraînant 50 % de mortalité.

DBO : demande biologique en oxygène.

2,4-D : 2,4-dinitrophénol.

DCMU : dichlorophénylméthylurée.

3,5-DCP : 3,5-dichlorophénol.

his : histidine.

NOEC : première concentration n'induisant pas de réponse (Non Observable Effect Concentration).

PVA : polyvinylalcool.

TBTO : tri-n-butyltinnoxyde.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier de l'ADEME/Paris et le SERES/Aix-en-Provence. Nous tenons à remercier Monsieur Denis SAVANNE de l'ADEME et Madame PÉTILLOT du SERES pour le vif intérêt envers cette nouvelle technologie et leur confiance manifestée à l'occasion de cette étude. Nos remerciements vont aussi à Madame Carole LEGUILLE et aux autres collaborateurs qui nous ont aidés à préparer cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AKBERALI H.B., BLACK J.E., 1980-81. Behavioural responses of the bivalve *Scrobicularia plana* (da costa) subjected to short-term copper (Cu II) concentrations. *Marine Environmental Research*, 4, 97-107.
- ATCHISON G.J., HENRY M.G., SANDHEINRICH M.B., 1987. Effects of metals on fish behavior: a review. *Environmental Biology of Fishes*, 18 (1), 11-25.
- BALDWIN I.G., HARMAN M.M., NEVILLE D.A., 1994. Performance characteristics of a fish monitor for detection of toxic substances-I. Laboratory trials. *Water Research*, 28, 2191-2199.
- BALDWIN I.G., KRAMER K.J.M., 1994. Biological early warning systems (BEWS) in « *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries* », KRAMER K.J.M. (Eds), 1-23.
- BERNABEI M., CHIAVARINI S., CREMISINI C., PALLESCI G., 1993. Anticholinesterase activity measurement by a choline biosensor: application in water analysis. *Biosensors & Bioelectronics*, 8, 265-271.
- BESOMBES J-L, COSNIER S., LABBE P., REVERDY G., 1994. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, atrazine, chlorophenols and carbamate pesticides. Workshop on « *Biosensors and biological techniques in environmental analysis* », Paris 12-14 septembre.
- BESOMBES J-L, COSNIER S., LABBE P., REVERDY G., 1995. A biosensor as warning device for the detection of cyanide, atrazine, chlorophenols and carbamate pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 311, 255-263.
- BOTTERWEG J., VAN DER GUCHTE C., VAN BREEMEN L.W.C.A., 1989. Bio-alarm systems: a supplement to traditional monitoring of water quality. *H₂O*, 22, 778-794.
- BUND/LANDER-PROJEKTGRUPPE « *Wirkungstests Rhein* », 1994. Kontinuierliche Biotestverfahren zur Überwachung des Rheins-Zusammenfassung, empfehlungen und darstellung der Testverfahren. *Rapport d'activité*, Berlin.
- CAIRNS J.C., VAN DER SCHALIE H., 1980. Review paper. Biological monitoring part I - Early warning systems. *Water Research*, 14, 1179-1196.
- CAMPANELLA L., FAVERO G., TOMASSETTI M., 1994. Un nuovo biosensore a lieviti immobilizzati per misure di tossicità integrale. *Inquinamento*, 7, 46-59.
- CARPENTIER R., LORANGER C., CHARTRAND J., PURCELL M., 1991. Photoelectrochemical cell containing chloroplast membranes as a biosensor for phytotoxicity measurements. *Analytica Chimica Acta*, 249, 55-60.
- CHEVILLON C., 1994. Auto-microtox, surveillance continue de toxicité des eaux par bactéries bioluminescentes : principes et résultats. Colloque européen sur le « *Recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux* », Nancy 13-14 octobre.
- CORBISIER P., JI G., NUYTS G., MERGEAY M., SILVER S., 1993. luxAB gene fusions with arsenic and cadmium resistance operators of *Staphylococcus aureus* pl258. *FEMS Microbiology Letters*, 110, 231-238.
- COSNIER S., INNOCENT C., 1992. A novel biosensor elaboration by electropolymerization of an adsorbed amphiphilic pyrrolytyrosinase enzyme layer. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 328, 361-366.
- DIAMOND J.M., PARSON M.J., GRUBER D., 1990. Rapid detection of sublethal toxicity using fish ventilatory behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 3-11.
- DORWARD E.J., BARISAS G., 1984. Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. *Environmental Science & Technology*, 18, 967-972.
- EVANS J.P., WALLWORK J.P., 1988. The WRC fish monitor and other biomonitoring methods in « *Automated Biomonitoring* ». Gruber & Diamond (eds), 75-90.
- GAMATI S., LUONG J.H.T., MULCHANDANI A., 1991. A microbial biosensor for Trimethylamine using *Pseudomonas aminovorans* cells. *Biosensors & Bioelectronics*, 6, 125-131.
- GARDNER H.S., VAN DER SCHALIE W.H., WOLFE M.J., FINCH R.A., 1990. New methods for on-site biological monitoring of effluent water quality in « *In situ*

- Evaluations of Biological Hazards of Environmental Pollutants*, Sandhu et al. (Eds), 61-69.
- GELLER W., 1984. A toxicity warning monitor using the weakly electric fish, *Gnathone-mus petersi*. *Water Research*, 10, 1285-1290.
- GRUBER D., CAIRNS J.JR., 1981. Industrial effluent monitoring incorporating a recent automated fish biomonitoring system. *Water, Air and Soil Pollution*, 15, 471-481.
- GUILBAULT G.G., HOCK B., SCHMID R., 1992. A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water. *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 411-419.
- HAM K.D., PETERSON M.J., 1994. Effect of fluctuating low-level chlorine concentrations on valve-movement behavior of the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 493-498.
- HANSEN D., 1994. On-line biosensors for the monitoring of water pollutants: laboratory and field experiments. Workshop on « *Biosensors and biological techniques in environmental analysis* », Paris 12-14 septembre.
- HATTON E., CRATHORNE B., WHALLEY P., 1994. Suivi de la qualité de l'eau au moyen d'organismes vivants unicellulaires. Colloque européen sur le « *Recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux* », Nancy 13-14 octobre.
- HEITZER A., MALACHOWSKY K., THONNARD J.E., BIENKOWSKI P.R., WHITE D.C., SAYLER G.S., 1994. Optical biosensor for environmental on-line monitoring of naphthalene and salicylate bioavailability with an immobilized bioluminescent catabolic reporter bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1487-1494.
- HENDRIKS A.J., STOUTEN M.D.A., 1993. Monitoring the response of microcontaminants by dynamic *Daphnia magna* and *Leuciscus idus* assays in the Rhine delta: biological early warning as a useful supplement. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 26, 265-279.
- HENRIET C., LEVI Y., COUTANT J-P., 1990. Automatisation d'un test de toxicité aiguë utilisant des bactéries luminescentes. *Journal Français d'Hydrologie*, 17, 153-162.
- HIKUMA M., MATSUOKA H., TAKEDA M., TONOOKA Y., 1993. Microbial electrode for nitrate based on *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology Techniques*, 7, 231-236.
- HOCK B., GIERSCHE T., DANKWARDT A., KRAMER K., PULLEN S., 1994. Toxicity assessment and on-line monitoring: immunoassays. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 9, 243-262.
- JENNER H.A., NOPPERT F., SIKKING T., 1989. A new system for the detection of valve-movement response of bivalves. *Kema Scientific & Technical Reports*, 7, 91-98.
- KARUBE I., NAKAHARA T., MATSUNAGA T., SUZUKI S., 1982. *Salmonella* electrode for screening mutagens. *Analytical Chemistry*, 54, 1725-1727.
- KAY A.N., LEWIS J.W., 1994. Monitoring chemical changes in fresh water using electric fish. Colloque européen sur le « *Recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux* », Nancy 13-14 octobre.
- KOBOS R.K., RICE D.J., FLOURNOY D.S., 1979. Bacterial membrane electrode for the determination of nitrate. *Analytical Chemistry*, 51, 1122-1125.
- KONG Z., VANROLLEGHEM P.A., VERSTRAETE W., 1993. An activated sludge-based biosensor for rapid IC₅₀ estimation and on-line toxicity monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*, 8, 49-58.
- KRAMER K.J.M., BOTTERWEG J., 1991. Aquatic biological early warning systems: an overview in « *Bioindicators and environmental management* », JEFFREY D.W., MADDEN B. (Eds), 95-126.
- KRAMER K.J.M., JENNER H.A., DE ZWART D., 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, 188/189, 433-443.
- KRAMER P., SCHMID R., 1991. Flow injection immunoanalysis (FIIA) – a new immunoassay format for the determination of pesticides in water. *Biosensors & Bioelectronics*, 6, 239-243.
- KRESS C., NACHTIGALL W., 1989. Grundlagen zur Schadstoffüberwachung von Fließwässern über die Erfassung von Verhaltensparametern stetig schwimmen-

- der Fische. *Zeitschrift für Wasser- und Abwasser Forschung*, 22, 99-107.
- LEE S., SODE K., NAKANISHI K., MARTY J-L, TAMIYA E., KARUBE I., 1992. A novel microbial sensor using luminous bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 273-277.
- LEWIS J.W., CAMPBELL P.R., TOMS L.P., 1990. Microcomputer-based monitoring of the effect of phenol on electric organ activity in the mormyrid fish *Gnathonemus petersii*. *Environmental Technology*, 11, 571-584.
- LI F., TAN T.C., 1994. Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a poly (4-vinylpyridine)-coated microbial sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 445-455.
- MARTY J-L, MIONETTO N., NOGUER T., ORTEGA F., ROUX C., 1993. Enzyme sensors for the detection of pesticides. *Biosensors & Bioelectronics*, 8, 273-280.
- MARTY J-L, MIONETTO N., LACORTE S., BARCELO D., 1995. Validation of an enzymatic biosensor with various liquid chromatographic techniques for determining organophosphorus pesticides and carbaryl in freeze-dried waters. *Analytica Chimica Acta*, 311, 265-271.
- MATSUNAGA T., SUZUKI T., TOMODA R., 1984. Photomicrobial sensors for selective determination of phosphate. *Enzyme Microbiology and Technology*, 6, 355-358.
- MINUNNI M., SKLADAL P., MASCINI M., 1994. A piezoelectric quartz crystal biosensor as a direct affinity sensor. *Analytical Letters*, 27, 1475-1487.
- MOUABAD A., PIHAN J-C., 1993. Le test comportemental de *Dreissena polymorpha* : un outil biologique de prévision et d'évaluation de la toxicité en milieu d'eau douce. *Hydroécologie Appliquée*, Tome 5, 1, 97-109.
- MUNKITTRICK K.R., POWER E.A., SERGY G.A., 1991. The relative sensitivity of Microtox®, daphnid, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality tests. *Environmental Toxicology and Water Quality: an International Journal*, 6, 35-63.
- NEUJAHN H.Y., 1984. Biosensors for environmental control. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, 1, 167-186.
- PANDARD P., 1992. Etude de biocapteurs à algues immobilisées pour le contrôle des milieux hydriques. Thèse de doctorat de l'Université de Metz. 169 pages.
- PANDARD P., VASSEUR P., 1992. Biocapteurs pour le contrôle de la toxicité des eaux : application des bioélectrodes algales. *Rev. Sci. Eau*, 5, 445-461.
- PANDARD P., VASSEUR P., RAWSON D.M., 1993. Comparison of two types of sensors using eukariotic algae to monitor pollution of aquatic systems. *Water Research*, 27, 427-431.
- PETRY H-P., 1982. Der Motilitätstest ein Frühwarnsystem zur biologischen Gewässerkontrolle. *Zentralblatt für Bakteriologie I. Abt. Originale. B, Hygiene, Krankenhaus-hygiene, Betriebshygiene, Präventive Medizin B* 176, 391-412.
- PURCELL M., CARPENTIER R., BELANGER D., FORTIER G., 1990. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. *Biotechnology Techniques*, 4, 363-368.
- RAWSON D.M., ROGERSON J., 1994. The development of biosensors for monitoring aquatic environments. Colloque européen sur le « *Recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux* », Nancy 13-14 octobre.
- RAWSON D.M., WILLMER A.J., CARDOSI M.F., 1987. The development of whole cell biosensors for on-line screening of herbicide pollution of surface water. *Toxicity Assessment: an International Quarterly*, 2, 325-340.
- SCHMITZ P., KREBS F., IRMER U., 1993. Development, testing and implementation of automated biotests for the monitoring of the river rhine, demonstrated by bacteria and algae tests. *Water Science and Technology*, 1-8.
- SELIFONOVA O., BURLAGE R., BARKAY T., 1993. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3083-3090.
- SKLADAL P., PAVLIK M., FIALA M., 1994. Pesticide biosensor based on coimmobilized acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Analytical Letters*, 27, 29-40.
- SLOOFF W., DE ZWART D., MARQUENIE J-M., 1983. Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 30, 400-405.

- TAN H-M, CHEONG S-P, TAN T-C., 1994. An amperometric benzene sensor using whole cell *Pseudomonas putida* ML2. *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 1-8.
- TEUSCHER M, GROSSER J., 1994. Experiences with on-line toxicity analyzers in municipal and industrial waste water treatment plants. Colloque européen sur le « *Recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux* », Nancy 13-14 octobre.
- THOMAS M., FLORION A., CHRETIEN D., TERVER D., 1994. Comparaison des performances de deux biodétecteurs appliqués à la surveillance de la qualité des eaux. Colloque européen sur le « *Recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux* », Nancy 13-14 octobre.
- VAN DYK T.K., MAJARIAN W.R., KONSTANTINOV K.B., YOUNG R.M., DHURJATI P.S., LaROSSA R.A., 1994. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat shock gene-bioluminescence gene fusions. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 1414-1420.
- VAN HOOFF F., SLUYTS H., CORNET A., BERCKMANS D., 1994. Experiences with biological early warning systems of flemish surface waters. Colloque européen sur le « *Recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux* », Nancy 13-14 octobre.
- VANROLLEGHEM P.A., KONG Z., ROMBOUTS G., VERSTRAETE W., 1994. An on-line respirographic biosensor for the characterization of load toxicity of wastewaters. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 59, 321-333.
- WALLER W.T., CAIRNS J.C., 1972. The use of fish movement patterns to monitor zinc in water. *Water Research*, 6, 257-269.
- WANG J., FANG L., LOPEZ D., 1994. Amperometric biosensor for phenols based on a tyrosinase-graphite-epoxy biocomposite. *Analyst*, 119, 455-458.
- WESTON L.H., ROBINSON P.K., 1991. Detection and quantification of triazine herbicides using algal cell fluorescence. *Biotechnology Techniques*, 5, 327-330.