

UNIVERSITE DU QUEBEC

THESE

présentée

à

L'INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (EAU)

comme exigence partielle

de la

maîtrise ès Sciences (eau)

par

Jacques Reed

B. Sp. Sc. (Biologie)

"COMPORTEMENT DE L'ECOSYSTEME DE LA  
RHIZOSPHERE DE LEMNA MINOR EN LABORATOIRE"

## REMERCIEMENTS

L'auteur tient à remercier les personnes et organismes suivants qui ont, par leur contribution respective, permis la réalisation de cette étude: Monsieur A. Rousseau, directeur de thèse, qui a su mettre à la disposition de l'auteur ses connaissances et son expérience afin d'éviter les pertes d'énergie propres aux jeunes scientifiques; Messieurs J.L. Sas-seville et R. Van Coillie qui ont fourni des conseils éclairés et un support scientifique expérimenté; Messieurs R.A. Coler et H.B. Gunner qui, lors de ma visite à l'Université du Massachussetts, m'ont fait de précieuses suggestions et vivement encouragé; Monsieur B. Veilleux qui, dans l'ombre, a ajouté une contribution technique hautement appréciée; l'INRS qui a supporté financièrement cette étude durant l'été 1973; les ministères de la Voirie et des Richesses Naturelles du Québec pour leur contribution matérielle de même que le Ministère de l'Education du Québec pour la bourse d'études qu'il m'a accordée.

Je tiens également à remercier particulièrement mon épouse qui, par son support moral, a facilité ma tâche durant ces années d'études.

## TABLE DES MATIERES

|  | Page |
|--|------|
| REMERCIEMENTS.....   | i    |
| TABLE DES MATIERES.....  | ii   |
| LISTE DES TABLEAUX.....  | v    |
| LISTE DES FIGURES.....   | vi   |
| LISTE DES ABREVIATIONS.....  | vii  |
| RESUME.....  | viii |
| INTRODUCTION.....  | 1    |
| 1. DONNEES INITIALES.....  | 3    |
| 1.1 Utilisation d'écosystèmes et de <u>Lemna minor</u> .....               | 3    |
| 1.2 Paramètres choisis pour l'étude.....                                   | 5    |
| 1.3 Milieu de culture.....   | 8    |
| 1.4 Facteurs influençant la croissance de <u>Lemna minor</u> .....         | 9    |
| 1.4.1 Nutrition minérale et oligo-éléments.....                            | 11   |
| 1.4.2 Lumière et photosynthèse.....  | 13   |
| 1.4.3 Température.....   | 14   |
| 1.4.4 Respiration.....   | 14   |
| 1.5 Introduction d'un stress.....  | 15   |
| 1.5.1 Composition du stress choisi.....                                    | 15   |
| 1.5.2 Voies d'intervention du stress choisi.....                           | 17   |
| 1.5.3 Mécanismes de toxicité du stress choisi.....                         | 18   |
| 2. MATERIEL ET METHODES.....   | 21   |
| 2.1 Mise au point de l'écosystème.....                                     | 21   |
| 2.2 Détermination du contenu en chlorophylle chez <u>Lemna minor</u> ..... | 22   |

|   | Page |
|---|------|
| 2.2.1 Extraction de la chlorophylle.....  | 22   |
| 2.2.2 Analyse.....  | 22   |
| 2.3 L'écosystème.....   | 23   |
| 2.3.1 Description.....  | 23   |
| 2.3.2 Observations préliminaires.....   | 24   |
| 2.4 Mesure du taux de synthèse des acides ribonucléiques..  | 25   |
| 2.4.1 Traitement préliminaire.....  | 26   |
| 2.4.2 Extraction.....   | 26   |
| 2.4.3 Dosage.....   | 27   |
| 2.4.4 Dosage de la radioactivité.....   | 28   |
| 2.4.5 Obtention des résultats.....  | 28   |
| 2.5 Processus expérimental.....   | 31   |
| 2.5.1 Description.....  | 31   |
| 2.5.2 Observations.....   | 31   |
| 3. RESULTATS ET DISCUSSION.....   | 32   |
| 3.1 Comportement de <u>Lemna minor</u> et de la microflore totale<br>en présence de différentes dilutions du milieu de Hutner | 32   |
| 3.2 Croissance de <u>Lemna minor</u> et de la microflore adjointe<br>en présence de pétrole brut et raffiné.....              | 33   |
| 3.3 Synthèse d'acides ribonucléique chez <u>Lemna minor</u> en pré-<br>sence de pétrole brut.....                             | 36   |
| CONCLUSION.....   | 47   |
| APPENDICE 1 - L'écosystème utilisé par S.A. Visser et al...   | 49   |
| APPENDICE 2 - L'écosystème utilisé par J.C. Lacaze et al...   | 51   |
| APPENDICE 3 - L'écosystème utilisé par R.L. Metcalf et al..   | 53   |
| APPENDICE 4 - Table de McCrady pour l'évaluation de la mi-<br>croflore totale.....  | 56   |
| APPENDICE 5 - Composition du milieu de culture de Hutner...   | 57   |

|   |    |
|---|----|
| APPENDICE 6 - Causes possibles de la disparition des organismes<br>de l'écosystème..... | 58 |
| BIBLIOGRAPHIE.....  | 60 |

## LISTE DES TABLEAUX

|  | Page |
|--|------|
| 1.1 Valeurs pour estimer le pourcentage d'erreur sur les coefficients K.....                                   | 20   |
| 3.1a Nombre de frondes de <u>Lemna minor</u> obtenu après traitement avec les huiles brutes et raffinées.....  | 38   |
| 3.1b Analyse de variance entre les groupes du Tableau 3.1a.....  | 39   |
| 3.1c Détermination de la provenance de la variation obtenue lors de l'analyse de variance du Tableau 3.1b..... | 39   |
| 3.2 Recherche de la dilution optimale du milieu de Hutner pour la croissance de <u>Lemna minor</u> .....       | 40   |
| 3.3 Evaluation du contenu en chlorophylle chez <u>Lemna minor</u> en fonction du nombre d'individus.....       | 41   |
| 3.4 Croissance de <u>Lemna minor</u> et de la microflore adjointe en présence de pétrole brut.....             | 42   |
| 3.5 Croissance de <u>Lemna minor</u> et de la microflore adjointe en présence de pétrole raffiné.....          | 43   |
| 3.6 Synthèse d'ARN chez <u>Lemna minor</u> en présence de pétrole brut..                                       | 44   |
| A.4 Table de McCrady.....  | 56   |
| A.6 Variation du pH de la culture-stock de <u>Lemna minor</u> durant deux jours consécutifs.....               | 59   |

## LISTE DES FIGURES

|   | Page |
|---|------|
| 3.1 Croissance de <u>Lemna minor</u> en présence de pétrole brut et raffiné.....                          | 45   |
| 3.2 Croissance de la microflore totale en présence de pétrole brut et raffiné.....                        | 46   |
| Schéma A.1 Ecosystème pourvu d'un manomètre et de tubes pour les échanges gazeux.....                     | 50   |
| Schéma A.2 Schéma d'un bac d'expérimentation.....   | 52   |
| Schéma A.3 Vue d'ensemble de l'écosystème utilisé pour l'étude de la biodégradabilité des pesticides..... | 55   |

## LISTE DES ABREVIATIONS

|              |  |
|--------------|--|
| ADN:         | Acide désoxyribonucléique  |
| ARN:         | Acides ribonucléiques  |
| C $\alpha$ : | Contenu en chlorophylle $\alpha$ (formule: voir page 23)             |
| D.O.:        | Densité optique  |
| Fd:          | Nombre de frondes au jour d  |
| Fo:          | Nombre initial de frondes  |
| K:           | Constante de croissance du nombre de frondes (formule: voir page 6). |



## RESUME

Parmi les écosystèmes expérimentaux, nous avons choisi celui de la rhizosphère de Lemna minor et nous y avons étudié la croissance de cette plante arale monocotyle et celle de la microflore en conditions normales et en présence de pétrole brut et raffiné. En conditions normales, la concentration du milieu minéral-support et le pH s'y avèrent des facteurs importants pour la croissance de cette plante. Par ailleurs, en présence d'huile brute ou raffinée, on constate qu'il y survient, à partir d'un seuil de toxicité voisin de 0.01 µl/ml, un ralentissement graduel de l'accroissement du nombre de frondes au niveau de cette plante et un effet bactériostatique progressif en fonction de la dose. Ce frein de croissance induit par le pétrole brut et raffiné s'explique du moins partiellement par le fait que ce produit induit une inhibition graduelle de la synthèse des acides ribonucléiques essentiels à tout anabolisme de croissance.

## INTRODUCTION

Dans le domaine des essais biologiques, la plupart des expériences décrites dans la littérature sont effectuées à l'aide d'un seul type d'organisme. Les résultats obtenus par cette méthode donnent divers renseignements et précisent les effets de diverses substances sur ces organismes. Par ailleurs, les effets possibles de celles-ci sur l'ensemble écologique d'un milieu aquatique spécifique sont très difficiles à établir.

Dans cette dernière optique, nous avons tenté, lors de ce travail expérimental, de donner une dimension plus globale aux essais biologiques en utilisant un écosystème aquatique relativement élaboré. On peut définir un écosystème comme un tout dynamique où il y a interaction entre les composants biotiques eux-mêmes; ainsi qu'entre ces derniers et les composants abiotiques (le milieu). D'autre part, rappelons ici que les espèces vivantes ont des seuils de tolérance différents vis-à-vis des multiples facteurs de l'environnement et des produits toxiques.

A partir de ces deux principes de base, interaction et tolérance différentielle des espèces, nous pouvons prédire que l'élimination ou simplement la réduction en nombre d'une ou de quelques espèces plus sensibles provoquera un changement notable dans la composition finale de la communauté biotique et que ces changements seront différents selon le facteur ou la substance toxique étudiée. Par exemple, l'élimination d'un certain nombre d'organismes provoquera une augmentation de la population bactérienne (décomposeurs).

L'écosystème qui est utilisé dans cette étude est celui de la rhizosphère de Lemna minor, employé par Coler et Gunner (4), (5), (6). Son utilisation offre des possibilités uniques d'observations fréquentes tout en minimisant la manipulation des organismes, ce qui élimine une cause de stress étrangers à l'expérience.

Comme c'est le cas pour tout essai biologique, notre but est de caractériser les effets que peuvent avoir certaines substances sur l'écosystème en question. Nous avons choisi les huiles brutes et raffinées que l'on retrouve fréquemment dans le milieu aquatique.

Le phénomène de pollution, accidentel ou volontaire qu'elles occasionnent étant devenu quasi quotidien, il est donc impérieux de mieux connaître les mécanismes d'impact et les effets sur les écosystèmes d'eau douce de ces déversements d'huiles.

La compréhension des mécanismes d'impact sur l'environnement suite à l'injection d'huiles fait appel à de multiples connaissances portant sur le comportement physique, physico-chimique et biochimique des différentes substances entrant dans la composition de ces huiles, sur leur toxicité relative vis-à-vis des organismes associés et sur la résistance des espèces en fonction de leur comportement écologique, physiologique et métabolique.

Ce type de recherche, utilisé pour mieux comprendre la biologie des écosystèmes naturels, n'implique pas nécessairement que ces derniers réagiront exactement comme leurs homologues expérimentaux bien que la littérature fasse état de nombreuses recherches qui montrent une évolution similaire dans les deux cas (7), (8), (19).

## CHAPITRE 1

## DONNEES INITIALES

1.1 Utilisation d'écosystèmes et de *Lemma minor*

Les pages suivantes s'attachent plus particulièrement à faire une revue de quelques écosystèmes déjà utilisés.

Cette démarche nous semble pertinente sachant que, de plus en plus, certains chercheurs tentent de mettre au point des écosystèmes expérimentaux. Par exemple, on a étudié avec beaucoup d'attention la fixation de l'azote par la flore bactérienne mais on connaît très peu de choses sur les transferts subséquents de l'azote dans le milieu et les organismes environnants. Pour obtenir de plus amples informations à ce sujet, Visser et al. (25) ont utilisé un écosystème expérimental (voir appendice 1). Ils ont pu démontrer avec cette méthode que les transferts subséquents d'azote dans le système sont différents, qu'il s'agisse de l'azote nouvellement fixé ou de l'azote déjà présent dans les tissus introduits au début de l'expérience. Les modes et les coefficients de transfert de  $^{14}\text{N}$  et  $^{15}\text{N}$  sont différents en présence de populations microbiennes différentes. Le phénomène de renouvellement ("turnover") est plus complexe et plus lent en présence d'une population mixte qu'avec une population pure d'*Azotobacter chroococum*. Un coefficient de transfert bas dans une population mixte peut refléter un recyclage plus intense à l'intérieur de cette population que dans une population pure d'*Azotobacter chroococum*. L'utilisation de cet écosystème expérimental fut donc efficace pour obtenir des indications sur les transferts d'azote en nature.

Un autre écosystème fut expérimenté par Lacaze et al. (13) (voir appendice 2). Celui-ci fut mis au point afin d'obtenir un système possédant une structure et un fonctionnement définis et reproductibles dans le but d'utiliser l'écosystème en question comme matériel biologique pour des études de pollution. Après une année d'expérimentation, les auteurs firent les remarques suivantes: "les espèces les plus représentatives des étangs saumâtres, introduites avec les échantillons initiaux, sont toujours présentes. Par ailleurs, dans les quatre milieux expérimentaux, le développement des organismes était similaire; c'est le cas en particulier pour la communauté des diatomées du périphyton. De même, l'évolution des phosphates dissous est synchrone dans les quatre milieux expérimentaux." Quoique employés avec des eaux saumâtres, les principes d'utilisation de cet écosystème peuvent s'appliquer pour tout autre milieu naturel.

Enfin, le plus sophistiqué des écosystèmes expérimentaux fut mis au point par Metcalf et al. (18) (voir appendice 3). Il fut développé pour étudier la biodégradation des pesticides et évaluer, à l'aide de traceurs radioactifs, les différents produits résultant de cette biodégradation. L'écosystème comporte des interfaces sol/air et sol/eau ainsi qu'une chaîne alimentaire composée de sept (7) chaînons. En utilisant cet écosystème, on a pu simuler un épandage de pesticides sur les récoltes et l'éventuelle contamination du milieu aquatique. Il a ainsi été explicité qu'un épandage correspondant à une (1) livre de DDT par acre avait comme effet l'accumulation de DDT dans les larves de moustiques, dans les gastéropodes et dans les poissons sous forme de DDE, DDD et de DDT, et ceci de l'ordre de 10,000 à 100,000 fois. Quoique très intéressant, cet écosystème est trop élaboré pour les besoins de la présente étude. C'est pourquoi nous avons porté notre choix sur un écosystème

plus simple et de manipulation plus pratique, l'écosystème de Coler et Gunner (4), (5), (6).

Cet écosystème qui renferme Lemna minor comporte de nombreux avantages; la plante elle-même est facile à maintenir en culture et se multiplie très rapidement, la composition de sa rhizosphère est relativement limitée (voir 2.3.2) et très sensible à tout léger changement du milieu. De plus, la taille d'une unité expérimentale est telle que nous pouvons procéder à plusieurs expériences en même temps (plusieurs concentrations et réplicats) dans un minimum d'espace. Enfin, l'avantage le plus précieux est la possibilité d'observer les habitants microscopiques de l'écosystème sans les retirer du milieu (voir 2.3.1). En plus de ces nombreux avantages, il peut, comme tout autre système expérimental, donner, à partir des divers changements observés dans la population lors des tests, des indications sur ce qui se produit en nature à une plus grande échelle.

## 1.2 Paramètres choisis pour l'étude

Afin d'évaluer la toxicité du produit utilisé, il faut procéder à diverses mesures qui nous renseignent sur le comportement de l'écosystème en question. Pour ce faire, il s'agit de choisir des paramètres faciles à mesurer et susceptibles de procurer les renseignements désirés.

Le premier de ces paramètres est la composition de la microfaune de l'écosystème. Cette mesure s'effectue simplement à l'aide d'un microscope ou d'une loupe binoculaire de la façon suivante: on dénombre les organismes de chaque groupe rencontré dans n champs microscopiques et on détermine le nombre moyen de ceux-ci par champ. Par simple comparaison, on évalue ensuite les effets du produit toxique sur ces constituants. Il

est aussi possible de calculer l'indice de diversité à chaque cas, ce qui donne des résultats plus standardisés.

Le deuxième paramètre utilisé s'avère la croissance de la plante-support elle-même. Cette plante se reproduit rapidement et presque exclusivement de façon végétative par voie de bourgeonnement. Ceci suggère que cette plante, dérivée de formes terrestres (17), n'a pas encore réussi à adapter pleinement au milieu aquatique le mécanisme élaboré de la production de graines (17). Le bourgeonnement étant très rapide, il permet de préciser l'effet de substances sur la croissance et le développement de la plante tout en étudiant l'écosystème de la rhizosphère. La croissance de Lemna minor peut être facilement évaluée en déterminant le poids sec ou frais. Cependant, la mesure du poids sec conduit parfois à des erreurs d'interprétation car son augmentation peut refléter une accumulation d'amidon dans la plante plutôt qu'une croissance réelle. Une méthode plus efficace consiste à calculer l'augmentation du nombre de frondes de la plante sous des conditions donnant approximativement une augmentation exponentielle de ce nombre, une constante de croissance "K" peut être dérivée en calculant la pente de la courbe représentant le logarithme du nombre de frondes à des périodes successives. Cette constante "K" et le taux de multiplication "MR" sont reliés par l'équation suivante (3).

$$K = \frac{MR}{1000} = \frac{\log_{10} (F_d) - \log_{10} (F_o)}{d} = \log_{10} \frac{F_d}{F_o}$$

$F_o$  = le nombre initial de frondes

$F_d$  = le nombre de frondes au jour "d"

d = le nombre de jours

En multipliant les équations par 2.303, nous transformons le loga-

rithme à la base 10 en logarithme naturel.

Calcul d'erreur sur la formule

$$K = \frac{\ln \frac{F_d}{F_o}}{d}$$

$$\ln K = \ln (\ln F_d - \ln F_o) - \ln d$$

$$\frac{DK}{K} = \frac{D (\ln F_d - \ln F_o) - Dd}{(\ln F_d - \ln F_o) d}$$

$$\frac{DK}{K} = \frac{D (\ln F_d)}{\ln F_d - \ln F_o} - \frac{D \ln F_o}{\ln F_d - \ln F_o} - \frac{Dd}{d}$$

$$\frac{DK}{K} = \frac{D F_d}{F_d (\ln F_d - \ln F_o)} - \frac{D F_o}{F_o (\ln F_d - \ln F_o)} - \frac{Dd}{d}$$

$$\frac{DK}{K} = \frac{1}{(\ln F_d - \ln F_o)} \left( \frac{DF_d}{F_d} - \frac{DF_o}{F_o} \right) - \frac{Dd}{d}$$

d'où en passant aux différences finies

$$\frac{\Delta K}{K} = \frac{1}{\ln(F_d/F_o)} \left( \frac{\Delta F_d}{F_d} + \frac{\Delta F_o}{F_o} \right) + \frac{\Delta d}{d}$$

où D signifie la différentielle partielle et ln le logarithme naturel.

Il est à noter que ces valeurs sont appropriées seulement pour une croissance exponentielle car, sous des conditions différentes, un pourcentage d'augmentation procure de meilleurs résultats selon Clark (3). Il est aussi important que toutes les frondes soient dénombrées, si petites soient-elles. Le tableau 1.1 donne la valeur des erreurs pour les différents coefficients K des tableaux 3.2, 3.4 et 3.5.



Pour compléter nos observations périodiques, nous avons aussi évalué la microflore totale; cette évaluation se fait à l'aide de la méthode de dilutions successives dans un bouillon nutritif. Le principe en est simple, il s'agit d'ensemencer le milieu de culture de l'écosystème (1 ml.) dans un bouillon nutritif et de rechercher la dilution limite donnant lieu à une culture. L'ensemencement se réalise de la façon suivante: on place 1 ml. du milieu de culture dans 5 ml. de bouillon et ceci en cinq exemplaires par dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-10}$  à 28-30°C. Les résultats se déterminent de la façon ci-après. On précise une première fois après 7 jours d'incubation et une deuxième fois après 15 jours le nombre de tubes positifs, c'est-à-dire ceux contenant des cultures, selon les critères suivants: troubles, dépôts ou voiles dans le bouillon. L'interprétation s'effectue de la manière suivante: le dénombrement de tubes positifs pour chaque dilution donne d'abord un "chiffre caractéristique" et il s'agit par la suite de déterminer le nombre de germes par millilitre d'après les tables de McCrady (appendice 4). Signalons ici qu'il faut opérer avec de rigoureuses précautions d'aseptie vu que le milieu est choisi pour la généralité de sa réponse et qu'il s'avère ainsi très sensible et facile à contaminer. Par cette méthode, on s'assure que le nombre de germes obtenu représente réellement le nombre de germes vivants dans le milieu puisque chacun d'eux donne naissance à une colonie; c'est d'ailleurs l'ensemble des colonies qui est évalué.

### 1.3 Milieu de culture

L'écosystème de la rhizosphère de Lemma minor ayant déjà été utilisé pour des études de toxicité (4), (5), (6), nous avons choisi le même milieu-support, lequel milieu a été mis au point par S.H. Hutner (11).

Ce milieu précis offre l'avantage à l'utilisateur de connaître au départ sa composition exacte (voir appendice 5). L'emploi d'un milieu minéral a d'autres avantages, notamment celui de pouvoir contrôler certains paramètres importants dans des études toxicologiques tels que l'absence d'une demande biochimique en oxygène (DBO) qui pourrait fausser les résultats en appauvrissant le milieu en oxygène, la dureté qui a une influence directe sur la toxicité (une diminution de la dureté entraîne généralement une augmentation du degré de toxicité), le pH qui, en plus d'agir sur les équilibres chimiques, agit sur les organismes constituants de l'écosystème. En connaissant la composition exacte du milieu et en pouvant faire varier celle-ci, on est en mesure d'effectuer des études sur les effets qu'exercent les différents éléments nutritifs sur l'écosystème.

On doit toutefois prendre en considération que, selon les conditions des cultures-stock qui étaient faites à partir des conditions naturelles, l'écosystème et l'origine des plantes, il peut y avoir certaines difficultés d'adaptation des organismes constituants à leur nouveau milieu synthétique, ce qui est susceptible d'influencer les résultats des essais. Pour contourner cette difficulté, il suffit de prévoir une période adéquate d'acclimatation avant les essais. Quelquefois les organismes n'arrivent pas à s'adapter et sont rapidement éliminés sans que l'on soit en mesure d'en identifier la ou les causes en faisant varier différents paramètres (pH, T<sup>0</sup>, luminosité, période de la journée où s'effectue le transfert, etc...).

#### 1.4 Facteurs influençant la croissance de Lemna minor

Avant d'aborder l'étude des facteurs influençant la croissance de Lemna minor, nous allons donner quelques renseignements sur cette plante (17).

Division : Spermatophytes  
Sous-division: Angiospermes  
Classe : Monocotyles  
Ordre : Arales  
Famille : Lemnacées  
Genre : Lemna  
Espèce : minor

Lemna minor prolifère à la surface de l'eau grâce à des lacunes aëriifères; sa racine se trouvant submergée, nous sommes donc en présence d'un écosystème aquatique au niveau de sa rhizosphère dont nous décrivons la composition plus loin.

En nature, Lemna minor se rencontre dans les eaux calmes; dans les eaux rapides, elle est éliminée sauf si elle prend appui sur d'autres plantes ou sur des débris. Sa croissance peut continuer pendant quelque temps hors de l'eau sur des boues humides. Ses meilleurs taux de croissance ont été enregistrés dans de petits étangs d'eau stagnante ou dans des fossés riches en matières organiques. On la rencontre aussi occasionnellement dans les eaux saumâtres. A ce propos, signalons que la limite de tolérance supérieure pour la salinité est difficile à établir précisément car elle diffère selon les auteurs: certains l'établissent à 0.05 M (14) tandis que d'autres ont maintenu des cultures dans des solutions contenant 0.43 M de NaCl (16).

En ce qui concerne le pH, l'échelle de tolérance est assez grande: elle se situe entre 4.5 et 7.5 avec des limites inférieures et supérieures à 3.5 et 7.5 respectivement.

Précisons à présent l'influence qu'ont certains facteurs sur la physiologie de Lemna minor.

#### 1.4.1 Nutrition minérale et oligo-éléments

D'après plusieurs auteurs (11), (14), (24), (26-34), Lemna minor se comporte comme une plante supérieure typique et croît de façon satisfaisante dans un milieu entièrement inorganique, tel que le milieu de Hutner que nous nous proposons d'utiliser. De fait, c'est le milieu avec lequel on obtient la croissance la plus vigoureuse pour une longue période. Landolf (14) a remarqué que Lemna minor peut croître aussi bien ou même mieux dans une dilution 1:3 du milieu de Hutner que dans une solution non diluée du même milieu et qu'à une dilution de 1:100 il y a réduction de la croissance. En général, lorsqu'on dilue le milieu, nous observons les changements morphologiques suivants: allongement des racines et expansion des frondes. Ces changements peuvent s'expliquer par une valeur osmotique réduite du milieu. Les phénomènes précités reliés à la dilution du milieu sont cependant réversibles en ajoutant à ce dernier des concentrations appropriées de sucrose (le mannitol et le lactose ne peuvent être employés car, selon Hillman (10), ils ne sont pas utilisés comme source de carbone par la plante). Ceci suggère que ces effets sont reliés à la pression osmotique et qu'il doit aussi y avoir des interactions complexes de substances nutritives. Il a été précisé par ailleurs que le sucrose accroît l'efficacité de l'utilisation des sels sous certaines conditions (24).

De nombreuses études ont été faites en ce qui concerne la variation de concentration ou le retrait d'un élément particulier du milieu minéral. Stipulons quelques exemples à ce sujet tirés des études de White (26-34) et de Lindeman (15).

Un niveau peu élevé en azote sous forme de nitrate réduit le taux de multiplication des frondes, le contenu en chlorophylle, le contenu en protéines et la respiration tandis qu'il augmente les réserves d'amidon et la longueur des racines. On a aussi remarqué que le niveau optimal de nitrate s'élève avec une diminution de l'intensité lumineuse. La longueur des racines est en fait un bon indicateur du rapport hydrates de carbone/azote. Un niveau peu élevé d'azote ou de phosphate augmente la croissance racinaire, la longueur et la valeur osmotique de ces cellules mais diminue leur taux de photosynthèse et de respiration. Une déficience en phosphate en particulier inhibe la photosynthèse, même lorsqu'il y a saturation de lumière. Une augmentation de ces mêmes phosphates entraîne la réversibilité de cette inhibition en quelques heures suite au fait que les phosphates sont incorporés dans la fraction soluble d'acide trichloroacétique (T.C.A.) de la plante et qu'il y a une relation linéaire entre le taux de photosynthèse et la quantité d'acide trichloroacétique.

Une faible quantité de K diminue la longueur des racines ainsi que le taux de multiplication, d'assimilation et de développement des frondes. Il est aussi à noter que la valeur optimale de potassium est plus élevée lorsque l'intensité lumineuse augmente. On a remarqué des effets similaires dans le cas d'une déficience en Ca.

Des expériences sur l'effet de la déficience en oligo-éléments ont démontré qu'une nette diminution de croissance avait lieu en l'absence de Fe, Mn, Mo ou B; les résultats sont moins marqués en absence de Zn, Cu ou Ca. Il est aussi à noter que le Cl est indispensable; une quantité de 50 à 100 µg/l est cependant suffisante et peut même être remplacée par 150 µg/l de Br. On a aussi démontré que l'efficacité de l'utilisation des minéraux

est dépendante du niveau de nutrition en carbone: par exemple, cette efficacité augmente lorsqu'on ajoute une quantité de 0.5 à 2% de sucre (24).

#### 1.4.2 Lumière et photosynthèse

A des intensités au-dessous de 700 bougies/pied (7,000 lux), le taux de multiplication augmente avec une augmentation de la durée journalière d'exposition jusqu'à atteindre un maximum en lumière continue (24 heures) selon Ashby (1), Clark (3) et Landolf (14). Ceci veut dire que, contrairement à plusieurs plantes supérieures, Lemna minor n'est pas affectée par une illumination continuelle ou perturbée par une photopériode non naturelle. De fait Ashby (1) a soumis ces plantes à des périodes de lumière de 2 heures d'intervalle durant 10 jours et n'a constaté aucune différence significative dans la croissance, comparativement à une périodicité lumineuse de 12 heures. Les études expérimentales d'Ashby (1), (2) ont démontré que, pour une illumination constante et des variations d'intensité de 50 à 1,600 bougies/pied (550 à 17,500 lux), le taux de multiplication maximal était atteint à 150 bougies/pied (1,600 lux) et qu'une intensité de 1,400 à 1,600 bougies/pied (15,500 à 17,500 lux) était nocive. D'autre part, l'assimilation (l'augmentation du poids sec) augmente avec l'intensité mais il y a aussi accumulation de monosaccharides et d'amidon dans les frondes à une intensité aussi faible que 150 bougies/pied (1,600 lux); ceci permet de penser que la lumière affecte le taux de multiplication par des procédés autres que l'assimilation, lesquels procédés sont encore mal connus. Le contenu protéique, le taux de respiration par unité de surface et la longueur des racines augmentent avec une intensité lumineuse accrue tandis que la respiration par poids sec diminue selon White (29-34).

Le taux de photosynthèse augmente linéairement avec une augmentation de l'intensité lumineuse de 50 à 300 bougies/pied (550 à 3,600 lux) selon White (29). Les quantités d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> disponibles furent aussi étudiées relativement à la photosynthèse par Ashby et Oxley (2). Une augmentation de l'aération dans une culture n'affectait point le taux de croissance et d'assimilation. Cependant, une aération forcée accompagnée de 4% de CO<sub>2</sub> faisait augmenter la taille des frondes et le taux de multiplication et ceci de façon plus marquée à 300 bougies/pied (3,600 lux) d'intensité lumineuse qu'à 100 bougies/pied (1,200 lux). Il est donc évident qu'une aération forcée des cultures de Lemna minor n'est pas nécessaire pour le développement normal de la culture. Toutefois, dans notre cas, une aération a été nécessaire car les expériences ont été faites dans des flacons de culture (où il y avait donc peu de diffusion possible) car nous nous intéressions aussi à l'écosystème que la plante supportait, lequel nécessitait sûrement une aération suffisante.

#### 1.4.3 Température

En ce qui concerne le taux de multiplication de Lemna minor, Ashby et Oxley (2) ont trouvé qu'une température de 29°C était optimale. Ce taux diminue rapidement à partir de 35°C. Des tentatives pour mettre en évidence les effets de la thermopériodicité furent négatives car la plante est très peu sensible à cette dernière (14). La thermopériodicité étant surtout déterminante chez les plantes pour le transport du matériel nutritif, la taille et la physiologie de Lemna minor éliminent la possibilité que ce procédé puisse être un facteur limitant pour cette dernière.

#### 1.4.4 Respiration

Nous avons déjà mentionné les effets de l'intensité lumineuse et

de la déficience minérale sur la respiration de la plante mais un autre facteur peut influencer cette fonction: c'est le vieillissement des plantes.

On a noté que la consommation d'oxygène par les tissus radiculaires de cultures âgées de 20 jours était considérablement plus basse que celle d'une culture âgée de 10 jours. Les raisons qui sont impliquées dans ce phénomène ne sont pas clairement expliquées mais on peut croire qu'avec l'âge, les cultures deviennent plus sensibles aux inhibiteurs de la respiration (21).

### 1.5 Introduction d'un stress

Nous avons choisi d'évaluer le comportement de l'écosystème de la rhizosphère de Lemna minor en présence d'huiles brutes et raffinées (gazole légère) pour des raisons mentionnées plus haut (voir introduction). Afin d'avoir quelques indications sur les effets possibles que ce stress peut avoir sur l'écosystème, nous allons procéder à une analyse rapide de la composition et du comportement des huiles dans le milieu aquatique naturel.

#### 1.5.1 Composition du stress choisi

Les hydrocarbures sont de loin les constituants les plus importants des huiles brutes et raffinées (98% des huiles brutes et 100% de la plupart des produits raffinés). Les constituants autres que les hydrocarbures dans les huiles brutes sont des dérivés de ces derniers contenant de l'hydrogène, du soufre, de l'azote ou la combinaison de ceux-ci. Les huiles brutes ont en général une faible teneur en eau et en sels: on y retrouve cependant des traces minérales telles que le Ni, le V et le S caractéristiques



leur origine.

Les hydrocarbures du pétrole peuvent être groupées selon la classification suivante, établie par Knight (12):

1. Les paraffines ou alcanes, composés saturés acycliques dont la formule générale est  $C_n H_{2n+2}$ . Ils peuvent se présenter sous forme de chaînes simples comme le n-heptane ( $C_7H_{16}$ ) ou sous forme de chaînes latérales comme le 2 méthyl hexane (la formule équivaut aussi à  $C_7H_{16}$ ).
2. Les oléfines ou alcènes, composés non-saturés acycliques dont la formule générale est  $C_n H_{2n-x}$  ( $x=0 \rightarrow n$ ). Ils peuvent se présenter sous forme de chaînes simples comme le 3-heptène ( $C_7H_{14}$ ) ou sous forme de chaînes latérales comme le 2 méthyl-3 hexène ( $C_7H_{14}$ ). Les alcènes sont généralement absents des huiles brutes mais constituent la majeure partie de la gazoline provenant des processus de craquage catalytique et thermique.
3. Les cycloparaffines qui sont des composés cycliques saturés dont la formule générale est  $C_n H_{2n}$  comme le cyclopentane ( $C_5H_{10}$ ). Quelquefois, des groupements alkyles peuvent remplacer des hydrogènes.
4. Les hydrocarbures aromatiques ou cycliques non saturés qui possèdent des doubles liaisons éniques comme le benzène ( $C_6H_6$ ). Comme pour les groupes précédents, des groupements alkyles peuvent remplacer des hydrogènes.

La composition des huiles brutes étant très variable, nous avons choisi des échantillons au hasard en prenant pour acquis que les consti-

tuants de base sont les mêmes et que les effets qu'ils induisent sont les mêmes. Pour ce qui est de la gazoline légère, nous avons recueilli des échantillons dans 12 différentes stations services et nous les avons mélangés à parts égales.

#### 1.5.2 Voies d'intervention du stress choisi

Bien qu'il soit assez difficile de déceler la contamination des nappes souterraines et d'en évaluer l'importance réelle (23), on distingue cependant les étapes suivantes pour les huiles dans leur phénoménologie de contamination:

- Infiltration de l'huile jusqu'à la nappe phréatique;
- Solubilisation de la phase hydrophyle des huiles;
- Transport de la phase soluble via le mouvement de la nappe;
- Oxydation souterraine de l'huile;
- Dégradation lente anaérobie de l'huile.

Le mouvement de la nappe phréatique vers les eaux de surface entraîne la partie soluble de l'huile et contribue à l'injection de substances spécifiques exerçant un stress plus ou moins important sur l'écosystème des eaux de surface réceptrices.

La contamination directe des eaux de surface, quoique plus facile à déceler, est cependant plus néfaste que l'injection indirecte. En contact avec l'eau, la phase soluble et volatile sera rapidement séparée de la phase insoluble flottant à la surface. L'évaporation et la solubilisation des hydrocarbures à faibles poids moléculaires augmentent avec le rapport surface/volume de la nappe d'huile sous l'influence de la température, la turbulence, le type et la concentration des matières en suspension, l'ensoleillement, le couvert de glace, la vitesse des vents ainsi que la bio-

dégradation de la nappe. Donc, en plus de la toxicité des huiles légères et des hydrocarbures aromatiques, la phase insoluble peut entraîner des dommages mécaniques importants aux organismes aquatiques et à leur habitat, surtout dans le cas d'huiles brutes (23).

### 1.5.3 Mécanismes de toxicité du stress choisi

Les substances huileuses contenues dans les huiles brutes et raffinées deviennent dangereuses pour la vie aquatique de plusieurs façons comme nous le verrons maintenant (12):

- Les huiles insolubles et émulsifiées peuvent agir sur les tissus épithéliaux des poissons en adhérant sur les branchies et en interférant ainsi avec la respiration. Quoique les poissons puissent combattre cette action en sécrétant un mucus pour laver la substance huileuse, l'efficacité de ce processus dépend de la concentration de la substance irritante.
- Ces mêmes huiles insolubles et émulsifiées sont susceptibles d'enrober et de détruire les algues et divers autres organismes planctoniques, ce qui appauvrit l'écosystème. Les organismes ainsi enrobés peuvent également s'agglomérer et sédimenter.
- Les substances huileuses sédimentées recouvrent souvent le fond des cours d'eau, ce qui perturbe les organismes benthiques ou interfère avec la fraie en changeant les caractéristiques des fonds.
- Les substances solubles et émulsifiées ingérées par les poissons affectent la saveur de la chair.
- La demande en oxygène des produits organiques peut amener une désoxygénation des eaux.
- Les nappes flottantes interfèrent avec les processus naturels

d'échanges gazeux et de photosynthèse.

- Les substances solubles peuvent être toxiques directement pour les organismes de façon aiguë ou chronique.

De plus, les hydrocarbures saturés de faible poids moléculaire ont, à faible dose, un effet anesthésique sur la plupart des animaux aquatiques entraînant un état de stupeur et provoquant, à des concentrations plus élevées, des dommages cellulaires souvent léthaux pour les jeunes individus. Les hydrocarbures aromatiques tels que le benzène, le toluène, le xylène, les phénols etc. sont toxiques surtout en agissant au niveau du réseau membranaire des cellules et modifient leur comportement thermodynamique. On remarque en effet que l'osmorégulation, la conduction nerveuse et la contraction musculaire sont alors partiellement inhibés à faible dose. Chez certains microorganismes, des modifications de la membrane cellulaire inhibent ou modifient leur métabolisme tandis que, chez d'autres, la présence d'huile brute stimule leur croissance (23).

TABLEAU 1.1: Valeurs pour estimer le pourcentage d'erreur des coefficients K. Pour le milieu de Hutner  $F_d$  et  $F_o$  sont donnés par l'écart-type et la moyenne de cinq valeurs expérimentales tandis que pour le pétrole, le témoin seulement trois valeurs ont été utilisées. En choisissant bien ses plantules de Lemna minor on peut estimer qu'il n'y a pas d'erreur sur  $F_o$  d'où  $\Delta F_o = 0$

| Solutions                       | $F_d$<br>n | $F_o$<br>n | $\Delta F_d$<br>n | $\Delta F_o$<br>n | d<br>jours | $\Delta d$<br>jour | $\Delta K/K$<br>% |
|---------------------------------|------------|------------|-------------------|-------------------|------------|--------------------|-------------------|
| Milieu de Hutner 1/2            | 303        | 40         | 13.2              | 0                 | 14         | 0.25               | 3.94              |
| Milieu de Hutner 1/4            | 376        | 40         | 7.0               | 0                 | 14         | 0.25               | 2.62              |
| Milieu de Hutner 1/8            | 332        | 40         | 12.0              | 0                 | 14         | 0.25               | 3.49              |
| Pétrole brut 1 $\mu$ l/ml       | 0          | 20         | -                 | 0                 | 14         | 0.25               | -                 |
| Pétrole brut 0.1 $\mu$ l/ml     | 89         | 20         | 5.3               | 0                 | 14         | 0.25               | 5.77              |
| Pétrole brut 0.01 $\mu$ l/ml    | 148        | 20         | 4.4               | 0                 | 14         | 0.25               | 3.27              |
| Pétrole raffiné 1 $\mu$ l/ml    | 0          | 20         | -                 | 0                 | 14         | 0.25               | -                 |
| Pétrole raffiné 0.1 $\mu$ l/ml  | 37         | 20         | 5.0               | 0                 | 14         | 0.25               | 25.95             |
| Pétrole raffiné 0.01 $\mu$ l/ml | 141        | 20         | 4.7               | 0                 | 14         | 0.25               | 3.49              |
| Témoin                          | 192        | 20         | 4.6               | 0                 | 14         | 0.25               | 2.84              |

## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1 Mise au point de l'écosystème

La première étape qui nous apparaît comme essentielle est de déterminer la concentration adéquate du milieu de culture (le milieu minéral de Hutner (11), voir appendice 5 pour la composition chimique du milieu), afin que la croissance de la plante-support soit optimale. Pour ce faire, nous utilisons des récipients "erlenmeyers" de 250 ml. dans lesquels nous versons 60 ml. de milieu nutritif à différentes concentrations (1:2, 1:4, 1:8) et ceci en 12 exemplaires pour chacune des concentrations. Les récipients étaient ensuite stérilisés. Le nombre initial de plantes (Lemma minor) cultivées dans ce milieu se chiffre à 20 individus composés de 2 frondes chacun. Les vases "erlenmeyers" sont ensuite placés sur un support rotatif sous un éclairage de 100 bougies/pied (1,200 lux) avec une photopériode de 12 heures. Connaissant le nombre initial de plantes, il s'agit d'évaluer le nombre d'organismes composant la microflore totale adjointe par la méthode que nous avons décrite plus haut (voir page 8).

L'expérience se poursuit durant 15 jours de la façon suivante: après 7 jours d'exposition, on prélève 5 "erlenmeyers" de chaque concentration au hasard ainsi qu'un "erlenmeyer"-témoin (qui ne contient aucune plante) afin de procéder aux mesures suivantes:

- nombre de plantes par "erlenmeyer"
- nombre de frondes par plante
- évaluation de la microflore totale.

Après 15 jours d'exposition, nous procédons aux mêmes mesures avec

les 5 "erlenmeyers" restants de chaque concentration ainsi qu'avec les témoins.

## 2.2 Détermination du contenu en chlorophylle chez Lemna minor

A différents moments de l'expérimentation, nous avons déterminé la teneur en chlorophylle chez Lemna minor pour évaluer les effets des substances utilisées (huiles brutes et raffinées) sur la plante qui supporte l'écosystème.

La procédure comprend les deux étapes suivantes.

### 2.2.1 Extraction de la chlorophylle

Après une homogénéisation des plantes dans 30 ml. d'une solution d'acétone à 90% et de 0.05 de  $MgCO_3$  à l'aide d'un broyeur à tissus muni d'un piston en "téflon", on centrifuge à 2,000 RPM (rotation par minute) durant 15 minutes et on recueille ensuite le surnageant.

### 2.2.2 Analyse

A l'aide du spectrophotomètre, nous avons effectué par la suite un balayage de 750 à 600 m $\mu$  en notant les densités optiques acquises à 665, 645 et 630 m $\mu$  où se situent les maxima d'absorption pour les molécules de chlorophylle. Il s'agit ensuite de calculer à l'aide de la formule 2.1 (voir ci-dessous) la quantité de chlorophylle extraite en mg/l. d'acétone à 90%. Notons que nous avons évalué uniquement la quantité de chlorophylle  $\alpha$ , ce qui nous donne une indication suffisante. Nous avons effectué ces mesures à partir de quantités différentes de plantes (20, 30 et 40) afin d'évaluer la variation de la concentration en chlorophylle en fonction du nombre initial de plantes.

Formule tirée de T.R. Parsons et J.D.H. Strickland (20)

$$C_x = 11.6 \text{ D.O. (665 m}\mu\text{)} - 0.14 \text{ D.O. (630 m}\mu\text{)} - (1.31 \text{ D.O. (645 m}\mu\text{)})$$

où: D.O. = densité optique

C = concentration de chlorophylle en mg/l. d'acétone à 90%

## 2.3 L'écosystème

### 2.3.1 Description

Nous avons utilisé pour nos expériences le système mis au point par Coler et Gunner (5), (6), lequel comprend:

- un flacon de culture de 30 ml.;
- un bouchon percé d'un trou par lequel passe un tube d'aération;
- un fond percé d'un trou de même dimension par lequel un bouchon de caoutchouc est placé;
- une aiguille placée dans ce dernier bouchon, laquelle sert au prélèvement des échantillons de la microflore totale;
- un trou au-dessus du flacon afin de faciliter la circulation d'air et par lequel on procède à l'inoculation des substances à étudier;
- un tube d'aération branché à un aérateur contenant de l'eau afin de minimiser l'évaporation due au barbotement de l'air dans le milieu;
- une pompe foulante munie d'un filtre au charbon de bois et d'ouate pour éliminer les impuretés de l'air injecté dans le système.

Une unité d'expérimentation consiste en 6 flacons, tels que décrits plus haut, reliés à un tube de verre à sorties multiples (6) lequel est à



son tour relié à l'aérateur ci-haut mentionné. Nous pouvions ainsi procéder à plusieurs tests simultanément dans des conditions expérimentales identiques.

L'expérience consiste à placer 10 Lemna minor dans 20 ml. de solution minérale de Hutner à l'intérieur des flacons de culture. On laisse ensuite le tout s'équilibrer durant sept jours durant lesquels on procède à des observations journalières afin de noter l'évolution de l'écosystème dans son nouveau milieu. Après cette période d'équilibration, 10 plantes sont conservées dans le milieu et la substance dont on veut connaître les effets sur l'écosystème y est injectée. On détermine ensuite le taux de croissance, la microflore totale, le nombre par espèces d'organismes microscopiques de l'écosystème et le taux de synthèse des ARN (voir 2.4).

Les observations microscopiques ont été faites en gardant les organismes dans leur milieu de façon à éviter toute possibilité de stress étrangers à l'expérience en cours. A cette fin, on faisait pivoter le flacon de culture jusqu'à ce qu'un individu (Lemna minor) soit accolé à la paroi supérieure du flacon. En plaçant le flacon sous la loupe binoculaire, on procédait finalement à l'identification et au dénombrement des organismes présents.

### 2.3.2 Observations préliminaires

Afin de nous familiariser avec les organismes composant l'écosystème et de pouvoir les reconnaître facilement lors des observations futures, nous avons examiné, à l'aide du microscope, les habitants de cet écosystème. Il est important de procéder à de telles observations; en effet, le système étant dynamique, les résultats seront plus complets et plus repro-

ductibles si l'expérimentateur sait reconnaître rapidement les organismes présents.

Pour le dénombrement des organismes, nous avons procédé à 10 examens microscopiques pour chaque plante observée.

Voici la liste des principaux habitants de cet écosystème aquatique ainsi que leur nombre par champ microscopique.

| <u>Organismes</u>         | <u>Nombre/champ</u>          |
|---------------------------|------------------------------|
| Rotifères                 | 2 ± 1.15                     |
| Gastrotriches             | 0.1 ± 0.3                    |
| Protozoaires              |                              |
| Spirotriche (euplotes)    | 4 ± 1.76                     |
| Péritriches (vorticelles) | 3 ± 1.94                     |
| Holotriches               | 6 ± 2.13                     |
| Nématodes                 | Occasionnellement            |
| Hydracarinées             | 0.1 ± 0.3                    |
| Algues vertes             | 6 ± 2.2                      |
| Bactéries                 | 2.5 ± 10 <sup>2</sup> /ml. * |

\* Estimation de la population par mise en culture dans un milieu nutritif bactériologique.

#### 2.4 Mesure du taux de synthèse des acides ribonucléiques

Pour cette détermination du taux de synthèse des acides ribonucléiques (ARN), les plantes (Lemna minor) sont cultivées dans des vases "erlenmeyers" contenant 200 ml. de milieu minéral de Hutner (11) dilué 1:4.

Après une période d'équilibration de 7 jours, l'huile brute est ajoutée en triplicata selon des concentrations décrites plus loin. A la fin du traitement (15 jours), on injecte 0.25 µc d'uridine  $^{14}\text{C}/\text{ml}$ . et on laisse ce marquage se poursuivre durant 3 heures.

#### 2.4.1 Traitement préliminaire

L'uridine  $^{14}\text{C}$  est incorporée non seulement par les plantes mais vraisemblablement aussi par les organismes associés. Etant donné que nous ne nous sommes intéressés qu'au taux de synthèse des ARN de la plante, il fallut débarrasser cette dernière de ces organismes pour éviter les erreurs d'interprétation. Cette opération s'effectue à l'aide d'un détergent, le Tween 20 à 0.05%, dans lequel nous plaçons les plantes durant 15 minutes. Les plantes sont alors retirées du détergent et pesées (poids humide). Des aliquots du milieu de culture (2 ml.) sont prélevés au début et à la fin du traitement à l'uridine  $^{14}\text{C}$  afin de déterminer la quantité de radioactivité disparue du milieu pendant les 3 heures de marquage.

#### 2.4.2 Extraction

Après le traitement préliminaire prédécrit, il s'agit d'extraire les ARN des plantes. A cette fin, nous avons déposé celles-ci dans 5 ml. de Tampon tris pH 7.2 durant 5 minutes et les avons homogénéisées au moyen d'un broyeur de tissus muni d'un piston en "teflon". Cette opération et les suivantes ont été effectuées à l'intérieure d'une chambre froide à  $4^{\circ}\text{C}$  afin de bloquer toutes les activités biochimiques durant l'extraction. La deuxième étape du processus consiste à "déprotéiniser" en ajoutant à l'homogénat 5 ml. de Tampon tris pH 7.2 et 0.15 ml. de Sodium Dodécyl Sulfate à 3% et en agitant le tout durant 10 minutes.

Dans un troisième temps, il faut séparer les acides nucléiques des autres constituants. Pour ce faire, nous avons traité l'homogénat avec 10 ml. de phénol à 70% en agitant durant 10 minutes et nous avons ensuite centrifugé le tout pendant 5 minutes à 6,000 RPM (rotation par minute). Après récupération de la phase aqueuse et de l'interface contenant les acides nucléiques, le traitement au phénol est répété afin de purifier davantage. De cette phase aqueuse, il s'agit maintenant d'isoler les ARN en procédant comme suit: on ajoute 200 ml. d'éthanol à 100% en les versant lentement le long du récipient afin de faire précipiter l'acide désoxyribonucléique (ADN) sous forme de fibres, lesquelles peuvent être récupérées en les enroulant autour d'une tige de verre. Si cette précipitation ne se produit pas immédiatement, il faut laisser le tout reposer durant une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  et centrifuger par la suite durant 15 minutes à 6,000 RPM à une température de  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalement, pour faire précipiter les ARN, on additionne 1 ml. de NaCl 10% au surnageant, on laisse le tout sédimenter pendant une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$  et on centrifuge durant 15 minutes à 6,000 RPM et à une température de  $4^{\circ}\text{C}$ . Le culot obtenu est alors dissous dans 5 ml. de Tampon tris pH 7.2 et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.3 Dosage

En ce qui concerne le dosage, nous prélevons 0.5 ml. de la solution d'ARN et ajoutons 0.5 ml. de Tampon tris pH 7.2. Ensuite, nous procédions à l'évaluation de la densité optique (D.O.) à l'aide du spectrophotomètre U.V. à une longueur d'onde de 260 m $\mu$ . Lorsque les valeurs de densité optique étaient trop faibles ou trop fortes, on concentrait ou diluait les échantillons.

La transformation de la densité optique (D.O.) en concentration

s'effectue en utilisant comme valeur standard 50 µg d'ARN/ml., ce qui correspond à une densité optique de 1.0.

#### 2.4.4 Dosage de la radioactivité

Pour cette opération, on prenait 1 ml. de la solution d'ARN et on y ajoutait 9 ml. de solution "BBOT-Toluène" (4 gr. de 2,5 bis-2- (5-Butyl Benzo-Oxazolyl)-Thiophène/1 de Toluène) ou d'"aquasol", solutions utilisées pour le compteur à scintillation. Les échantillons étaient par la suite séchés à 95°C durant 24 heures, le Tampon tris étant insoluble dans le toluène. Nous procédions enfin au comptage radioactif des différents échantillons à l'aide d'un compteur à scintillation Beckmann.

#### 2.4.5 Obtention des résultats

##### Radioactivité absorbée (Ra)

$$\text{Uridine } ^{14}\text{C dans la plante} = C_i - C_f - x$$

où  $C_i$  = concentration de la radioactivité initiale dans la solution

$C_f$  = concentration de la radioactivité finale dans la solution

$x$  = concentration de la radioactivité absorbée dans les organismes autres que Lemna minor; cette concentration est négligeable (R. Van Coillie, observations non-publiées).

##### Incorporation (%)

$$\text{Uridine } ^{14}\text{C dans les ARN} = \frac{R_{\text{ARN}}}{R_a} \times 100$$

où  $R_{\text{ARN}}$  = radioactivité dans les ARN

$R_a$  = radioactivité absorbée

Activité spécifique% d'incorporation dans les ARN

mg. d'ARN

Taux de synthèse des ARNActivité spécifique

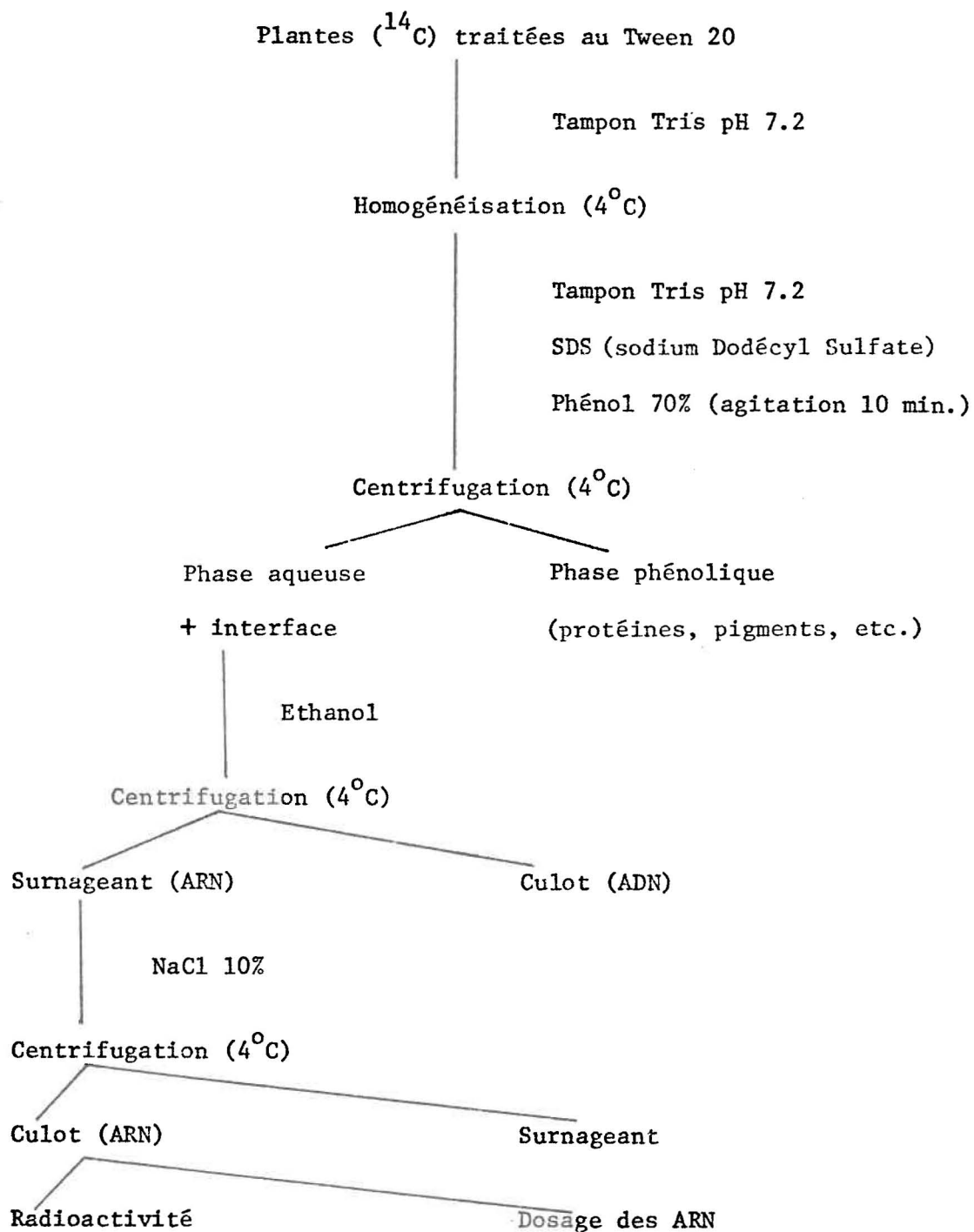
Temps de marquage

N.B.: Pour tous les calculs, chaque valeur obtenue en coups par minutes (c.p.m.) (valeur relative) doit être transformée en désintégration par minutes (d.p.m.) à l'aide de la relation suivante:

$$d.p.m. = \frac{c.p.m.}{\text{efficacité}}$$

l'efficacité est calculée à partir du rapport des canaux B/A du compteur à scintillation versus une courbe standard établie à partir du toluène marqué au  $^{14}\text{C}$ .

## SCHEMA D' EXTRACTION



## 2.5 Processus expérimental

### 2.5.1 Description

L'expérience présente a pour but de mesurer l'impact qu'ont les huiles brutes et raffinées sur l'écosystème de la rhizosphère de Lemna minor. Dans cette perspective, nous avons injecté ces substances dans l'écosystème à des concentrations décroissantes selon un facteur de 10: 1 µl/ml., 0.1 µl/ml., 0.01 µl/ml. Chaque injection était faite en triplicata et trois témoins étaient conservés pour fins de comparaison. Après une période d'équilibration de 7 jours dans le milieu de Hutner, nous conservions 10 spécimens et nous injectons les huiles. Par la suite, nous déterminions les différents changements apparents dans l'écosystème.

### 2.5.2 Observations

Afin d'évaluer l'impact qu'ont les huiles sur l'écosystème, nous avons effectué les examens suivants:

- observations microscopiques quotidiennes;
- dénombrement des plantes et des frondes et évaluation de la microflore totale, au début de l'expérience, après 7 jours de traitement et après 15 jours de traitement;
- détermination du taux de synthèse d'ARN à la fin d'une période expérimentale de 7 jours d'exposition effectuée dans des vases "erlenmeyers" de 250 ml. compte tenu que la technique nécessite un plus grand nombre de plantes.



## CHAPITRE 3

## RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Comportement de *Lemna minor* et de la microflore totale en présence de différentes dilutions du milieu de Hutner

Comme nous l'avons signalé plus haut (p. 21), la première étape nécessaire pour utiliser l'écosystème de la rhizosphère de *Lemna minor* comme moyen de mesure de la qualité de l'eau consiste à déterminer la concentration adéquate du milieu minéral de Hutner. Les résultats présentés au tableau 3.2 montrent une constante de croissance plus élevée pour la dilution 1:4 du milieu de culture ( $K = 0.069 \pm 2.62\%$ ). Bien que les différences au niveau des constantes de croissance ne soient pas significativement différentes, il semble que cette dilution soit la plus adéquate pour la croissance de *Lemna minor* compte tenu du nombre de frondes obtenu à la fin de la période expérimentale.

Par contre, la croissance de la microflore totale est sensiblement la même dans chaque cas. Ce paramètre n'entre donc pas en conflit avec le précédent. Il est cependant à noter qu'une croissance de cet ordre pour la microflore peut s'expliquer par le fait que les organismes supérieurs de l'écosystème étant pour la majorité éliminés dès les premières heures après le transfert dans leur nouveau milieu, la population des décomposeurs s'accroît dans ce milieu qui leur devient favorable à cause des cadavres présents. C'est donc avec la dilution 1:4 du milieu de Hutner que les expériences suivantes ont été effectuées.

La seconde étape de l'étude consiste à évaluer le contenu en chlo-

rophyllé chez Lemna minor en fonction de la qualité du milieu. Nous avons tout d'abord effectué des tests préliminaires en utilisant différentes quantités de plantes en culture dans le milieu de Hutner 1:4 afin de vérifier si des variations minimes dans le nombre de spécimens présentaient des différences détectables dans le contenu en chlorophylle; pour ce faire, nous avons utilisé la méthode décrite plus haut (p.22 ). Les résultats présentés dans le tableau 3.3 démontrent que des différences minimes ne peuvent être décelées par la méthode utilisée, les valeurs obtenues se chevauchant dans plusieurs cas. Compte tenu de ces résultats et du cadre expérimental de ce mémoire, nous avons décidé de poursuivre l'étude en utilisant d'autres paramètres dont l'évaluation s'avère plus précise et plus concluante.

### 3.2 Croissance de Lemna minor et de la microflore adjointe en présence de pétrole brut et raffiné

Les effets des huiles brutes et raffinées sur la croissance de la plante ainsi que sur la variation du nombre d'organismes de la microflore adjointe sont présentés aux tableaux 3.4 et 3.5. A partir de ces résultats, on peut évaluer le seuil de toxicité de ces huiles, pour Lemna minor et la microflore adjointe; celui-ci se situe aux environs de 0.01  $\mu\text{l/ml}$ . Les huiles raffinées présentent cependant une toxicité plus marquée. Vis-à-vis de la microflore adjointe, on constate que la toxicité des huiles se traduit par un effet bactériostatique s'accroissant avec l'augmentation de la concentration d'huile dans le milieu. La représentation graphique de ces résultats aux figures 3.1 et 3.2 nous montre qu'aux concentrations de 0.01  $\mu\text{l/ml}$ ., il n'y a qu'un léger fléchissement dans la croissance de la plante ainsi que de la microflore totale; pour 0.1  $\mu\text{l/ml}$ ., il y a un temps

d'action de quelques jours puis une recrudescence de croissance, donc un phénomène d'acclimatation au stress par les plantes. Le même phénomène ne semble pas se produire en ce qui concerne la microflore qui subit une diminution dans la croissance. Ce dernier phénomène étant plus perceptible dans le cas du pétrole brut, l'action du pétrole raffiné semble plus néfaste, la phase d'acclimatation arrivant beaucoup plus tard chez Lemna minor tandis que l'effet bactériostatique arrive au bout d'un certain temps mais semble persistant. Aux fortes concentrations, soit 1.0 µl/ml, il y a destruction des plantes dans les deux cas (huiles brutes et raffinées) et l'effet bactériostatique apparaît au bout d'un certain temps et semble, ici aussi, persistant.

Afin de mieux comprendre le mode d'action de ces huiles, nous avons procédé à une analyse de variance afin de déterminer si les variations dans la croissance de Lemna minor étaient imputables aux concentrations utilisées ou au type d'huile (brute ou raffinée). Pour ce faire, nous avons utilisé les données recueillies en triplicata lors des expériences et qui sont contenues dans le tableau 3.1a.

La première étape consiste à analyser les résultats précédents afin de voir si les différences entre les groupes sont significatives.

Le test F (tableau 3.1b) indique que les moyennes des huit (8) populations sont significativement différentes, il s'agit donc de poursuivre l'analyse des résultats afin de déterminer si la variation obtenue provient du type d'huile utilisé (brute ou raffinée) ou des différentes concentrations étudiées. Au tableau 3.2 c, nous obtenons:

L'effet des concentrations

$$\frac{43607.10}{159.32} = 273.70$$

$$F_{95} (3.19) = 3.13$$

Les moyennes des différentes concentrations présentent une différence significative à 5%, elles ne sont donc pas égales.

L'effet des types d'huile

$$\frac{1261.50}{159.32} = 7.91$$

$$F_{95} (1.19) = 4.38$$

Les moyennes des différents types d'huile sont donc significativement différentes, à 5%, elles ne sont donc pas égales.

Nous pouvons donc dire que les deux paramètres ont une influence sur la croissance de Lemma minor, cependant, il est évident que la concentration a une influence plus marquée que le type de pétrole utilisé.

L'observation microscopique nous a révélé une élimination massive des organismes présents dès les premières heures qui suivirent le transfert dans le milieu de Hutner. Ce phénomène apparaissant avant l'introduction du stress, il était donc le résultat d'autres facteurs du nouveau milieu. Nous avons procédé à un contrôle strict des principaux paramètres: température, pH, conductivité, balance ionique du milieu (appendice 6), sans que la cause précise de ce phénomène ne puisse être identifiée. Cependant, à la fin de la période expérimentale (21 jours), nous avons remarqué la présence de nouveaux organismes dans l'écosystème. Il semble que

la communauté disparue au début de la période expérimentale fut remplacée par une nouvelle communauté composée d'organismes présents, au début, en très petit nombre et qui ont trouvé des conditions propices à leur développement. Cette nouvelle communauté est principalement composée de nouvelles espèces de protozoaires, de rotifères et d'algues vertes.

Ce phénomène fut observé à la fois dans les flacons où l'écosystème était soumis à un stress (huiles brutes et raffinées) indépendamment de la concentration, ainsi que dans les flacons témoins. Il est donc évident que les huiles n'ont aucun effet aigu, aux concentrations utilisées, sur les organismes observés. On peut également dire que cette nouvelle communauté d'organismes se développe indépendamment de la plante support.

### 3.3 Synthèse d'acides ribonucléiques chez Lemna minor en présence de pétrole brut

La dernière étape de cette étude consiste à caractériser biochimiquement, de manière partielle, l'action que peut avoir l'huile brute sur la plante support. A cette fin, nous avons choisi de mesurer la synthèse des ARN chez Lemna minor soumise aux mêmes traitements que lors des expériences précédentes. Le tableau 3.6 indique que la synthèse des ARN est respectivement inhibée de 84.1% et 32% lorsque la plante est soumise à une forte (1.0 µl/ml.) et moyenne (0.1 µl/ml.) concentration de pétrole brut. En ce qui concerne les faibles concentrations (0.01 µl/ml.), il semble que, comme dans les cas précédents, on soit en présence d'un seuil de toxicité pour les huiles brutes envers la synthèse des ARN chez Lemna minor.

De ces résultats, nous pouvons dire que l'un des mécanismes causant l'inhibition ou le ralentissement de la croissance chez Lemna minor est l'inhibition de la synthèse des ARN. Ceci s'explique par l'importance de

ces acides nucléiques dans les phénomènes contrôlant la synthèse des protéines, lesquelles sont nécessaires pour qu'il y ait croissance et reproduction puisqu'elles sont les principaux constituants de la matière vivante. Les huiles peuvent aussi agir physiquement en empêchant les échanges gazeux nécessaires au fonctionnement des plantes, et ceci en formant un film à la surface de l'eau. Notons cependant que les huiles ont aussi probablement d'autres modes d'action sur les plantes. Nous pouvons supposer que plusieurs facteurs ont pu intervenir dans le cas présent pour inhiber la croissance des plantes jusqu'à les détruire à forte concentration.

TABLEAU 3.1a: Nombre de frondes de Lemna minor obtenus après traitement avec les huiles brutes et raffinées

| Concentration<br>$\mu\text{l/ml.}$ | Huiles <sup>1</sup> |           |
|------------------------------------|---------------------|-----------|
|                                    | Brutes              | Raffinées |
| Témoins                            | 191                 | 191       |
|                                    | 188                 | 188       |
|                                    | 197                 | 197       |
| $\Sigma$                           | 576                 | 576       |
| 0.01                               | 146                 | 145       |
|                                    | 145                 | 143       |
|                                    | 153                 | 136       |
| $\Sigma$                           | 444                 | 424       |
| 0.1                                | 85                  | 32        |
|                                    | 87                  | 40        |
|                                    | 95                  | 41        |
| $\Sigma$                           | 267                 | 113       |
| 1.0                                | 0                   | 0         |
|                                    | 0                   | 0         |
|                                    | 0                   | 0         |
| $\Sigma$                           | 0                   | 0         |
| NOMBRE TOTAL                       |                     | 2400      |

1 Les résultats sont exprimés en nombre de frondes totales

TABLEAU 3.1b: Analyse de variance entre les groupes du Tableau 3.1a

|                      | Somme des carrés | D.L. | Moyenne des carrés | F                 |
|----------------------|------------------|------|--------------------|-------------------|
| Entre les 8 moyennes | 134,840.66       | 7    | 19,262.95          | 1,135.79          |
| a l'intérieur        | 271.34           | 16   | 16.96              | $F_{95}(7.16)2.6$ |
| Total                | 135,212          | 23   |                    |                   |

TABLEAU 3.1c: Détermination de la provenance de la variation obtenue lors de l'analyse de variance du Tableau 3.1b

|                      | Somme des carrés | D.L. | Moyenne des carrés |
|----------------------|------------------|------|--------------------|
| Moyenne des rangées  | 130,821.32       | 3    | 43,607.10          |
| Moyenne des colonnes | 1,261.50         | 1    | 1,261.50           |
| Résidus              | 3,027.18         | 19   | 159.32             |
| Total                | 135,112          | 23   |                    |

D.L.: Degrés de liberté



TABLEAU 3.2: Recherche de la dilution optimale du milieu de Hutner pour  
la croissance de Lemma minor

| Durée             | Milieu de Hutner                            |                     |                            |                     |                            |                        |
|-------------------|---|---------------------|----------------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
|                   | Dilution 1:2                                |                     | Dilution 1:4               |                     | Dilution 1:8               |                        |
|                   | <u>L. minor</u><br>nb <sup>(1)</sup> /60 ml | microflore<br>nb/ml | <u>L. minor</u><br>nb/60ml | microflore<br>nb/ml | <u>L. minor</u><br>nb/60ml | microflore<br>nb/60 ml |
| Stade initial     | 40  | $2.75 \times 10^3$  | 40                         | $1.65 \times 10^3$  | 40                         | $3.25 \times 10^2$     |
| après<br>7 jours  | $117 \pm 3.8^{(2)}$                         | $9.0 \times 10^3$   | $105 \pm 2.9$              | $2.15 \times 10^4$  | $108 \pm 4.6$              | $1.57 \times 10^4$     |
| après<br>14 jours | $303 \pm 13.2$                              | $3.25 \times 10^6$  | $376 \pm 7.0$              | $7.5 \times 10^6$   | $332 \pm 12.0$             | $7.5 \times 10^6$      |
| K                 | $0.063 \pm 3.94\%$                          |                     | $0.069 \pm 2.62\%$         |                     | $0.065 \pm 3.49\%$         |                        |

(1) nb nombre de frondes

(2) écart-type calculé à partir de 5 valeurs

TABLEAU 3.3: Evaluation du contenu en chlorophylle chez  
Lemna minor en fonction du nombre d'individus.

| nb de<br><u>Lemna minor</u> | D.O.<br>665 | D.O.<br>645 | D.O.<br>630 | $C_{\alpha}^{(1)}$<br>approx. |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------------------------|
| 20                          | 0.148       | 0.068       | 0.040       | 2.0                           |
| 20                          | 0.164       | 0.081       | 0.052       | 2.2                           |
| 20                          | 0.187       | 0.086       | 0.054       | 2.6                           |
| 20                          | 0.152       | 0.064       | 0.038       | 2.1                           |
| 30                          | 0.195       | 0.092       | 0.059       | 2.7                           |
| 30                          | 0.243       | 0.105       | 0.060       | 3.5                           |
| 40                          | 0.224       | 0.102       | 0.059       | 3.2                           |
| 40                          | 0.241       | 0.110       | 0.069       | 3.4                           |

(1) Formule: voir page 23.

TABLEAU 3.4: Croissance de Lemna minor et de la microflore adjointe en présence de pétrole brut

| Durée                   | Dénombrement            |                    |                      |                       |                     |                    |                      |                       |
|-------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|
|                         | <u>Lemna minor</u>      |                    |                      |                       | Microflore adjointe |                    |                      |                       |
|                         | nombre de frondes/20 ml |                    |                      |                       | nombre/ml           |                    |                      |                       |
|                         | Témoin                  | Pétrole<br>1 µl/ml | Pétrole<br>0.1 µl/ml | Pétrole<br>0.01 µl/ml | Témoin              | Pétrole<br>1 µl/ml | Pétrole<br>0.1 µl/ml | Pétrole<br>0.01 µl/ml |
| Stade initial           | 20                      | 20                 | 20                   | 20                    | $2.5 \times 10^2$   | $1.6 \times 10^2$  | $1.7 \times 10^2$    | $2.5 \times 10^2$     |
| Stade après<br>7 jours  | $67 \pm 2.7^{(1)}$      | $8 \pm 3.8$        | $42 \pm 4.1$         | $59 \pm 2.8$          | $1.6 \times 10^4$   | $1.7 \times 10^3$  | $1.6 \times 10^3$    | $8.0 \times 10^3$     |
| Stade après<br>14 jours | $192 \pm 4.6$           | 0                  | $89 \pm 5.3$         | $148 \pm 4.4$         | $1.6 \times 10^6$   | $1.7 \times 10^3$  | $1.1 \times 10^4$    | $6.0 \times 10^5$     |
| K                       | $0.070 \pm 2.84\%$      |                    | $0.046 \pm 5.77\%$   | $0.062 \pm 3.27\%$    |                     |                    |                      |                       |

(1) Ecart-type calculé à partir de 3 valeurs

TABLEAU 3.5: Croissance de Lemna minor et de la microflore adjointe en présence de pétrole raffiné.

| Durée                   | Dénombrement                                  |                    |                      |                       |                                  |                    |                      |                       |
|-------------------------|---|--------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|
|                         | <u>Lemna minor</u><br>nombre de frondes/20 ml |                    |                      |                       | Microflore adjointe<br>nombre/ml |                    |                      |                       |
|                         | Témoin  | Pétrole<br>1 µl/ml | Pétrole<br>0.1 µl/ml | Pétrole<br>0.01 µl/ml | Témoin                           | Pétrole<br>1 µl/ml | Pétrole<br>0.1 µl/ml | Pétrole<br>0.01 µl/ml |
| Stade initial           | 20  | 20                 | 20                   | 20                    | $2.5 \times 10^2$                | $1.6 \times 10^2$  | $1.7 \times 10^2$    | $2.5 \times 10^2$     |
| Stade après<br>7 jours  | $67 \pm 2.7^{(1)}$                            | 0                  | $11 \pm 3.9$         | $50 \pm 2.7$          | $1.6 \times 10^4$                | $1.7 \times 10^3$  | $1.4 \times 10^3$    | $1.1 \times 10^4$     |
| Stade après<br>14 jours | $192 \pm 4.6$                                 | 0                  | $37 \pm 5.0$         | $141 \pm 4.7$         | $1.6 \times 10^6$                | $1.6 \times 10^3$  | $1.7 \times 10^3$    | $9 \times 10^5$       |
| K                       | $0.070 \pm 2.84\%$                            |                    | $0.019 \pm 25.95\%$  | $0.060 \pm 3.49\%$    |                                  |                    |                      |                       |

(1) Ecart-type calculé à partir de 3 valeurs.

TABLEAU 3.6: Synthèse d'ARN chez Lemna minor en présence de pétrole brut

| Traitement <sup>1</sup> | Résultats <sup>2</sup> |
|-------------------------|------------------------|
| Témoin                  | 3520 (0%)              |
| Pétrole: 1 µl/ml        | 560 (-84.1%)           |
| Pétrole: 0.1 µl/ml      | 2392 (-32.0%)          |
| Pétrole: 0.01 µl/ml     | 3528 (0.2%)            |

1 - 7 jours d'équilibration + 7 jours de présence de pétrole brut

2 - dpm/mg d'ARN/gr de Lemna/heure et µc d'incorporation d'uridine <sup>14</sup>C

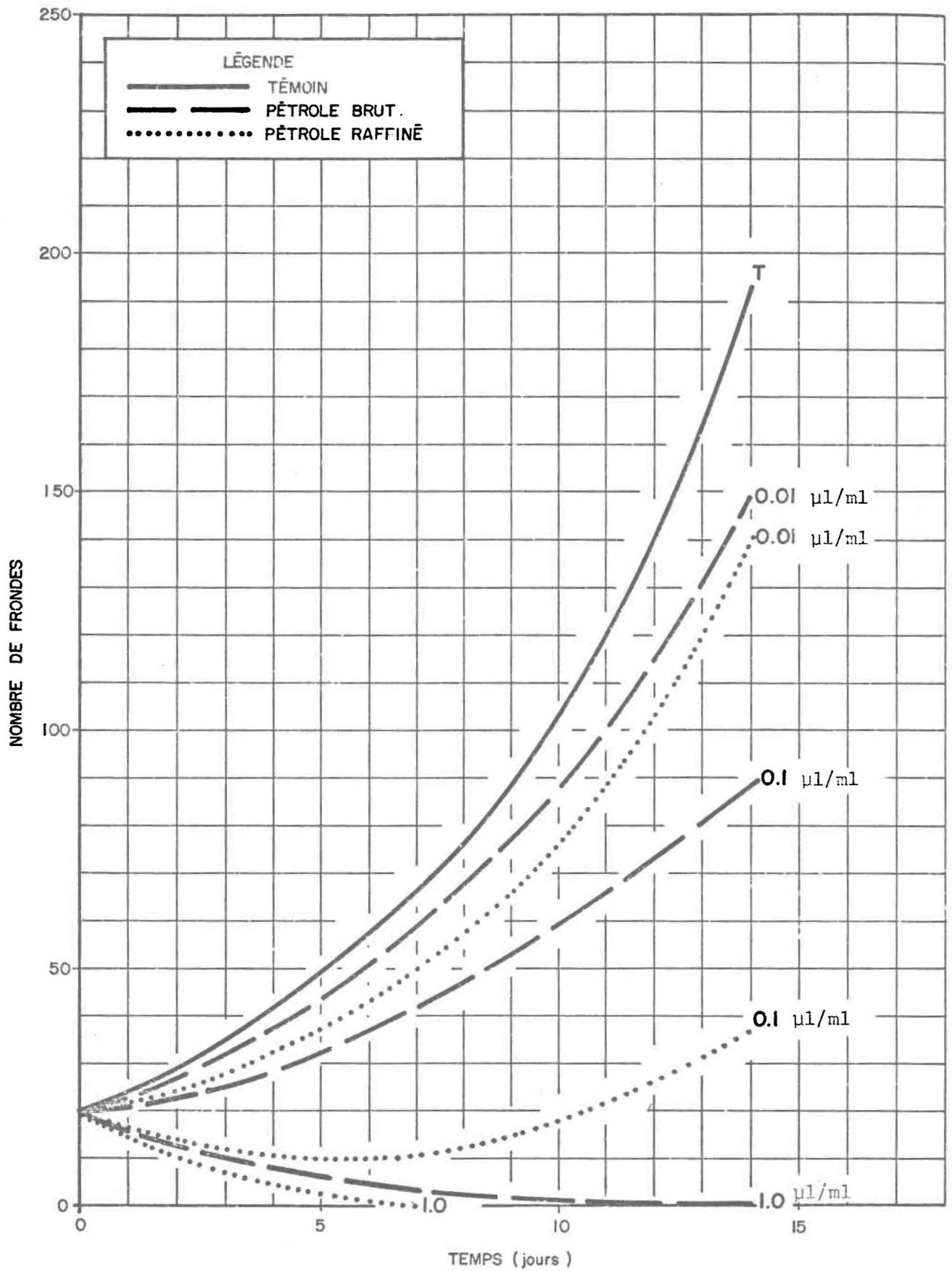


Fig. 3. I. Croissance de *Lemna minor* en présence de pétrole brut et raffiné.

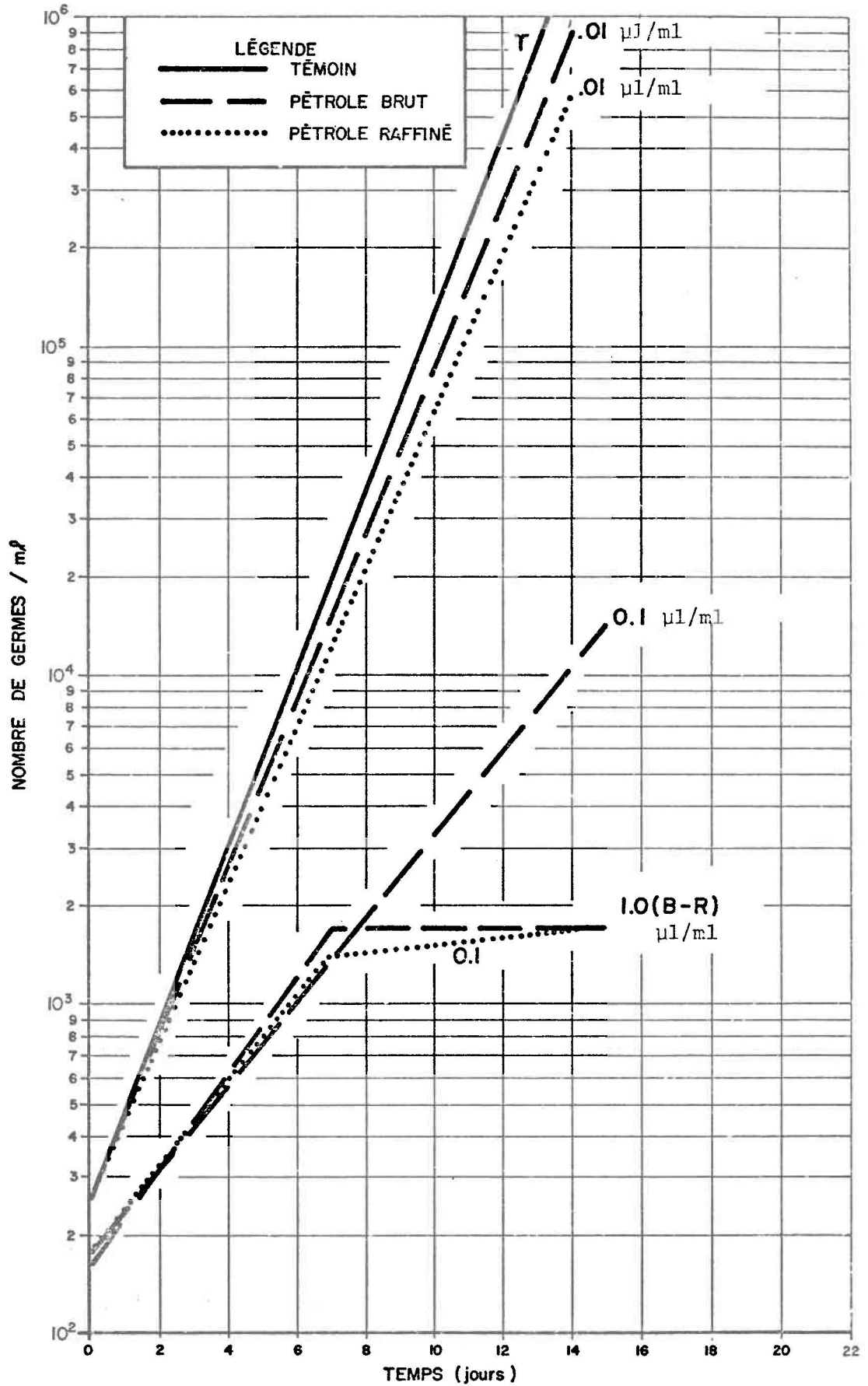


Fig. 3.2 . Croissance de la microflore totale en présence de pétrole brut et raffiné.

## · CONCLUSION

A la suite des expériences effectuées dans le cadre de cette étude, nous pouvons conclure que:

- Les huiles brute et raffinée ont un seuil de toxicité semblable, soit 0.01  $\mu\text{l/ml}$ ., en ce qui concerne la croissance de Lemna minor ainsi que de la microflore adjointe.
- Chez Lemna minor, cette toxicité se manifeste par un ralentissement de la croissance et de la reproduction, ce qui peut même entraîner, à des concentrations plus élevées, la disparition des plantes.
- A des concentrations plus faibles, la croissance des plantes continue après une certaine période d'adaptation alors qu'elle ne semble pas se manifester pour la microflore qui subit un léger fléchissement de son taux de croissance sans recrudescence ultérieure.
- La toxicité de ces huiles sur la microflore totale se traduit par un effet bactériostatique.
- Une des causes de la toxicité des huiles brutes envers la plante serait l'inhibition de la synthèse des acides ribonucléiques nécessaires à la synthèse des protéines de croissance et de reproduction.
- On en déduit qu'à une concentration supérieure à .01 ppm, les huiles brutes et raffinées déversées dans l'écosystème aquatique peuvent causer des dommages sérieux à la végétation et par le fait même compromettre l'équilibre de l'écosystème en question.



- Dès l'introduction des plantes dans le milieu de culture de Hutner, il y a changement en ce qui concerne le nombre de représentants de chaque espèce d'organisme associé à celle-ci; la population initiale est remplacée progressivement par une autre, composée d'espèces différentes qui ont trouvé un milieu qui leur est plus favorable. Cette dernière particularité rend difficile l'étude des effets des huiles sur la population initiale de l'écosystème.
- La nouvelle population semble peu sensible aux huiles brutes et raffinées puisque nous avons retrouvé des populations quantitativement comparables dans chaque flacon indépendamment de la concentration en huile. Cette population se développe aussi bien dans un milieu ne contenant aucune ou peu de plante-support, elle n'est donc pas nécessairement liée à l'écosystème de la rhizosphère de Lemna minor.

Nous pouvons donc recommander, à la suite de cette étude, qu'avant de procéder à des expériences ultérieures utilisant le même écosystème, il serait préférable de trouver en premier lieu un milieu de culture plus adéquat afin de maintenir la population initiale d'organismes associés à Lemna minor. Une fois ce problème résolu, ce qui rendrait le système réellement opérant, nous croyons que celui-ci serait très utile dans les études de pollution et de qualité de l'eau. En effet, le système allie plusieurs avantages; manipulation facile et pratique permettant d'observer les organismes dans leur milieu sans les soumettre aux stress de transfert, possibilité de procéder à plusieurs expériences simultanées dans un minimum d'espace, faible coût de mise en place et d'opération.

## APPENDICE 1

## L'ECOSYSTEME UTILISE PAR S.A. VISSER ET AL. 1973 (25)

Dans le cas présent, l'écosystème est employé comme instrument de mesure du transfert d'azote dans le milieu.

Ces transferts sont mesurés, à l'aide d'azote radioactif  $^{15}\text{N}$  de l'atmosphère aux: fixateurs microbiens (Azotobacter chroococcum ou flore mixte plus Azotobacter chroococcum), à une plante verte (60 Lemna minor), à des décomposeurs, à l'eau (milieu nutritif 10 ml.), et finalement au sol (10g. de Kaolinite) ce dernier étant disposé avec une pente de  $45^{\circ}$  procurant des interfaces sol/air/eau (voir schéma A.1).

L'écosystème présent offre plusieurs possibilités d'études de transferts de matière dans le milieu naturel, ce qui s'avère un nouveau champ d'intérêt dans l'utilisation d'écosystèmes expérimentaux. En effet, l'expérience ci-haut décrite nous montre qu'en plus de servir d'instruments de mesure de la qualité de l'eau, les écosystèmes expérimentaux peuvent aider à comprendre les différents mécanismes impliqués dans le maintien de l'équilibre dynamique nécessaire au bon fonctionnement d'un écosystème naturel.

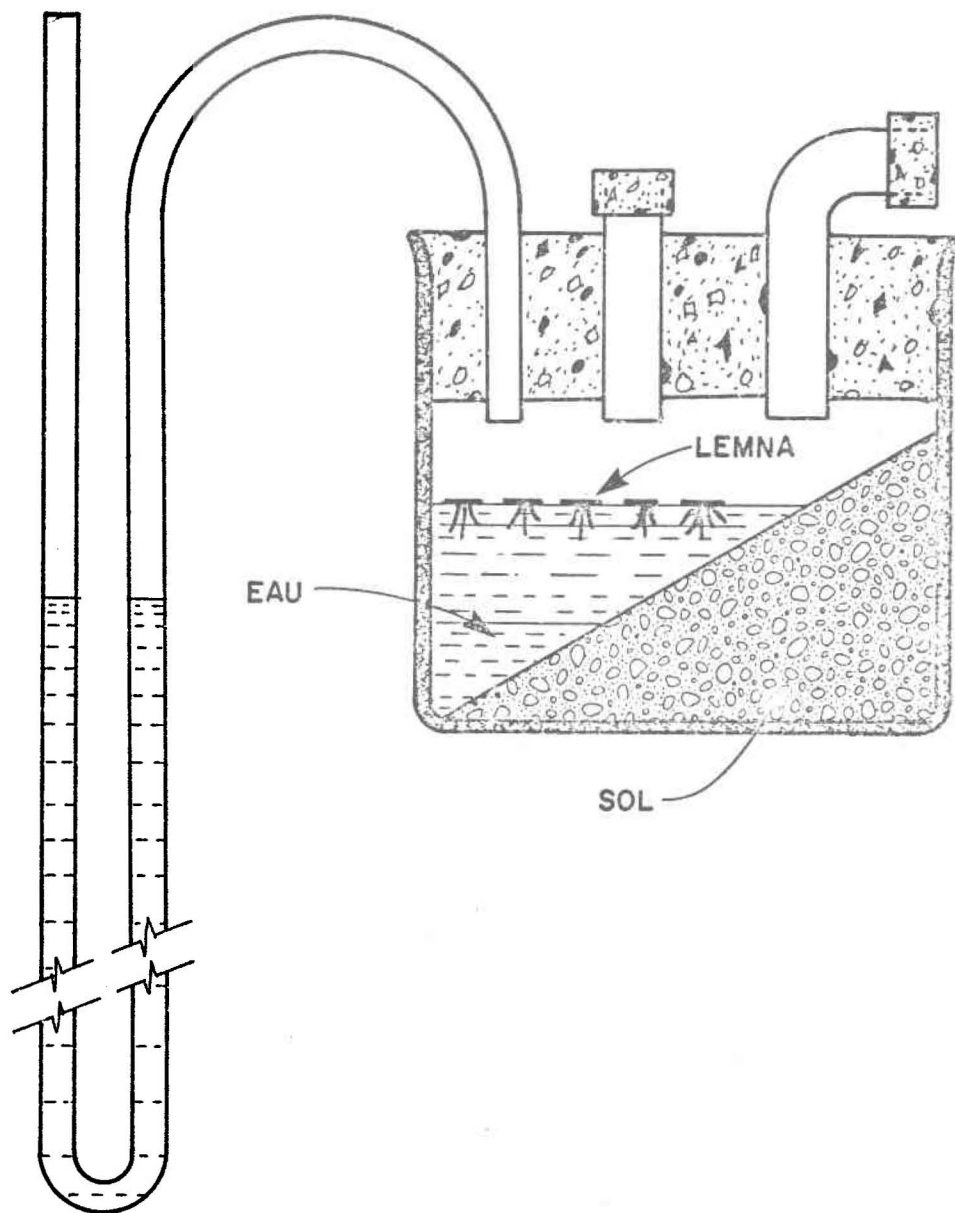


Schéma A.1 . Écosystème pourvu d'un manomètre et de tubes pour les échanges gazeux .

## APPENDICE 2

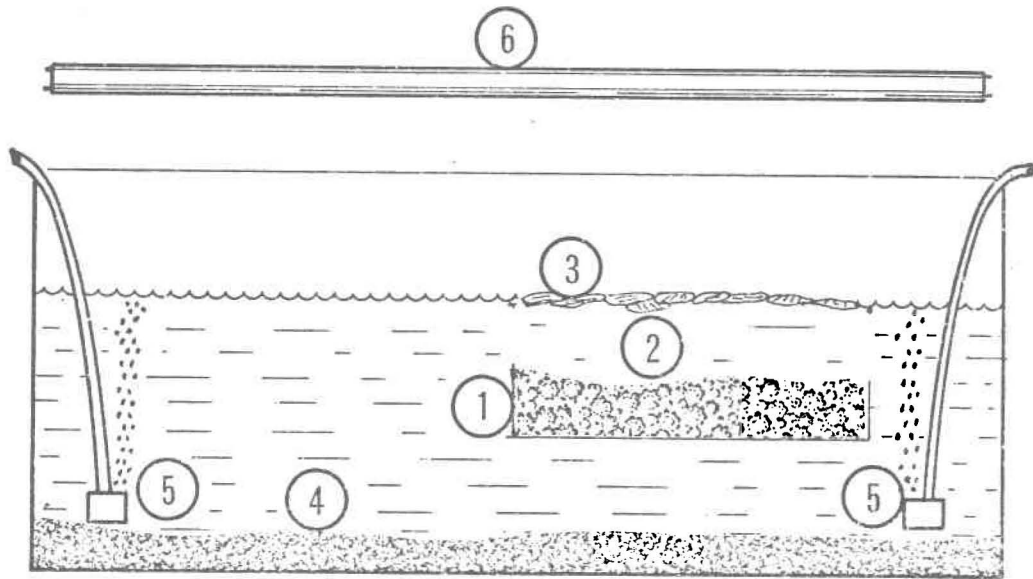
## L'ECOSYSTEME SAUMATRE DE J.C. LACAZE ET AL. 1969 (13)

Ce type d'écosystème est spécifique pour les eaux saumâtres mais le principe est intéressant à souligner et applicable dans la plupart des cas. Les auteurs ont utilisé le milieu naturel comme milieu de culture; ils ont même ajouté des sédiments pour recréer le plus fidèlement possible le milieu naturel.

L'écosystème est contenu dans 4 bacs de 3,000/1 avec un éclairement de 3,000 lux (250 bougies/pied) et une photopériode de 12 heures (voir schéma A.2). Les constituants de l'écosystème renferment deux algues macroscopiques, Chaetomorpha lineum et Cladophora parriandii; des algues microscopiques, Spirulina subsalsa, Oscillatoria chalybea, Lyngbya lutea, Ulvella sp., Exuriella sp. et des diatomées.

La macrofaune y est représentée par des isopodes, amphipodes, gastéropodes, lamelibranches et hydraires et la microfaune par des copepodes, protozoaires ciliés, nématodes, rotifères, gastrotriches, acariens et ostracodes.

Etant donné la complexité de l'écosystème, les auteurs ont préféré porter leur étude sur un seul constituant de l'écosystème, les diatomées du périphyton, plus précisément sur la biostructure de la communauté des Diatomées.



1 = Plateau à algues  
 2 = Chaetomorphes  
 3 = Cladophorales

4 = Sédiment  
 5 = Diffuseur  
 6 = Tube fluorescent

### SCHÉMA A.2.

Schéma d'un bac d'expérimentation .

## APPENDICE 3

## L'ECOSYSTEME UTILISE PAR R.L. METCALF ET AL. 1971 (18)

Cet écosystème expérimental est utilisé pour l'étude de la biodégradation de pesticides marqués radioactivement dans les différents constituants de la chaîne alimentaire.

L'ensemble est maintenu dans un aquarium (10" x 12" x 20") contenant 15 kg. de sable blanc à base de quartz, possédant une pente reproduisant les interfaces sol/air/eau et renfermant 7 litres de milieu nutritif procurant les éléments nécessaires pour les différents constituants de la chaîne alimentaire. Celle-ci est composée des éléments suivants:

- Serphum halpense: une plante terrestre (50 graines)
- Estigmene acrea: un insecte terrestre (10 larves)
- Oegonium cardiacum: une algue
- Daphnia magna: un crustacé planctonique (30 individus)
- Noclearia, Coleps, Vorticella, Paramécium: des protozoaires
- Asplanchnopus, Notomatta, Euclaris, Scaridium: des rotifères
  
- Physa sp.: un mollusque (10 individus)
- Culex pipiens quiquefasciatus: un moustique (300 larves)
- Gambusia affinis: un poisson (3 individus)

Comme les auteurs le soulignent: "La méthode procure une estimation de la toxicité potentielle des produits de dégradation des pesticides

sur une variété d'organismes. Le système semble spécialement convenir pour un modèle d'informatique et pour l'étude des effets de légers changements de propriétés moléculaires sur le potentiel de dégradation que possède le milieu."

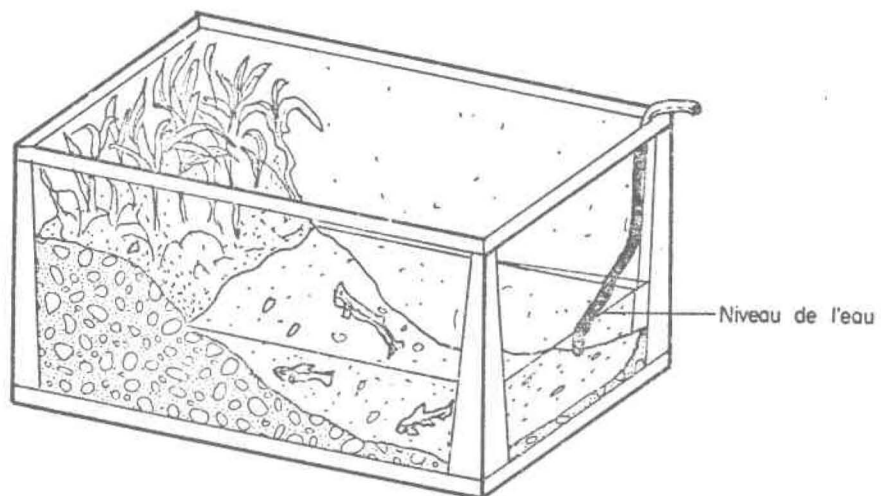


SCHÉMA A.3 .

Vue d'ensemble de l'écosystème utilisé pour l'étude de la biodégradabilité des pesticides .



## APPENDICE 4

TABLE DE McCRADY POUR L'EVALUATION DE LA MICROFLORE TOTALE <sup>1</sup>

5 tubes/dilution

| * Nombre caractéristique | ** Nombre de microbes | Nombre caractéristique | Nombre de microbes | Nombre caractéristique | Nombre de microbes | Nombre caractéristique | Nombre de microbes |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| 000                      | 0,0                   | 203                    | 1,2                | 400                    | 1,3                | 513                    | 8,5                |
| 001                      | 0,2                   | 210                    | 0,7                | 401                    | 1,7                | 520                    | 5,0                |
| 002                      | 0,4                   | 211                    | 0,9                | 402                    | 2,0                | 521                    | 7,0                |
| 010                      | 0,2                   | 212                    | 1,2                | 403                    | 2,5                | 522                    | 9,5                |
| 011                      | 0,4                   | 220                    | 0,9                | 410                    | 1,7                | 523                    | 12,0               |
| 012                      | 0,6                   | 221                    | 1,2                | 411                    | 2,0                | 524                    | 15,0               |
| 020                      | 0,4                   | 222                    | 1,4                | 412                    | 2,5                | 525                    | 17,5               |
| 021                      | 0,6                   | 230                    | 1,2                | 420                    | 2,0                | 530                    | 8,0                |
| 030                      | 0,6                   | 231                    | 1,4                | 421                    | 2,5                | 531                    | 11,0               |
| 100                      | 0,2                   | 240                    | 1,4                | 422                    | 3,0                | 532                    | 14,0               |
| 101                      | 0,4                   | 300                    | 0,8                | 430                    | 2,5                | 533                    | 17,5               |
| 102                      | 0,6                   | 301                    | 1,1                | 431                    | 3,0                | 534                    | 20,0               |
| 103                      | 0,8                   | 302                    | 1,4                | 432                    | 4,0                | 535                    | 25,0               |
| 110                      | 0,4                   | 310                    | 1,1                | 440                    | 3,5                | 540                    | 13,0               |
| 111                      | 0,6                   | 311                    | 1,4                | 441                    | 4,0                | 541                    | 17,0               |
| 112                      | 0,8                   | 312                    | 1,7                | 450                    | 4,0                | 542                    | 25,0               |
| 120                      | 0,6                   | 313                    | 2,0                | 451                    | 5,0                | 543                    | 30,0               |
| 121                      | 0,8                   | 320                    | 1,4                | 500                    | 2,5                | 544                    | 35,0               |
| 122                      | 1,0                   | 321                    | 1,7                | 501                    | 3,0                | 545                    | 45,0               |
| 130                      | 0,8                   | 322                    | 2,0                | 502                    | 4,0                | 550                    | 25,0               |
| 131                      | 1,0                   | 330                    | 1,7                | 503                    | 6,0                | 551                    | 35,0               |
| 140                      | 1,1                   | 331                    | 2,0                | 504                    | 7,5                | 552                    | 60,0               |
| 200                      | 0,5                   | 340                    | 2,0                | 510                    | 3,5                | 553                    | 90,0               |
| 201                      | 0,7                   | 341                    | 2,5                | 511                    | 4,5                | 554                    | 160,0              |
| 202                      | 0,9                   | 350                    | 2,5                | 512                    | 6,0                | 555                    | 180,0              |

\* Nombre de tubes positifs à chaque dilution

\*\* Correction en fonction de la dilution pour avoir le nombre de germes par millilitre

<sup>1</sup> Tiré de POCHON, J. et P. TARDIEUX (22)

## APPENDICE 5

## COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE DE HUTNER (11)

|                      |   |
|----------------------|---|
| $K_2HPO_4$           | 0.04 g  |
| EDTA                 | 0.05 g  |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.05 g  |
| $NH_4NO_3$           | 0.02 g  |
| Ca                   | 6.0 mg ( $CaCO_3$ facteur 2.50 dissout dans un minimum de $HNO_3$ ) |
| Zn                   | 1.5 mg ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ; facteur 4.39)                       |
| Mn                   | 0.5 mg ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; facteur 3.08)                        |
| Fe                   | 0.5 mg ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; facteur 4.98)                       |
| B                    | 1.0 mg ( $H_3BO_3$ ; facteur 5.72)                                  |
| Mo                   | 1.0 mg ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ; facteur 2.52)                    |
| Cu                   | 0.1 mg ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; facteur 3.94)                       |
| Co                   | 0.04 mg ( $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ ; facteur 4.76)                      |

Les éléments traces de cette liste sont indiqués sous forme de métal ou sous forme de sel; les facteurs gravimétriques sont donnés pour faciliter le calcul lorsqu'on pèse le sel pour obtenir le poids désiré du métal. Il est recommandé de préparer une solution stock 100 fois concentrée des éléments traces en omettant le Ca et le Fe. Cette solution stock doit être légèrement acidifiée pour éviter la précipitation; la solution stock de Fe par ailleurs doit être fortement acidifiée. Le pH est ajusté entre 5.6 et 6.0 avec une solution de KOH fraîchement préparée et le volume final est complété à 100 ml.

## APPENDICE 6

## CAUSES POSSIBLES DE LA DISPARITION DES ORGANISMES DE L'ECOSYSTEME

Les observations microscopiques effectuées après l'introduction de Lemna minor dans les flacons expérimentaux nous ont révélé l'absence d'organismes qui sont normalement introduits avec les plantes. Nous avons donc cherché les causes possibles de cette disparition. Quelques paramètres ont été écartés au départ puisqu'ils ne pouvaient causer des fluctuations dans la population vu qu'ils étaient identiques dans les flacons et dans la culture-stock: la température (24°C), la conductibilité (5.5 milli. MHO) et la balance ionique. Nous avons par la suite mesuré le pH dans l'aquarium de notre culture-stock afin de voir s'il était sensiblement différent du milieu de Hutner (5.6 - 6.0). Nous n'avons pas procédé à des mesures semblables auparavant car il n'y avait aucune mention dans la littérature de difficultés dans le transfert des plantes en ce qui a trait aux organismes associés. Nous avons procédé à des mesures durant deux jours consécutifs à différentes heures de la journée. Le tableau A.6 montre une fluctuation assez importante du pH de l'aquarium durant 24 heures. Cette fluctuation est principalement due aux échanges gazeux effectués par les plantes; durant la journée, il y a photosynthèse et donc utilisation du CO<sub>2</sub>, ce qui rend le milieu plus basique tandis que le soir la photosynthèse diminue et la respiration domine, ce qui favorise le rejet de CO<sub>2</sub> et acidifie ainsi le milieu. Lors de nos expériences, nous avons effectué le transfert des plantes au milieu de la journée au moment où le pH de l'aquarium est assez basique (≈8.5) alors que celui du milieu de Hutner est plus acide (≈5.8). Cette différence pouvait être suffisante pour causer la mort de nombreux organismes présents. Nous avons donc choisi de réaliser les transferts de plantes très tôt le matin afin d'amoindrir la différence précitée de pH.

Toutefois, même en ayant pris toutes les précautions possibles, il y avait une disparition d'organismes. Nonobstant ceci, comme nous l'avons mentionné plus haut (voir discussion 3.2), ce n'était pas une destruction systématique mais plutôt un phénomène de remplacement d'une population par une autre à cause du changement des conditions du milieu.

TABLEAU A.1

Variations du pH de la culture-stock  
de Lemna minor durant deux jours consécutifs

| HEURES     | pH       |         |
|------------|----------|---------|
|            | 1er jour | 2e jour |
| 8:30 A.M.  | 7.7      | 7.54    |
| 11:00 A.M. | 8.0      | 7.84    |
| 2:00 P.M.  | 8.89     | 8.27    |
| 4:00 P.M.  | 8.88     | 8.29    |
| 9:00 P.M.  | 8.75     | 8.15    |

## BIBLIOGRAPHIE

1. ASHBY, E., 1929, "The interaction of factors in the growth of Lemna". "III The interrelationship of duration and intensity of light", Ann. Bot., 43: 333-354.
2. ASHBY, E. et OXLEY, T.A., 1935, "An analysis of the influence of light intensity and temperature on the assimilation rate and rate of frond multiplication". Ann. Bot., 49: 309-336.
3. CLARK, N.A., 1925, "The rate of reproduction of L. minor as a function of intensity and duration of light". J. Physical Chem., 29: 935-941.
4. COLER, R.A. et GUNNER, H.B., 1969, "The rhizosphere of an aquatic plant (Lemna minor)". Can. Jour. Microbiol., 15: 964-966.
5. COLER, R.A. et GUNNER, H.B., 1971, "The response of a specialized aquatic ecosystem, the duckweed rhizosphere, to selected environmental influence". Water Research, 5: 329-333.
6. COLER, R.A. et GUNNER, H.B., 1970, "Laboratory measure of an ecosystem response to a sustained stress". Appl. Microbiol., 19: 1009-1012.
7. COPELAND, B.J., 1966, "Effects of industrial waste on the marine environment". J. Wat. Poll. Contr. Fed., 38: 1000-1010.
8. COPELAND, B.J. et DORRIS, T.C., 1964, "Community metabolism in ecosystem receiving oil refinery effluents". Limnol. and Oceanogr., 9: 431-447.

9. DAWSON, R.M.C., ELLIOTT, D.C., ELLIOTT, W.H. et JONES, K.M., 1969, Data for biochemical research. Oxford University Press, V.K., 2nd ed.
10. HILLMAN, W.S., 1954, On the mechanism of action of benzimidazole on Lemna minor. Ph.D. Diss., Yale Univ., U.S.A.
11. HUTNER, S.H., 1953. Comparative physiology of heterotropic growth. Ph.D. Diss., Iowa State College Press, U.S.A.
12. KNIGHT, G.J., 1956, "Report on oily substances and their effects on the beneficial uses of water". State Water Poll. Contr. Brd., Sacramento, Calif., publ. No. 16.
13. LACAZE, J.C., HALLOPEAU, C. et VOIGT, M., 1969, "Recherches préliminaires en laboratoire sur des écosystèmes saumâtres expérimentaux"., Bull. Mus. Nat. Hist. Nat., 41: 1278-1289.
14. LANDOLF, E., 1957, "Physiologische und ökologische untersuchungen an Lemnaceen". Ber. Schweiz. Bot. Gess., 67: 271-410.
15. LINDEMAN, W., 1951, "The influence of Phosphate on the photosynthesis of Lemna minor". Kon. Neder. Akad. Wetensch., 54c: 287-295.
16. LUTHER, H., 1951, "Verbreitung höherer Wasserplanzen im brackish Wasser Finnlands". Acta. Bot. Fennica., 50: 1-370.
17. MARIE-VICTORIN, Fr., 1964, Flore laurentienne, Presses de l'Univ. de Montréal, Canada, 2e éd.

18. METCALF., R.L., CURCHARAN, K.S. et KAPOOR, L.P., 1971, "Model ecosystem for evaluation of pesticide biodegradability and ecological magnification". *Environm. Sci. Techn.*, 5: 709-713.
19. ODUM, H.T. et HOSKIN, C.M., 1957, "Metabolism of a laboratory stream ecosystem". *Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Tex.*, 4: 115-133.
20. PARSONS, T.R. et STRICKLAND, J.D.H., 1963, "Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids". *J. Marine Research*, 21: 155-163.
21. PIRSON, A. et GÖLLNER, E., 1953, "Beobachtungen zur Entwicklungsphysiologie der Lemna minor". *Flora*, 140: 485-498.
22. POCHON, J. et TARDIEUX, P., 1962, Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Coll. "Techniques de Base", Ed. de la Tournelle, Paris, France.
23. SASSEVILLE, J.L., 1968, Revue de la littérature sur les méthodes de contrôle et les mécanismes d'impact sur les écosystèmes terrestres et d'eaux douces des pertes d'huiles brutes aux différents niveaux de leur manipulation. Non-publiée.
24. STEINBERG, R.A., 1946, "Mineral requirements of Lemna minor". *Plant. Physiol.*, 21: 42-48.
25. VISSER, S.A., WITKAMP, M. et DAHLMAN, R.C., 1973, "Flow of microbially fixed nitrogen in a model ecosystem". *Plant and Soil*, 38: 1-8.

26. WHITE, H.L., 1936, "The interaction of factors in the growth of Lemna. VII. the effect of potassium on growth and multiplication". Ann. Bot., 50: 175-196.
27. WHITE, H.L., 1936, "The interaction of factors in the growth of Lemna. VIII. the effect of nitrogen on growth and multiplication". Ann. Bot., 50: 403-418.
28. WHITE, H.L., 1936, "The interaction of factors in the growth of Lemna. IX. Further observations on the effect of light intensity on growth and multiplication". Ann. Bot., 50: 827-848.
29. WHITE, H.L., 1937, "The interaction of factors in the growth of Lemna. XI. The interaction of nitrogen and light intensity in relation to growth and assimilation". Ann. Bot., n.s.1: 623-648.
30. WHITE, H.L., 1937, "The interaction of factors in the growth of Lemna. XII. The interaction of nitrogen and light in relation to root length". Ann. Bot., n.s.1: 649-654.
31. WHITE, H.L., 1938, "The interaction of factors in the growth of Lemna. XIII. The interaction of potassium and light intensity in relation to root length". Ann. Bot., n.s.2: 911-918.
32. WHITE, H.L., 1939, "The interaction of factors in the growth of Lemna. XIV. The interaction of potassium and light intensity in relation to growth and assimilation". Ann. Bot., n.s.3: 619-148.



33. WHITE, H.L., 1949, "The interaction of factors in the growth of Lemna. XV. On a rythmic growth of Lemna colonies associated with transference of a potassium-free nutrient solution". Ann. Bot., n.s.4: 495-504.
34. WHITE, H.L. et TEMPLEMAN, W.G., 1937. "The interaction of factors in the growth of Lemna. X. The interaction of nitrogen and light intensity in relation to respiration". Ann. Bot., n.s.1: 191-204.