

Record Number:

Author, Monographic: Couture, P.//Auclair, J. C.//Thompson, P. A.//Thellen, C.

Author Role:

Title, Monographic: Approche écotoxicologique pour caractériser les répercussions d'effluents
au niveau population et communauté microbienne aquatique

Translated Title:

Reprint Status:

Edition:

Author, Subsidiary:

Author Role:

Place of Publication: Québec

Publisher Name: INRS-Eau

Date of Publication: 1985

Original Publication Date:

Volume Identification:

Extent of Work: xiii, 105

Packaging Method: pages

Series Editor:

Series Editor Role:

Series Title: INRS-Eau, Rapport de recherche

Series Volume ID: 181

Location/URL:

ISBN: 2-89146-179-7

Notes: Rapport annuel 1984-1985

Abstract: 15.00\$

Call Number: R000181

Keywords: rapport/ ok/ dl

Rapport final
No de dossier MAS
20ST.KE 303-3-0171

Approche écotoxicologique
pour caractériser les répercussions
d'effluents au niveau population et
communauté microbienne aquatique

INRS-Eau
Rapport scientifique no 181

Pierre Couture
Jean-Christian Auclair
Patsy-A. Thompson
Claude Thellen

- INRS-Eau (Université du Québec), C.P. 7500
Sainte-Foy, Québec G1V 4C7
- Éco-Recherches (Canada) Inc., 121, Boul. Hymus,
Pointe-Claire, Québec H9R 1E6

ABSTRACT

The limits of the classical laboratory approach using algal bioassays are discussed and an approach based on the use of functional parameters is proposed as a means of detecting acclimatory and non-acclimatory responses of microbial communities exposed to toxic effluents. The experiments with cadmium and an industrial effluent were carried out in the laboratory with the Chlorophyceae Selenastrum capricornutum and in the field with the microbial community of the St-Louis river.

Parameters related to structure (taxonomic composition, chl-a and total adenylates) and function (photosynthesis per unit chl-a: P/B; adenylate ratios: energy charge $EC_A = (ATP + 0.5 ADP)/(ATP + ADP + AMP)$; ATP/ADP; ATP/AMP) revealed a non-acclimatory response in the spatio-temporal scale studied. In particular significant irreversible (in the time-scale studied) reductions of the ATP/AMP and P/B ratios are brought about by the discharge of industrial effluent in the river.

From the results we conclude that i) to determine the impacts of toxic substances on the turn-over rate of the microbial community changes in the concentration of cell constituents are more reliable than the changes observed in the rates of metabolic pathways which can be modified by the acclimatory responses of cells to the variable conditions of the environment; ii) rates of metabolic processes can nevertheless be used to determine the reversability of the toxic effect or as an indicator of the relative time needed for acclimatation.

SOMMAIRE

Après avoir procédé à une analyse des limites de l'approche classique concernant l'utilisation des bio-essais avec algues en laboratoire, une approche basée sur l'utilisation de variables fonctionnelles nous permettant de mettre en évidence un processus d'acclimatation ou, encore, de non-acclimatation de microorganismes soumis à des conditions toxiques est proposée.

Les hypothèses de travail sont d'abord vérifiées au laboratoire avec l'algue verte Selenastrum capricornutum, puis appliquées à la communauté indigène microbienne d'une rivière.

Les tests réalisés en laboratoire pour préciser la toxicité du Cd font ressortir la sensibilité de l'efficacité photosynthétique (rapport P/B) par rapport à charge énergétique (i.e. $CE_A = ([ATP] + \frac{1}{2} [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$), l'ATP, les adénylates totaux et les dénombrements cellulaire. Par contre, les tests réalisés sur un effluent industriel permettent, au moyen de l'efficacité photosynthétique et la CE_A , de discerner une réponse acclimative aux concentrations sub-létales entre t_{24} et t_{96} qui n'apparaît pas avec les données de biomasse et le taux de croissance. Par ailleurs, lors d'une seconde série d'expériences, l'ensemble des variables à l'exception de la CE_A met en évidence la réversibilité des effets dus au cadmium jusqu'à $32 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$, en fonction de la durée d'exposition au métal alors que pour l'effluent industriel les effets néfastes sont irréversibles après 24 h bien qu'ils soient réversibles après 96 h. La CE_A s'est avérée non sensible au Cd jusqu'à $32 \mu\text{g.L}^{-1}$ alors qu'une chute brusque et irréversible fut observée avec 25% d'effluent (v/v).

En ce qui concerne les expériences in situ, les processus d'acclimatation ou de mortalité chez une communauté microbienne lotique, soumise à diverses concentrations de cadmium ou d'effluent industriel, sont discriminés en comparant les réponses détectées à partir de variables représentatives de la biomasse cellulaire (chlorophylle-a, somme des nucléotides adénylates) avec celles associées à des mesures de taux métaboliques (assimilation de carbone, charge énergétique en adénylates). Les effets reliés à

l'action du cadmium sont réversibles alors que ceux associés à l'effluent ne le sont pas. Dans les deux cas, la fixation du carbone est rapidement inhibée alors que la diffusion des constituants cellulaires est lente et ne peut être décelée qu'après 8 heures d'exposition avec le cadmium. Par contre, la perte de constituants cellulaires chez la communauté soumise à l'effluent industriel est immédiate et décroît de façon exponentielle. La mortalité est nettement détectée à partir du taux de diminution de la charge énergétique. Les principales conclusions qui découlent de cette étude sont les suivantes: (1) lorsqu'il est pertinent de préciser l'impact de substances altérageènes sur les taux de recouvrement de la communauté microbienne, les changements dans la concentration des constituants cellulaires sont plus fiables que les changements observés dans les taux de processus métabolique, lesquels sont modifiés par l'acclimatation des cellules aux diverses conditions environnementales; (2) les déterminations de taux de processus métaboliques peuvent être utilisées pour préciser si l'effet des toxiques est réversible ou, encore, comme un indicateur du temps relatif d'acclimatation.

Enfin, diverses caractéristiques structurelles et fonctionnelles des communautés phytoplanctonique et microbienne d'une rivière polluée sont évaluées et proposées comme une alternative au dépistage des dangers environnementaux suite aux déversements d'effluents industriels toxiques. Bien que la structure de la communauté phytoplanctonique soit demeurée semblable le long du gradient de rivière, les variations significatives des rapports P/B et ATP/AMP montrent le manque d'acclimatation de la communauté à l'intérieur du tronçon de rivière étudié. La charge énergétique en nucléotides adénylates (CE_A) diminue à la station qui reçoit les eaux résiduaires toxiques; cependant, aucune différence significative ne persiste au niveau des trois sections situées en aval de l'égout industriel. La CE_A semble un indicateur métabolique moins sensible que le rapport ATP/AMP, lequel est réputé contrôler certaines activités enzymatiques. Il apparaît donc que les rapports P/B et ATP/AMP soient utiles pour détecter les effets insidieux au niveau de la communauté microbienne alors que les effets toxiques directs (i.e. diminution de la biomasse, modification de la structure de la communauté) ne soient pas perceptibles. De plus, l'approche utilisée ici permet d'obtenir une information fiable des effets écotoxicologiques des effluents dans une perspective de surveillance de la qualité des eaux résiduaires.

EXECUTIVE ABSTRACT

After analysing the limits of the classical laboratory approach using bioassays with algae, an approach based on the use of functional parameters is proposed as a means of detecting acclimatory or non-acclimatory responses of microbial communities exposed to toxic chemicals.

A laboratory population of Selenastrum capricornutum was first used to verify our hypotheses which were then applied to the microbial community of a river.

Structural and functional parameters of populations of S. capricornutum exposed to various concentrations of cadmium and of an industrial effluent revealed differences in the modes of action of the two toxic substances. In both cases the growth rate and photosynthetic efficiency of the algae were inhibited. The degree of recovery of the algae after 24 and 96 h exposures to cadmium concentrations of 2 to 32 $\mu\text{g.l}^{-1}$ reveals that the toxicity of cadmium is a function of concentration and duration of exposure. Furthermore, it appears that (over 96 h) part of the metal absorbed is permanently retained by the cells. In fact, even if during the 96 h recovery experiment growth and photosynthetic efficiency are higher than the values observed in the contaminated medium at t_{96} , control values are not reached. Moreover the EC_A measured in these populations is representative of exponential and stationary growth phases and does not appear related to cadmium concentrations.

The industrial effluent experiment suggests that S. capricornutum is not viable at effluent concentrations $>25\%$. This is evidenced by EC_A values which remain lower than 0.5 for the duration of the experiment. At t_{24} growth, photosynthetic efficiency and EC_A are reduced at all effluent concentrations whereas at the end of the experiment, in effluent concentrations $<25\%$ photosynthetic efficiency and EC_A are higher than control values. This suggests that the algal populations acclimate to the effluent; it is however impossible to eliminate the hypothesis that evaporation of residual chlorine during the experiment reduced the toxicity of the effluent.

Many authors question the validity of predictions made from the results of bioassays with monospecific populations such as S. capricornutum. It would be advantageous if the use of structure-function relationships in monospecific screening tests could improve extrapolations to conditions in the environment. In the case of the industrial effluent our results suggests that the effects observed in the laboratory on photosynthesis, chl-a and EC_A agree with the effects observed on the St-Louis river indigenous phytoplanktonic community during enclosure and in situ (transects) experiments. In enclosures decreases in chl-a appear at effluent concentrations >10%. Furthermore a marked loss of viability, indicated by a $EC_A < 0.5$ is rapidly observed in the communities exposed to 25 and 50% effluent. The experiment with S. capricornutum had revealed a sensitivity of similar importance to the effluent. In fact at t_{24} of the S. capricornutum experiment 30% (1% effluent) to 100% (10 and 25% effluent) inhibition of photosynthesis was observed corresponding to the effects observed in the phytoplanktonic community. It would also seem that the duration of the enclosure experiment was too short to observe the acclimatory responses appearing at t_{96} of the laboratory experiment.

Despite the fact that in the river the microbial community is in contact with the effluent for a relatively short time (0.5 - 6.6 h) and that the effluent concentrations are relatively low (<25%), toxic effects are nevertheless observed. Without a decrease in biomass, reductions in carbon assimilation and photosynthetic efficiency as high as 95% are observed (station B3, directly at the effluent outfall). This inhibition of photosynthesis is accompanied by a reduction of EC_A to a value below 0.5 which suggests a loss of viability. It is however only transitory. This is in agreement with the laboratory experiments with S. capricornutum which suggest that the EC_A remains low only in cases of acute toxicity.

The prediction of cadmium toxicity for an indigenous phytoplanktonic community from the results of the S. capricornutum experiment carried out in modified AAP medium is erroneous. In these experiments the effects of cadmium on chl-a appear in the 16 and 32 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ concentrations whereas the effects on photosynthetic efficiency are perceived at the cadmium

concentrations $>2 \mu\text{g.l}^{-1}$. In comparison, during the enclosure experiment a $1000 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ is necessary to bring about a significant inhibition of photosynthesis. These results are not unexpected considering that the metal complexing capacity of natural waters is much higher than that of the modified AAP medium.

In conclusion, the results of this report establish the usefulness of functional parameters in characterizing the effects of toxic chemicals. Although the use of the EC_A appears limited to the detection of substances on concentrations producing lethal effects, the ATP/AMP ratio and more particularly photosynthetic efficiency appear sensitive to toxic manifestations. In our opinion the ATP/AMP ratio should be further investigated to better understand its potential use as a toxicity screening tool and its physiological significance.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Abstract	i
Sommaire	ii
Executive abstract	iv
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	xi
1. Introduction générale	1
2. Problématique	4
3. Approche expérimentale	9
3.1 Synthèse des connaissances sur les approches expérimentales en toxicologie et en écotoxicologie aquatique	10
3.2 Synthèse des connaissances sur les variables étudiées	13
4. Utilisation de relations structure-fonction dans la détermination de la toxicité relative avec <u>Selenastrum</u> <u>capricornutum</u> : une étude de cas avec le cadmium et un un effluent industriel	16
4.1 Introduction	18
4.2 Matériel et méthodes	19
4.3 Résultats et discussion	24
4.3.1 Expérience avec le cadmium	24
4.3.2 Expérience avec un effluent industriel	36
4.4 Conclusion	43

5.	L'importance du concept de charge énergétique pour distinguer entre l'acclimation et la perte de viabilité de communautés microbiennes aquatiques soumises à des agressions toxiques ...	45
5.1	Introduction	47
5.2	Matériel et méthodes	48
5.3	Résultats	52
5.3.1	Expérience avec le cadmium	52
5.3.2	Expérience avec l'effluent industriel	59
5.4	Discussion	65
6.	Caractéristiques structurelles et fonctionnelles de communautés phytoplanctoniques et microbiennes en relation avec la décharge d'effluent industriel: une approche écotoxicologique	69
6.1	Introduction	70
6.2	Matériel et méthodes	73
6.2.1	Site d'étude	73
6.2.2	Méthodes	75
6.3	Résultats et discussion	75
6.3.1	Structure de la communauté phytoplanctonique	76
6.3.2	Caractéristiques fonctionnelles: rapport P/B	79
6.3.3	Caractéristique fonctionnelle: CE_A	83
6.4	Conclusion	88
7.	Conclusion	90
8.	Bibliographie	94

ANNEXE 1

LISTE DES TABLEAUX

	<u>Page</u>
Chapitre 3:	
Tableau 1: Principaux avantages et désavantages de l'utilisation de culture en turbidostat (A) et en chémostat (B): adapté de Wong <u>et al.</u> (1983) et Solomons (1972)	12
Tableau 2: Principaux avantages et désavantages dans l'utilisation du dénombrement cellulaire et de la mesure de densité optique	14
Chapitre 4:	
Tableau 1: Caractéristiques chimiques de l'effluent de l'usine de chlore-alcali (Fedida, 1982)	21
Tableau 2: Toxicité du cadmium et de l'effluent industriel pour <u>S. Capricornutum</u> (A) exprimée en CI-50-96 h pour chaque paramètre mesuré et (B) corrélation avec les densités cellulaires	26
Tableau 3: Taux de croissance moyen de <u>S. capricornutum</u> contaminé avec diverses concentrations de cadmium au cours des expériences d'exposition et de récupération 24 et 96 h .	28
Tableau 4: Variations de l'efficacité photosynthétique et de la CE _A de populations de <u>S. capricornutum</u> soumises à diverses concentrations de cadmium pendant 96 h	33
Tableau 5: Taux moyen de croissance de <u>S. capricornutum</u> soumises à diverses concentrations d'effluent pendant 96 h	38

Tableau 6: Variations de l'efficacité photosynthétique et de la CE_A de <u>S. capricornutum</u> contaminé avec diverses concentrations d'effluent industriel pendant les expériences d'exposition et de récupération	39
Chapitre 5:	
Tableau 1: Caractéristiques chimiques de l'effluent de l'usine de chlore-alcali (Fedida, 1982).....	49
Tableau 2: Analyse de variance menée sur les mesures de CE_A de l'expérience avec le cadmium	55
Tableau 3: Constantes de vitesse de premier ordre calculées avec les valeurs provenant de l'expérience avec l'effluent. (valeur r^2 entre parenthèse, na = pas un ajustement log-linéaire)	64
Chapitre 6:	
Tableau 1: Les caractéristiques physiques, chimiques et microbiologiques de l'effluent et de l'eau de surface de la rivière St-Louis	77
Tableau 2: Composition taxonomique et abondance relative (%) des diatomés dominantes	78
Tableau 3: Analyse de variance sur les données de rapport P/B, de CE_b et de rapport ATP/AMP récoltées sur la rivière Saint-Louis le 4 et 5 octobre 1984	84
Tableau 4: Variation des rapports ATP/ADP et ATP/AMP de la communauté microbienne en amont (transect A) et en aval (transects B, C, et D) de la décharge d'effluent le 5 octobre 1984	87

LISTE DES FIGURES

	<u>Page</u>
Chapitre 4:	
Figure 1: Croissance de populations de <u>S. capricornutum</u> contaminées avec diverses concentrations de cadmium (A) et pendant les expériences de récupération 24 (B) et 96 h (C)	25
Figure 2: Variations des concentrations d'ATP par cellule chez des populations de <u>S. capricornutum</u> contaminées avec diverses concentrations de cadmium (A) et pendant les expériences de récupération 24 (B) et 96 h (C)	29
Figure 3: Efficacité photosynthétique (% du témoin) de <u>S. capricornutum</u> après 24 h de croissance à diverses concentrations de cadmium	32
Figure 4: Efficacité photosynthétique (% du témoin) de <u>S. capricornutum</u> à la fin de l'expérience de récupération de 96	35
Figure 5: Croissance de populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à divers concentratins d'effluent industriel (A) et pendant les expériences de récupération 24 (B) et 96 h (C)	37
Figure 6: Variations de la concentration d'ATP par cellule chez des populations de <u>S. capricornutum</u> exposées à diverses concentrations d'effluent industriel (A) et pendant les expériences de récupération 24 (B) et 96 h (C)	41

Chapitre 5:

Figure 1:	Localisation de la rivière St-Louis et des stations d'échantillonnage	50
Figure 2:	Assimilation du carbone 14 avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium: $8.99 \mu\text{g.l}^{-1}$; $100 \mu\text{g.l}^{-1}$; $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$	53
Figure 3:	Variations de la charge énergétique avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium. Symboles cf. fig. 2	54
Figure 4:	Variations de chlorophylle- <u>a</u> avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium	56
	Symboles cf. fig. 2.	
Figure 5:	Variations des adénylates totales avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium	57
	Symboles cf. fig. 2.	
Figure 6:	Variations de la charge énergétique avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent contrôle: 10%, 25%, 50%	60
Figure 7:	Variations de chlorophylle- <u>a</u> avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent	61
	Symboles cf. fig. 6.	
Figure 8:	Variations des adénylates totales avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent	62
	Symboles cf. fig. 6.	
Figure 9:	Assimilation du carbone 14 avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent	63
	Symboles cf. fig. 6	

Chapitre 6:

Figure 1:	Site de l'étude: localisation des stations d'échantillonnage	74
Figure 2:	Variations des rapports P/B aux transects A, B, C et D, les 4 et 5 octobre 1984. La moyenne et l'étendue des duplicata sont représentées pour chaque station (1, 2, 3)	80
Figure 3:	Variations de la somme des adénylates (ATP+ADP+AMP) aux transects A, B, C et D les 4 et 5 octobre 1984. La moyenne et l'étendue des duplicata sont représentées pour chaque station (1, 2, 3)	82
Figure 4:	Variations de la charge énergétique en adénylates (CE_A) aux transects A, B, C et D les 4 et 5 octobre 1984. La moyenne et l'étendue des duplicata sont représentées pour chaque station (1, 2, 3)	85

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dans un rapport récent du Service de la Protection de l'Environnement (SPE), MacGregor et Wells (1984) préconisent le rôle important des tests écotoxicologiques en tant que variable d'appui aux analyses chimiques à l'intérieur des programmes d'Environnement Canada sur les substances altérables. On reconnaît que dans ce domaine, le SPE doit maintenir une forte capacité d'opération et d'expertise compatible avec les grandes lignes de son plan stratégique. Dans ce plan, il est préconisé une volonté ferme d'assurer le développement et l'application d'un schème d'évaluation des risques et des dangers environnementaux encourus par la production de divers composés chimiques et le déversement de multiples effluents industriels dans l'écosystème aquatique. Parmi les stratégies considérées pour l'évaluation des risques et dangers, les indicateurs biologiques jouent un rôle clé.

Dans cette perspective, Blaise et al. (1985) de même que Wells (1984) définissent diverses catégories de bio-analyses comportant des tests simples en laboratoire avec peu de variables à mesurer et ayant une grande précision, de même que des tests "in situ" plus complexes dont la précision est plus faible mais dont la signification environnementale est plus grande. Quatre catégories sont définies:

- i) tests de toxicité aiguë létale et sublétale (laboratoire);
- ii) tests de toxicité chronique sublétale (laboratoire);
- iii) tests en microcosmes ou en mésocosmes (in situ);
- iv) tests de toxicité aiguë ou chronique in situ.

Le présent travail se situe principalement à l'intérieur des catégories i) et iv). Il répond aux préoccupations particulières du SPE et du Service de la Conservation de l'Environnement (SCE). Ces préoccupations découlent d'ailleurs de diverses recommandations faites lors de plusieurs congrès en toxicologie aquatique (INSERM, 1982; MARTOX, 1984 et OCDE, 1984). Mentionnons le besoin de développer des procédures fiables permettant d'obtenir des résultats rapidement (< 1 jour) lors de tests de dépistage ("screening") en toxicité aiguë létale ou sublétale; signalons également le besoin exprimé par le SPE (MacGregor et Wells, 1984) d'obtenir plus de connaissances dans les approches in situ avant de procéder à une application en routine de tests de toxicité aiguë ou chronique.

Dans ce contexte, notre objectif est de développer une approche préconisant l'utilisation de paramètres physiologiques (assimilation de C-14; charge énergétique: CE_A) afin de préciser les répercussions des substances toxiques sur le phytoplancton. Suite au contact de ces organismes avec un ou des toxiques, les variations temporelles de l'assimilation du C-14 de même que celles de la CE_A sont analysées en considérant surtout l'importance de la diminution et le temps de récupération (figure 1).

Les expériences seront réalisées, d'une part, au laboratoire, sur une population monospécifique et, d'autre part, in situ, sur une communauté d'algues. De cette façon, on compte (i) comparer, suite à une agression toxique, la sensibilité de la voie catabolique d'une population d'algues cultivées au laboratoire et d'une communauté indigène, (ii) identifier des phénomènes d'acclimatation et de mortalité chez les populations de phytoplancton.

En relation avec les répercussions de déversements de substances toxiques dans le milieu aquatique, nous discutons des variations temporelles et spatiales de paramètres fonctionnels (assimilation de C-14 et CE_A) et structurels (chl-a, composition des populations) associés à la communauté microbienne d'un milieu lotique. Deux stratégies ont été examinées, soit (i) l'étude de l'acclimatation ou encore de la perte de viabilité de la communauté suite à l'agression toxique à l'aide de bio-essais in situ; (ii) l'analyse de répercussions structurelles et fonctionnelles sur la communauté le long du gradient physique de la rivière.

De cette manière, on compte étudier certains mécanismes impliqués dans le processus d'agression de la communauté microbienne tout en proposant un complément aux études de dépistage de dangers environnementaux, lequel complément permettrait de préciser les connaissances sur les répercussions écologiques des déversements de substances toxiques dans l'environnement aquatique. Les travaux de mise au point des procédures analytiques pour la détermination de la CE_A et de l'assimilation du C-14 sont discutés à l'Annexe 1.

2. PROBLÉMATIQUE

L'approche classique pour déterminer la toxicité de diverses substances consiste à étudier au laboratoire à l'aide de bio-essais les réactions d'organismes uni ou pluricellulaires mis en contact avec ces toxiques. Par exemple, les revues bibliographiques publiées par Maciorowski et al. (1981, 1982, 1983) sur les bio-essais montrent l'intérêt de ces techniques pour décrire, évaluer et prédire les risques potentiels de substances toxiques au niveau cellulaire ou organismique. Par ailleurs, parmi les méthodologies décrites par l'American Public Health Association, l'American Water Works Association et le Water Pollution Control Federation (APHA et al., 1980) pour effectuer des contrôles de qualité sur des eaux de surface et des effluents, les bio-essais sont considérés comme nécessaires pour évaluer les effets potentiels des polluants sur les communautés aquatiques. Mentionnons, par ailleurs, les efforts entrepris au niveau international pour standardiser certains tests par l'International Standardization Organization.

Alors qu'en toxicologie humaine certaines connaissances générales furent acquises à partir d'expériences réalisées sur des mammifères, le besoin en toxicologie aquatique de techniques capables de détecter le potentiel toxique d'un échantillon, de même que les facilités de culture des souches en laboratoire, ont favorisé les bio-essais avec algues. Wong et Couture (1986) ont publié une revue récente de leurs diverses applications in situ et au laboratoire en conditions statiques et dynamiques. Celles-ci furent discutées de façon exhaustive en 1979 lors du symposium "Algae as Ecological Indicators" (Shubert, 1984). Parmi ces bio-essais, celui réalisé avec l'espèce Selenastrum capricornutum (Miller et al., 1978) semble très répandu comme en témoigne une revue bibliographique publiée par Leischman et al. (1979). Dans ce contexte, signalons le développement et l'utilisation en routine de divers tests statiques à Environnement Canada (Blaise et al., 1984) et Environnement Québec (Joubert, 1980). L'approche en condition statique étant plus simple et moins onéreuse, elle connaît plus d'applications dans des programmes de dépistage sur les effets de composés toxiques. Mentionnons également que cette approche permet une évaluation de la toxicité relative en considérant les variations temporelles dans le taux de division cellulaire au cours de la phase de croissance exponentielle ou encore les changements dans la biomasse après une certaine période de croissance.

Toutefois, des études récentes concernant la physiologie du phytoplancton suggèrent certaines critiques vis-à-vis les bio-essais avec algues. Morris et Glover (1974) ont démontré que des "pools" intracellulaires variaient durant la phase de croissance exponentielle; de plus, les paramètres liés à la prise en charge des nutriments (K_M , V_M) changeraient aussi durant les diverses phases de croissance (Lean et Nalewajko, 1976; Nalewajko et Lean, 1978). Par ailleurs, les taux de renouvellement de la chlorophylle-a (chl-a) étant plus rapides (< 1 h) chez le phytoplancton que chez les plantes terrestres, il en résulterait une augmentation du "pool" interne cellulaire avec l'apparition de la limitation en lumière de la culture en cours de croissance (Riper et al., 1979); enfin, l'assimilation de C-14 ne serait pas linéairement reliée à la vitesse de division cellulaire (Carpenter et Lively, 1980; Li et Goldman, 1981).

À cause de la finesse de ces ajustements métaboliques, les toxicologistes doivent être mis en garde contre les effets rapides d'acclimatation ou d'adaptation qui risquent d'entraîner une mauvaise évaluation de la toxicité relative (Stockner et Antia, 1976). Il pourrait, par exemple, en résulter un manque de justesse des % I (inhibition) ou encore des CI-50 calculées lors des bio-essais avec algues. De plus, les constatations suivantes mettent en doute certaines pratiques courantes employées lors de ces tests.

En premier, la pratique consistant à comparer les biomasses calculées (B_C) avec les biomasses effectivement mesurées (B) pour mettre en évidence la présence de toxiques (Miller et al., 1978; Joubert, 1980) se doit d'être revue, en particulier lorsque les teneurs en phosphore inorganique sont utilisées pour la détermination de B_C *. En effet, White et Payne (1980) et White et al. (1981) ont montré que des composés organiques peuvent contenir du phosphore chimiquement réactif capable de causer une surestimation de l'orthophosphate: les réactifs acides employés dans la procédure au bleu de molybdène en orthophosphate (Stainton, 1980; Ownes et Pearl, 1978; Rigler,

* Si le phosphore est identifié comme étant le facteur chimique contrôlant la croissance de l'algue, *S. capricornutum*, alors: $B_C = [P_{inorg.}] \times 430$ où B_C = biomasse calculée (mg/L); $[P_{inorg.}]$ = teneur en phosphore inorganique (mg/L); 430 = facteur de conversion (Shiroyama et al., 1975).

1968). En conséquence, il apparaît douteux que l'équation empirique de Shiroyama et al. (1975) qui relie la biomasse calculée à la teneur en phosphore inorganique (ortho-P > 10 µg/L) soit applicable à des échantillons d'eau naturelle; rappelons que cette équation fut établie à partir de biomasses d'algues mesurées dans des milieux synthétiques inorganiques à diverses concentrations d'orthophosphate (K_2HPO_4).

Ensuite, l'utilisation d'un compteur électronique de particules pour la détermination des biomasses d'algues est maintenant contestée. En effet, bien qu'il a semblé possible avec cet instrument de faire des déterminations directes de biomasse (Miller et al., 1978), des études récentes (Butterwick et al., 1982; Rehnberg et al., 1982) ont démontré que les interférences causées par les débris cellulaires affectaient la justesse des résultats. En conséquence, étant donné qu'il est recommandé (Miller et al., 1978) que la durée du test soit limitée à deux semaines ou encore jusqu'au moment où une augmentation de moins de 5% (par jour) de biomasse soit détectée, il est important, pour bien préciser la phase de stagnation des cultures, d'utiliser un indicateur fiable de biomasse. Or, les travaux de Rehnberg et al. (1982) ont clairement mis en évidence les limites du compteur électronique dans ce domaine.

De plus, il faut mentionner que la sensibilité de l'algue-test varie en fonction de son temps de contact avec le toxique. Les travaux de Van Coillie et al. (1982), Joubert (1981) et Chiaudani et Vighi (1978) montrent effectivement des augmentations ou des diminutions de la toxicité selon la durée de l'incubation. Rai et al. (1981) ont d'ailleurs présenté une excellente revue de plusieurs facteurs pouvant affecter la toxicité: les métabolites excrétés par les algues au cours de leur croissance, la dégradation photochimique ainsi que le temps de pénétration du toxique à travers la membrane sont autant de facteurs susceptibles d'intervenir. Il apparaît donc que des facteurs extrinsèques et intrinsèques vis-à-vis le métabolisme des algues puissent modifier la toxicité d'un échantillon. Aussi, dans la détermination de la toxicité d'un échantillon, on devrait considérer le temps de contact de l'organisme. Dans cette optique, on doit employer des stratégies qui permettent de suivre les réponses du métabolisme pour divers temps de contact avec les substances ou échantillons testés. De cette façon, on

pourrait discriminer entre des effets létaux et sublétaux, aigus et chroniques.

Signalons ici, qu'afin de contourner le problème de fiabilité dans le calcul de la biomasse ou dans le dénombrement cellulaire, Blaise et al. (1984) proposent l'utilisation de la technique des microplaques et la détermination de l'ATP cellulaire. Cette procédure permet en outre de faire des déterminations de CI-50 après 4 et 8 jours de même qu'après 4 heures. Malheureusement, la limite de sensibilité établie à 5×10^5 cellules.mL⁻¹ constitue une contrainte au niveau des concentrations à respecter dans l'inoculum. Cette contrainte, i.e. l'utilisation de fortes concentrations d'algues dans les inoculum pour les tests de 4 heures (5×10^5 c.mL⁻¹ au lieu de 1×10^3 c.mL⁻¹ comme Miller et al., 1978), risque de diminuer la sensibilité des populations lors des bio-essais (Albertano et al., 1978).

Enfin, l'approche classique des bio-essais (culture monospécifique sous conditions contrôlées en laboratoire) apporte des informations précises sur la toxicité relative (par rapport à l'espèce employée) de composés ou d'effluents; toutefois, l'extrapolation de ces résultats à l'environnement naturel est pleine de danger (Harris, 1980). Par exemple, l'état physiologique pour les différentes phases de croissance n'étant pas adéquatement défini dans le milieu naturel, il est difficile de transposer la notion de toxicité relative à l'environnement naturel. En conséquence, le bio-essai classique fournit des renseignements discutables de l'effet de la substance toxique sur la croissance, la biomasse soutenable et la vitesse de succession ou de changements des relations tropho-dynamiques de l'écosystème. Il apparaît donc essentiel que la détermination des caractéristiques écotoxicologiques d'un polluant se fasse à partir de son effet sur les composantes biotiques de l'écosystème. Dans ce contexte, la recherche de paramètres biochimiques qui pourraient caractériser instantanément la toxicité réelle d'une substance véhiculée dans un cours d'eau s'avère essentielle pour permettre au gestionnaire d'apprécier plus justement les effets de polluants sur le milieu aquatique (Karl, 1980; Rainer et al., 1979).

3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE

3.1 Synthèse des connaissances sur les approches expérimentales en toxicologie et en écotoxicologie aquatique

Wong et Couture (1986) ont revu les différentes approches pour évaluer les répercussions des substances toxiques sur la physiologie du phytoplancton. Il s'agit principalement (i) de tests sur des populations monospécifiques au laboratoire ou encore (ii) d'études sur les communautés indigènes in situ ou transportées au laboratoire.

L'approche en laboratoire est habituellement réalisée à l'aide de systèmes "semi-fermés" en condition statique ("batch culture technique") où une population monospécifique est exposée à une ou des substances altérageuses durant une certaine période de temps; la réponse de la population exposée est par la suite comparée à celle d'une population non-exposée. Dans un tel système, il n'y a aucun ajout de milieu nutritif frais de même qu'aucun retrait des produits cataboliques tout au long de l'expérimentation. Cette approche est la plus couramment utilisée, notamment par les organismes gouvernementaux, à cause de sa simplicité et de ses coûts d'application relativement faibles. Plusieurs méthodes découlant de cette approche ont été proposées pour être standardisées comme celles de:

- i) "Algal Assay Procedure Bottle Test" (Miller et al., 1978);
- ii) "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA et al., 1980);
- iii) "Guideline for Testing of Chemicals" (OCDE, 1981);
- iv) "Algal Toxicity Test" (IOS, 1983).

Wong et al. (1983) ont résumé les divers avantages et désavantages des systèmes en conditions statiques. Mentionnons que les concentrations en nutriments sont habituellement plus élevées que celles dans l'environnement, ceci afin de satisfaire la croissance algale et la limite de détection de certaines méthodes de dénombrement cellulaire (voir section suivante). De plus, le milieu de culture change constamment lorsque la biomasse augmente puisque le milieu est fermé; en particulier, on peut signaler la diminution des teneurs en nutriments, l'accumulation de produits cataboliques, l'adsorption sur les parois, les variations du pH et des teneurs en oxygène.

Afin de contourner ces difficultés, certains chercheurs utilisent des systèmes "ouverts" en condition dynamique. Cette procédure fut d'abord employée avec des cultures de bactéries (Monod, 1950). En ce qui concerne son application en toxicologie sur des cultures d'algues, la procédure est relativement nouvelle. Celle-ci consiste en un ajout constant de milieu de culture afin de maintenir un taux de croissance fixe et un état physiologique constant en fonction de la composition chimique du milieu. Mentionnons que ce système se rapproche davantage des conditions environnementales par l'utilisation de faibles concentrations en nutriments. Le tableau 1 résume les principaux avantages et désavantages des deux types de systèmes en condition dynamique: le turbidostat et le chemostat.

L'approche utilisant les communautés ou encore certaines espèces indigènes en toxicologie semble recevoir de plus en plus d'attention de la part des chercheurs, même si elle reste beaucoup moins utilisée que celle employant des cultures monospécifiques au laboratoire. Deux stratégies sont appliquées. La première, à caractère descriptif, a comme objectif la caractérisation d'effets directs. Ces travaux permettent de préciser des modifications dans la structure des communautés (Whitton et Diaz, 1980; Shehata et Whitton, 1981; Côté, 1983) ou encore d'identifier des espèces tolérantes à divers métaux (Palmer, 1962; Williams et Mount, 1965, Shehata et Whitton, 1981). La seconde, à caractère fonctionnel, vise la détection d'effets insidieux (Menzel et Case, 1977). Ces effets sont précisés à partir de l'étude de variables suivies dans le temps et pouvant nous permettre de comprendre le mode d'action des toxiques sur les communautés (chl-a; assimilation de C-14; ATP; charge énergétique: Blinn et al., 1977; Hansen et Garton, 1982; Wurtsbaugh et Horne, 1982; Fitzwater et al., 1983). Dans des milieux lotiques, ces variables sont suivies dans des canaux de dérivation montés in situ (Eichenberger et al., 1981) ou encore installés à l'intérieur d'un laboratoire (Hansen et Garton, 1982). En milieu lentique, les communautés sont confinées à l'intérieur d'enceintes expérimentales isolées ou ouvertes au sédiments (Blinn et al., 1977; Planas et Lamarche, 1983). Enfin, les contraintes exercées sur les fonctions métaboliques peuvent également être étudiées à l'aide de bio-essais "in vitro" où la communauté est soumise au laboratoire à différentes conditions toxiques (Wurtsbaugh et Horne, 1982).

Tableau 1: Principaux avantages et désavantages de l'utilisation de culture en turbidostat (A) et en chimostat (B): adapté de Wong et al. (1983) et Solomons (1972).

A	<p><u>Turbidostat</u>: la densité cellulaire est ajustée par un apport intermittent de milieu nutritif contrôlé par un système de photodétection</p> <p>a) Avantages:</p> <ul style="list-style-type: none">- maintient la concentration cellulaire constante;- fixe le rapport [cellule]/[toxique];- permet l'utilisation d'un niveau d'enrichissement en nutriment faible, se rapprochant davantage de celui de l'environnement. <p>b) Désavantages:</p> <ul style="list-style-type: none">- demande beaucoup de temps pour ajuster l'équipement;- difficultés d'ajuster les différents photodétecteurs à la même sensibilité; cependant cette difficulté est disparue avec certains systèmes photodiode-LED qui permettent un ajustement à $\pm 100-200$ cell/ml;- coûts élevés à l'achat;- contamination en microorganismes;- colonisation des parois par les algues diminue la transmission de lumière.
B	<p><u>Chemostat</u>: la densité cellulaire est contrôlée par la concentration de nutriment dans le milieu de culture et le taux de croissance par le débit d'entrée du milieu de culture</p> <p>a) Avantages:</p> <ul style="list-style-type: none">- maintient la concentration cellulaire constante;- conditions chimiques ne varient pas; permet des perturbations réalistes;- coûts moins élevés à l'achat qu'un turbidostat bien qu'il ne faut pas minimiser le coût des pompes; absence de photodétecteurs. <p>b) Désavantages: (semblable au turbidostat)</p> <ul style="list-style-type: none">- colonisation des parois par microorganismes;- contamination microbienne;- demande beaucoup de temps pour l'ajustement de l'équipement.

3.2 Synthèse des connaissances sur les variables étudiées

Plusieurs variables peuvent être employées pour préciser la réponse du métabolisme suite à une exposition à des substances altérageuses. Butterwick et al. (1982) de même que Walsh et Merrill (1984) ont discuté des limites et de la signification des principales variables utilisées.

Le dénombrement des cellules au microscope est un procédé plus fiable que celui au compteur électronique de particules avec lequel il est impossible de distinguer entre la matière détritale et les cellules phytoplanctoniques. D'ailleurs, les particules en suspension présentes dans les effluents interfèrent aussi sur la fiabilité des mesures gravimétriques de biomasse. Wong et al. (1983) ont revu les avantages et désavantages du dénombrement cellulaire au microscope ainsi que ceux de l'estimation de la croissance à l'aide de mesures de densité optique (tableau 2).

Les teneurs en chlorophylle totale ne constituent qu'une approximation globale de la biomasse; les teneurs en chl-a cellulaire varient en fonction des espèces, du niveau nutritionnel du milieu, des conditions de lumière et de l'état physiologique des cellules; pour ces raisons, le rapport chl-a/cellule serait un meilleur indicateur de l'effet d'un toxique par rapport à la mesure de la chlorophylle totale (Walsh et Merrill, 1984). Il est également important de préciser que, dans le cas des bio-essais où les déterminations sont faites durant la phase stationnaire, il est important de discriminer entre les teneurs en chl-a et celles des phaeopigments, ces derniers étant une forme dégradée de chlorophylle. Cette différenciation s'effectue en acidifiant les extraits et en déterminant les densités optiques sur les échantillons avant et après acidification.

En ce qui concerne les déterminations in vitro, les principales techniques d'extractions avant dosage en spectrophotométrie sont celles à l'acétone (Stauffer et al., 1979; APHA et al., 1980), au méthanol (Butterwick et al., 1982) et au DMSO (Burnison, 1980). La procédure employant l'acétone est largement répandue probablement à cause du fait que les coefficients d'absorption (ϵ) dans le méthanol varient (Talling et Driver, 1963:

Tableau 2: Principaux avantages et désavantages dans l'utilisation du dénombrement cellulaire et de la mesure de densité optique.

Dénombrement cellulaire:

Avantage	Désavantage
<ul style="list-style-type: none">- peu coûteux- peut déterminer des taux de croissance cellulaire- peut détecter des modifications morphologiques	<ul style="list-style-type: none">- fastidieux et subjectif- ne peut distinguer entre les cellules vivantes et les cellules mortes- sous-échantillonnage favorise le risque de contamination

Densité optique

<ul style="list-style-type: none">- pratique, commode- peu coûteux- minimise les risques de contamination car on peut éviter le sous-échantillonnage	<ul style="list-style-type: none">- peu sensible- ne peut distinguer entre les cellules vivantes et les cellules mortes
--	--

74,9 L.g⁻¹.cm⁻¹; Riemann, 1978: 77,4 L.g⁻¹.cm⁻¹; Stauffer et al., 1979: 83,9 Lg⁻¹.cm⁻¹) alors que celle au DMSO demande un chauffage à 65°C durant 10 minutes pour éviter le broyage des filtres en fibre de verre. Par ailleurs, la technique à l'acétone est répertoriée dans le "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (APHA et al., 1980) et la possibilité de conservation des extracta dans l'acétone au congélateur et à l'obscurité est établie (30 jours: APHA et al., 1980).

La méthode de dosage d'extracta acétonique en fluorescence est aussi largement répandue. Elle a l'avantage d'être plus sensible que la précédente et ne demande pas une neutralisation des échantillons comme en spectrophotométrie où le spectre d'absorption des phaeopigments est dépendant du pH (Walsh et Merrill, 1984).

La fluorescence in vivo est aussi utilisée pour estimer la biomasse. L'application de cette méthode a été revue par Harris (1980); par ailleurs un exemple de l'utilisation en toxicologie de l'augmentation de fluorescence (in vivo) suite à un ajout de DCMU a été présentée par Couture et al. (1982). Le principal avantage de la fluorescence in vivo est lié à la rapidité de la mesure étant donnée l'absence de procédure d'extraction. Il faut cependant souligner que l'utilisation de ce paramètre pour évaluer les teneurs en chlorophylle doit être revue en fonction du fait que l'émission lumineuse en fluorescence est fonction des teneurs en chlorophylle et de la configuration des chloroplastes. D'ailleurs, Clément-Métral et Lefort-Tran (1974) ont montré que des changements dans la forme des thylacoïdes modifiaient l'émission de fluorescence chez l'algue rouge P. cruentum.

4. UTILISATION DE RELATIONS STRUCTURE-FONCTION
DANS LA DÉTERMINATION DE LA TOXICITÉ RELATIVE
AVEC SELENASTRUM CAPRICORNUTUM: UNE ÉTUDE DE
CAS AVEC LE CADMIUM ET UN EFFLUENT INDUSTRIEL.

Résumé

La toxicité du cadmium et d'un effluent industriel a été étudiée en utilisant les propriétés structurelles et fonctionnelles d'une population de Selenastrum capricornutum. Les résultats démontrent que l'efficacité photosynthétique (rapport P/B) est un meilleur indicateur des effets sub-létals du cadmium que la biomasse ou le taux moyen de croissance (μ_{av}). Ces effets sont discutés en fonction de l'inactivation d'enzymes du cycle de Calvin et de la phosphatase alcaline. Nos résultats suggèrent aussi qu'une déficience en phosphore influence le degré de toxicité du cadmium pour les algues. À court terme l'effluent industriel a eu des effets plus importants que le cadmium sur le rapport P/B et sur la charge énergétique (CE_A). Par ailleurs avec les deux substances toxiques, de concert avec de faibles densités cellulaires, des rapports P/B et des CE_A élevés ont été observés à la fin de l'expérience. Ceci suggère que ces paramètres fonctionnels peuvent être utiles dans la détection de réponses acclimatatives à des substances toxiques. De plus la CE_A semble rester faible seulement dans des conditions de stress aigu.

4.1 Introduction

Les bio-essais avec microorganismes (algues, bactéries) sont couramment utilisés comme outils biologiques pour l'évaluation de risques de substances toxiques, en milieu aquatique (Wong et Couture, 1986; Chang et al., 1981). Certains essais monospécifiques sont reconnus comme tests de dépistage par plusieurs agences gouvernementales tels que la U.S. Environmental Protection Agency (Miller et al., 1978), Environnement Canada (Blaise et al., 1984; 1981) et Environnement Québec (Joubert, 1981; 1980). Au niveau international, l'Organisation Internationale de la Standardisation (OIS) et l'Organisation pour la Coopération et le Développement Économique (OCDE) étudient des procédures pouvant servir de méthodes standards pour l'étude des effets de substances chimiques sur les algues d'eau douce.

Cependant, comme Nyholm (1985) l'a mentionné, les tentatives récentes de standardisation des tests d'inhibition de la croissance de microalgues pour des besoins de réglementation ont révélé un nombre de problèmes méthodologiques: des controverses sont apparues concernant la validité des résultats de CI-50 et le choix des variables à mesurer lors d'essais de toxicité avec algues. Par exemple, des programmes de comparaisons interlaboratoires effectués sous les auspices de l'OIS et du Conseil Nordique de la Recherche Appliquée ont révélé que les estimés de CI-50 pourraient varier d'un facteur 1000 ou plus, même pour des produits simples (Hånsveit, 1980; Källqvist et al., 1980). La méthode utilisée pour analyser les données et pour exprimer le point limite peut aussi influencer significativement le calcul de la CI. À cet égard, Rehnberg et al. (1982) ont critiqué l'utilisation du compteur électronique de particules pour les mesures de biomasses pour la détermination du point limite.

L'utilisation des données de taux de croissance paraît attirante puisque comme l'a souligné Nyholm (1985), dans un écosystème naturel, dynamique, le taux de croissance est le facteur décisif du succès compétitif d'une espèce d'algue; en ce sens, d'un point de vue écologique, l'évaluation de l'influence d'une substance chimique donnée sur le taux de croissance apparaît importante. Malheureusement, les méthodes analytiques développées au

laboratoire pour mesurer les variations de biomasse de populations monospécifiques (poids sec et humide, carbone cellulaire, protéines totales et microscopie) sont généralement insatisfaisantes lorsqu'elles sont appliquées au milieu naturel (Karl, 1980).

Conséquemment, comme l'ont mentionné Karl (1980) et Rainer et al. (1979), la recherche de paramètres biochimiques capables de caractériser rapidement la toxicité d'une substance est essentielle. Par ailleurs, l'analyse des effets de substances toxiques sur des variables fonctionnelles peut fournir de l'information sur les mécanismes de toxicité et sur les réponses acclimatatives des algues à diverses substances. Les réponses acclimatatives ont été négligées lors de la détermination des CI-50 par des bioessais classiques et puisque cette approche de tests monospécifiques fournit de l'information concernant les effets directs des polluants, il sont inefficaces pour détecter les effets insidieux qui affectent la croissance, la reproduction et d'autres fonctions métaboliques de l'organisme (Menzel et Case, 1977).

Dans un tel contexte, une approche utilisant à la fois des paramètres structurel (densité cellulaire, chlorophylle-a, ATP, somme des adénylates) et fonctionnel (efficacité photosynthétique, charge énergétique en adénylates, ATP/cellule) comme indicateurs de stress cellulaire pourrait être utile pour la détection d'effets insidieux au niveau de population de laboratoire. Cette étude propose l'utilisation de ces paramètres comme indicateurs de stress au niveau microbien pour l'évaluation de risque et pour vérifier l'hypothèse d'acclimatation d'une population au cadmium et à un effluent industriel complexe.

4.2 Matériel et méthodes

Selenastrum capricornutum (ATCC 22662) a été cultivé dans des flacons de 6 L contenant 4 L de milieu AAP modifié (sans EDTA: Chiaudani et Vighi, 1978) dans des conditions de lumière continue ($100 \mu\text{E}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). La température a été maintenue à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ par immersion dans un bain thermostaté et le pH a été ajusté à 7.8 ± 0.1 par l'ajout automatique de CO_2 (Bates et al.,

1985) contrôlé par un contrôleur à pH (Horizon, modèle 5997-20). Les cultures ont été agitées par aération continue (air filtré). Les algues ont été conditionnées pendant deux semaines avant le début des expériences sous des conditions de lumière constante afin d'assurer des populations asynchrones.

Deux séries d'expériences ont été effectuées: une avec le cadmium et l'autre avec un effluent industriel. Des concentrations de 32, 16, 8, 4 et 2 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ ont été préparées avec une solution de 1700 mg.l^{-1} $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. L'échantillon d'effluent industriel a été obtenu d'une usine de chlore-alcali et ses principales caractéristiques chimiques ont été déterminées par Fédida (1982) à partir d'échantillons composés obtenus à des intervalles de 0.25 h entre le 19 et le 21 octobre 1981 (Tableau 1). Avant la préparation des concentrations à utiliser au cours de l'expérience (25, 10, 4 et 1% V/V), l'échantillon d'effluent a été enrichi avec du milieu AAP modifié (Chiaudani et Vighi, 1978) concentré afin d'éliminer une déficience en éléments nutritifs (Joubert, 1980). Pour chaque série d'expérience, les solutions de milieu de culture (AAP modifié) ont été contaminées pour donner les concentrations de cadmium ou d'effluent mentionnées plus haut. Elles ont ensuite été inoculées avec 10^4 cellules. ml^{-1} . Les conditions d'incubation ont été identiques aux conditions de culture. À intervalle régulier (1, 3, 6, 24, 48, 72 et 96 h) pendant la période d'incubation de 96 h, des échantillons ont été obtenus pour la détermination du nombre de cellules, tandis que la chlorophylle-a (chl-a), les nucléotides adénylates et l'assimilation du carbone ont été mesurés à 1, 3, 6, 24, 48 et 96 h. De plus, après 24 et 96 h d'incubation dans le milieu contaminé, des échantillons d'algues ont été récoltés, concentrés par filtration, re-suspendus dans du milieu AAP et immédiatement ré-inoculés (approx. 10^4 cellules. ml^{-1}) dans 2 L de milieu non-contaminé. Les cultures de ces expériences de récupération après 24 et 96 h ont été gardées sous les mêmes conditions d'incubation, excepté pour le contrôle automatique du pH. Pendant les expériences de récupération, le nombre de cellules a été déterminé à 1, 24, 72 et 96 h tandis que les autres variables biotiques (chl-a, adénylates et assimilation de carbone) qui nécessitent plus de temps, ont été mesurées à une fréquence plus faible (1, 24 et 96 h).

Tableau 1: Caractéristiques chimiques de l'effluent de l'usine de chlore-alcali (Fedida, 1982).

<u>Composés inorganiques</u>		<u>Métaux traces</u> $\mu\text{g.l}^{-1}$	
ions majeurs (mg.l^{-1})			
pH	9.1	Cd	<10
Ca	38	Co	<25
Mg	12	Cr	<20
Al	<0.20	Cu	<20
Mn	.027	Fe	101-426
SO ₄	230	Hg	2.3-6.4
sulfides	<0.2	Ni	<10-14
CN ⁻	<0.03	Pb	<10-15
NH ₃	<0.1	Zn	<10-58
Cl ⁻	160		
chlore résiduel	0.1		
<hr/>			
<u>Composés organiques*</u>			
($\mu\text{g.l}^{-1}$; T=trace; nd=non-délectable)			
Carbone tétrachloride	ND-02	1,2-Dichloroéthane	T
Chloroforme	ND-06	Dichlorométhane	ND-55
1,1-Dichloroéthylène	T	Bis(2-éthylhexyl)phthalate	ND-04
Trans-1,2-Dichloroéthylène	14-23	Diéthylphthalate	ND-03
Trichloroéthylène	39-66	Di-n-Butylphthalate	ND-16
1,4-Dichlorobenzène	ND-09*	Phénol	ND-01
Ethylbenzène	1	Toluène	T

* : déterminé par GC/MS.

Les cellules ont été comptées avec un compteur électronique de particules (Coulter Counter, modèle TA, cellule de 70 μm) selon la méthode décrite par le manufacturier et généralement utilisée pour Selenastrum capricornutum. Dépendant de la densité cellulaire observée pendant l'incubation, 5 à 20 ml de culture d'algues ont été mesurés avec précision et filtrés à travers un filtre en polycarbonate 0.4 μm (Nuclepore Corp.). La chl-a a été extraite dans 5 ml d'acétone 90% à 4°C à l'obscurité pendant une nuit et mesurée avec un fluorimètre Turner Design avant et après acidification avec du HCl 10%. L'équation mentionnée dans APHA et al. (1980) a été utilisée pour la détermination de la chl-a active.

Pour mesurer le taux d'assimilation de carbone, 100 ml de la culture d'algues ont été prélevés et enrichis avec 100 μl de NaHCO_3 (100 mg.l^{-1}) pour éviter une limitation de carbone (Gentner, 1983). De cet échantillon, un sous-échantillon a été utilisé pour déterminer le carbone inorganique total (TIC) et deux sous-échantillons ont été introduits dans des erlenmeyers de 50 ml munis de bouchons. Ces sous-échantillons ont ensuite été enrichis avec 10 μCi $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ et un volume de 20 ml a immédiatement été filtré sur un filtre de 0.4 μm en polycarbonate afin de déterminer l'activité spécifique de l'échantillon. Les sous-échantillons ont été incubés à la température de la pièce sous un éclairage intense (approx. 100 $\mu\text{E}.\text{sec}^{-1}.\text{m}^{-2}$) pendant 15 à 30 min, dépendant de la densité cellulaire. À la fin de la période d'incubation 5 à 20 ml d'échantillon ont été filtrés pour mesurer l'assimilation de carbone. Les filtres ont été séchés à l'air pour éliminer le carbone radioactif résiduel et placés dans 10 ml de liquide à scintillation (Scintiverse II, New England Nuclear). La radioactivité des échantillons a été comptée avec un système à scintillation liquide (LKB, modèle Rackbeta) et un standard d'hexadécane a été utilisé pour transformer les comptes par minute (CPM) en désintégrations par minute (DPM). La quantité de carbone assimilée a été calculée avec le rapport: (^{14}C assimilé / ^{14}C disponible) x ^{12}C disponible x 1.06 (Vollenweider, 1974), où la constante est un facteur de correction pour l'assimilation sélective de l'isotope (Plumb et Lee, 1979).

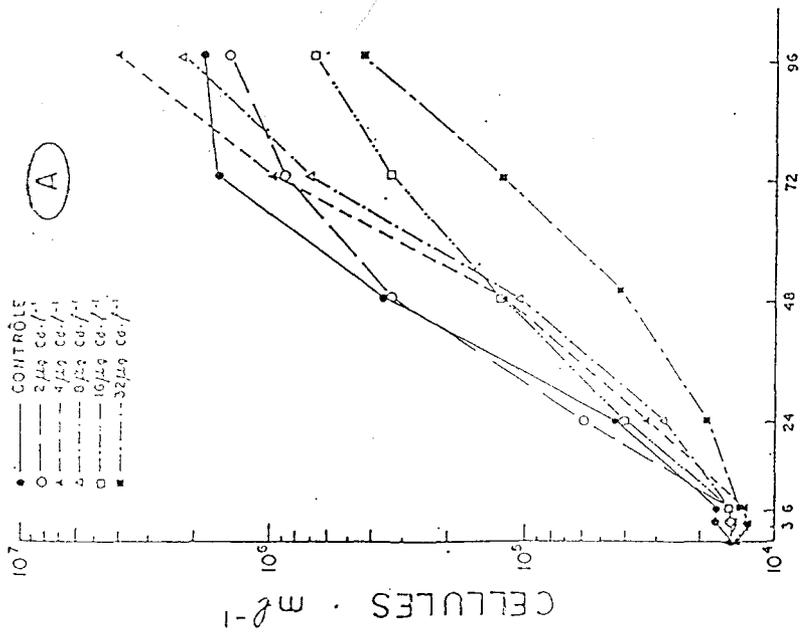
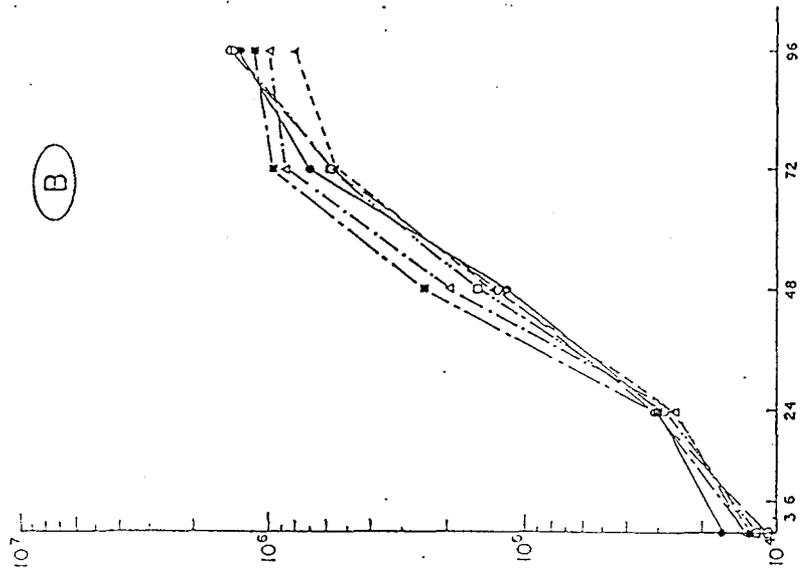
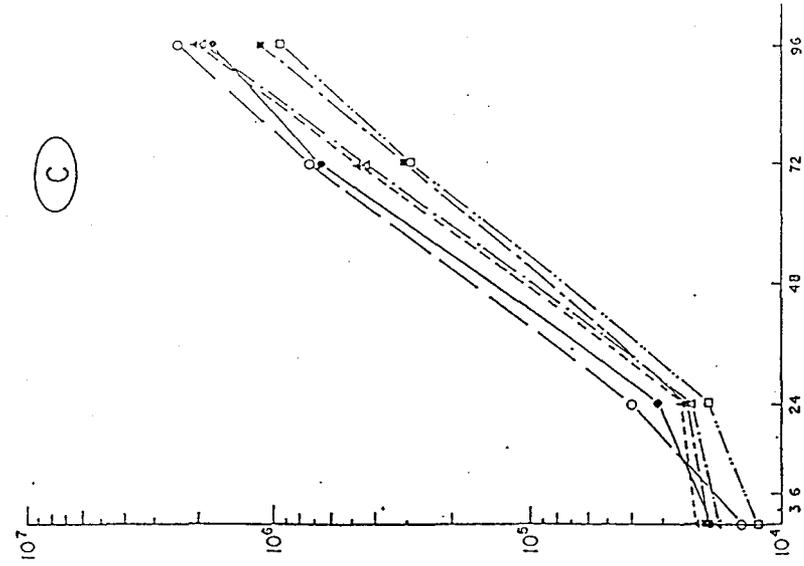
Pour la détermination des nucléotides adénylates, 2 à 20 ml d'échantillon ont été filtrés sur des membranes Nuclepore 0.4 μm et extraits aussitôt en les plongeant dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) et en les mélangeant au

vortex (40 s). Subséquemment, 5.5 ml d'une solution tampon d'acide sulfonique 4-morpholinopropane (MOPS) 10 nM à pH 7.4 a été ajouté (Jakubczak et Leclerc, 1980). Les extraits ont été dosés par luminométrie (luminomètre LK 1219) en utilisant des enzymes ultrapurs obtenus de LUMAC (St-Paul, Minn.). Brièvement, 3 réactifs étiquetés "A", "B" et "C" provenaient de chez LUMAC. Le réactif "A" est un tampon Herpes 25 nM à pH 7.5 contenant 10 nM de KCl. Le réactif "B" est un mélange contenant du pyruvate phospho-énol lyophilisé et de la pyruvate kinase; il est reconstitué avec 3.4 ml du réactif "A". Ce réactif est stable pendant 12 heures à 21°C et convient à l'analyse de 30 échantillons. Le réactif "C" contient l'adénylate kinase dans une solution de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 3.2M. Avant son utilisation 1.7 ml de réactif "B" est mélangé avec 40 ml de réactif "C"; la solution est stable pendant 3 heures à 21°C. Finalement une quatrième fiole contient le mélange luciférine-luciférase lyophilisé purifié qui est reconstitué avant usage avec 7 ml de réactif "A". Les analyses de nucléotides ont été effectuées de la façon suivante. Dans tous les cas 50 μl de l'extracta a été mélangé soit au réactif "A" (ATP), au réactif "B" (ADP) ou au réactif "C" (AMP). Une quantité connue de nucléotide a été ajoutée à des duplicatas pour servir de standards internes. Pour l'ATP et l'ADP une incubation de 30 minutes à la température de la pièce a été nécessaire tandis que pour l'AMP elle a été de 2 heures à 30°C. La préparation pour les mesures luminométriques a consisté à remplir le distributeur du LKB 1291 avec du "LUMIT PM" luciférine-luciférase et à charger le plateau circulaire de l'échantillonneur automatique du luminomètre avec les éprouvettes à échantillons. Pour le dosage de l'ATP et de l'ADP, 100 μl de l'enzyme ont été dispensés tandis que le dosage de l'AMP a nécessité 150 μl d'enzyme. L'émission de lumière augmentait rapidement et atteignait un plateau après 2 secondes de sorte que des mesures intégrées ont donné des valeurs identiques à celles prises au pic d'émission. La charge énergétique en adénylates a été calculée selon la relation suivante: $CE_A = (\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ (Atkinson, 1977). En utilisant la méthode décrite ci-dessus la limite de détection pour les trois nucléotides étaient 0.25 nM pour l'ATP et 0.5 nM pour l'ADP et l'AMP. La précision, exprimée en pourcentage de l'intervalle de confiance 95% était de 5.7% (ATP), 6.9% (ADP) et 13.8% (AMP) pour des concentrations de 5 nM.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Expérience avec le cadmium

Dans la plupart des cultures la période latente de croissance a persisté pendant approximativement 6 h tandis que dans $32 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ elle a été prolongée jusqu'à 24 h (fig. 1a). Pendant la période de croissance exponentielle, le temps de génération de S. capricornutum a aussi été influencé par le cadmium; par exemple, dans $32 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ le temps de génération était en moyenne de 16 h comparé à 10 h chez le témoin. Les faibles taux de croissance des cultures de 16 et $32 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ ont résulté en un nombre de cellules inférieur au témoin. Les autres indicateurs de biomasse, la chl-a, l'ATP et la somme des adénylates (A_T) ont été influencés de façon similaire par le cadmium et ils sont significativement corrélés au nombre de cellules (tableau 2). En effet les CI-50-96 h calculées avec la densité cellulaire, la chl-a, l'ATP et l' A_T sont respectivement 12.4, 15.7, 17.8 et $15.3 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ (tableau 2). D'autres chercheurs ont également trouvé que le cadmium diminuait la croissance des algues (Hart et Scaife, 1977; Wong et al., 1979; Laube et al., 1980; Rachlin et al., 1982). Rachlin et al. (1982) ont trouvé des différences de sensibilité au cadmium entre les espèces. Des trois espèces testées Chlorella saccharophila était la plus sensible (CE-50-96 h = $0.105 \text{ mg Cd.l}^{-1}$) et Navicula incerta la moins sensible (CE-50-96 h = $3.008 \text{ mg Cd.l}^{-1}$). Ils ont observé qu'à $13 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$, une concentration proche de notre CI-50-96 h ($12.4 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$) calculée pour S. capricornutum. La croissance de C. saccharophila était seulement réduite de 15%. C. saccharophila est soit véritablement moins sensible au cadmium que S. capricornutum ou une partie de la différence de sensibilité peut être expliquée par des différences dans la composition et le pH des milieux de culture qui peuvent modifier la concentration, la disponibilité et la toxicité de l'ion Cd^{2+} . Même si entre les pH 5.5 et 8.5, le réservoir de Cd dissous est dominé par le Cd^{2+} hydraté, Peterson et al. (1984) ont trouvé que la toxicité du Cd augmente avec une augmentation du pH dans cette gamme. Ils expliquent cette toxicité accrue par la compétition, aux concentrations élevées d'ions H^+ , entre ces ions et les ions Cd^{2+} pour des sites de liaison sur les membranes cellulaires. La présence d'agents complexants tel que l'EDTA peut réduire la disponibilité des ions Cd^{2+} comme l'ont démontré Chiaudani et Vighi (1978) pour S. capricornutum (CE-50 - 96 h



TEMPS (heures)

Tableau 2: Toxicité du cadmium et de l'effluent industriel pour S. Capricornutum (A) exprimée en CI-50-96 h pour chaque paramètre mesuré et (B) corrélation avec les densités cellulaires.

CI-50-96 h (L.C. 95%)			
A) Paramètre	cadmium ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	effluent (%, v/v)	
densité cellulaire	12.4 (7.7-24.2)	3.1 (2.1-4.6)	
chl-a	15.7 (11.6-21.0)	5.9 (4.3-8.5)	
ATP	17.8 (12.1-31.9)	6.9 (4.9-9.8)	
A _T	15.3 (9.8-30.8)	5.4 (3.8-8.2)	
assimilation ¹⁴ C	4.1 (0-12.3)	5.5 (3.8-8.3)	

corrélation avec les densités cellulaires			
B) Paramètre	degré de liberté (n-2)	coefficient de corrélation (r)	probabilité (α)
<u>cadmium</u>			
chl-a	40	0.98	< 0.01
ATP	34	0.95	< 0.01
A _T	34	0.68	< 0.01
<u>effluent</u>			
chl-a	37	0.96	< 0.01
ATP	34	0.91	< 0.01
A _T	44	0.95	< 0.01

= 3.9 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ dans le milieu sans AAP; CE-50-96 h = 6.7 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ dans le milieu avec EDTA; pH = 6.0-6.3).

Même si la croissance est réduite aux plus fortes concentrations de cadmium, μ_{av} déterminé pour la période 1-96 h et le nombre de cellules sont plus élevés dans 4 et 8 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ que dans le témoin (tableau 3 et fig. 1). Les dénombrements cellulaires plus élevés dans 4 et 8 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ sont difficiles à expliquer. Cependant, étant donné que cette expérience a été effectuée en deux parties (0,2 et 16 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ ont été effectués ensemble tandis que 4, 8 et 32 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ ont été effectués une semaine plus tard), le statut nutritionnel des cellules a pu être différent au cours des deux expériences. Le statut nutritionnel des cellules peut affecter la toxicité des métaux; par exemple, il a été démontré que les algues suffisantes en phosphore sont moins susceptibles à la toxicité du plomb (Monahan, 1973; Sicko-Goad and Lazinsky, 1983). Étant donné que μ augmente avec la concentration intracellulaire de phosphore, il est justifié d'émettre l'hypothèse de la présence de deux populations distinctes avec des statuts nutritionnels différents. Dans un tel contexte, il n'est pas entièrement surprenant d'observer des dénombrements cellulaires supérieurs dans les cultures avec 4 et 8 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$; de fait, une suffisance en phosphore peut avoir réduit la toxicité du cadmium pour ces deux populations.

Dans le milieu AAP le phosphore est reconnu comme étant le facteur limitant la croissance de S. capricornutum (N/P = 50) (Shiroyama et al., 1975). De plus, chez les algues déficientes en phosphore, on observe une augmentation prononcée de l'ATP lorsque celles-ci sont transférées dans un milieu riche en phosphore et l'ATP/C diminue de façon marquée lorsque les cellules algales deviennent limitées en phosphore (Brezonick et al., 1975; Hendzel et Healy, 1984). L'augmentation marquée de l'ATP/cellule observée dans les cultures témoins et de 2 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ dans les premières 24 h de l'expérience indique que ces populations étaient déficientes en phosphore au début de l'expérience (fig. 2). De plus, la diminution importante de l'ATP/cellule après 24 h de croissance est indicative de la déficience en phosphore de ces cultures. Ceci est supporté par le fait qu'à t₉₆ les cultures témoin et de 2 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ ont atteint la phase stationnaire (fig. 1). Chez les populations traitées avec 4, 8, 16 et 32 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$, l'ATP/cellule ne varie presque pas au cours de l'expérience (fig. 2). Il est possible, comme l'indique les dénombrements cellulaires élevés, que quelques-unes de ces populations (4 et 8 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$) ne soient pas limitées en phosphore ou

Tableau 3: Taux de croissance moyen de S. capricornutum contaminé avec diverses concentrations de cadmium au cours des expériences d'exposition et de récupération 24 et 96 h.

concentration de cadmium	μ_{av}^*		
	expérience d'exposition au cadmium	expérience de récupération 24 h	expérience de récupération 96 h
0	1.20	1.10	1.13
2	1.15	1.22	1.20
4	1.41	1.03	1.13
8	1.24	1.09	1.17
16	0.95	1.17	1.08
32	0.87	1.12	1.02

$$* \mu_{av} = \frac{\ln X_T - \ln X_0}{T} \quad (\text{Nyholm, 1985})$$

où X_T = densité cellulaire à la fin de l'expérience (N.ml⁻¹)

X_0 = densité cellulaire au début de l'expérience (N.ml⁻¹)

T = durée de l'expérience (jours)

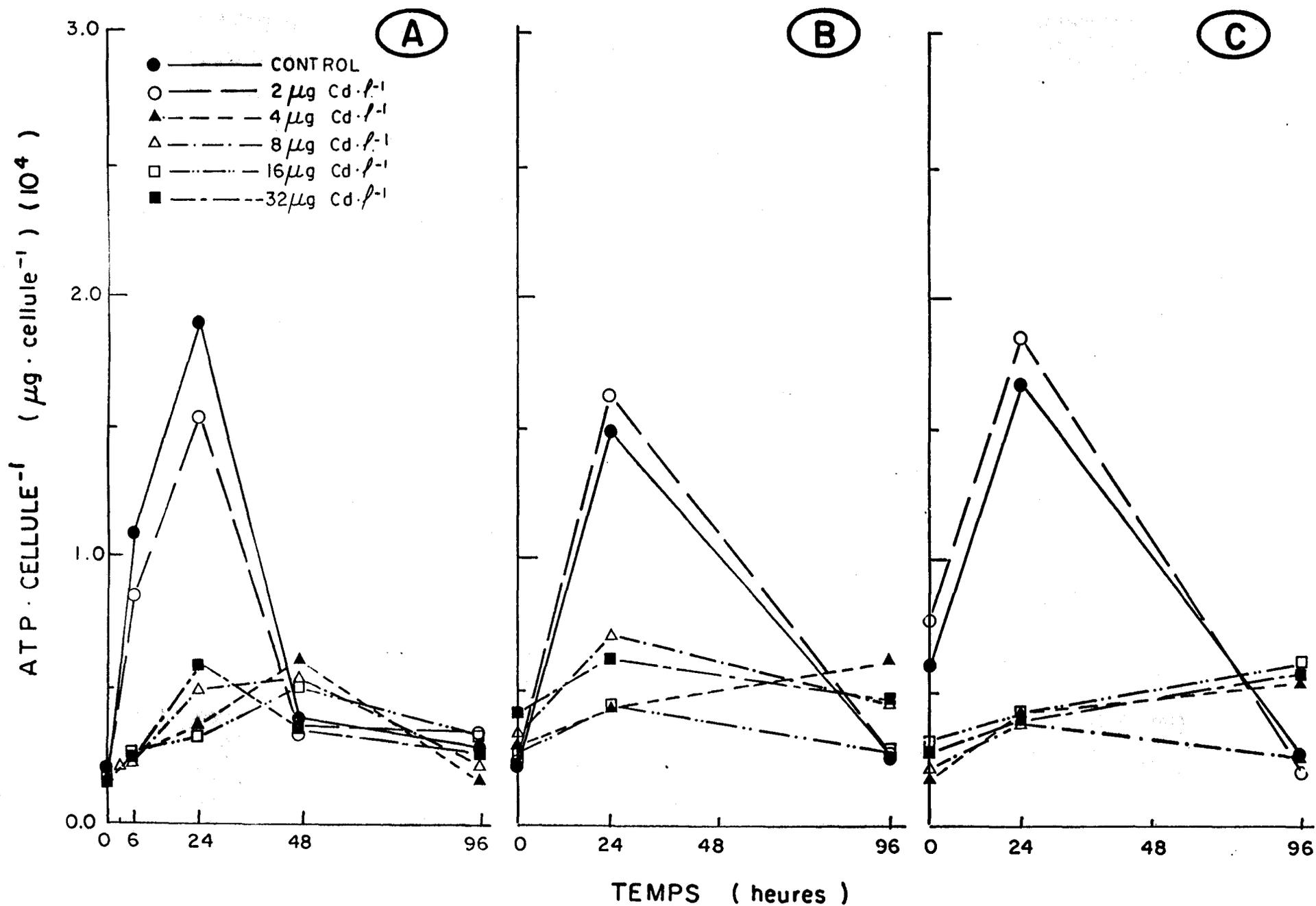


Figure 2: Variations des concentrations d'ATP par cellule chez des populations de *S. capricornutum* contaminées avec diverses concentrations de cadmium (A) et pendant les expériences de récupération 24 (B) et 96 h (C).

Tableau 4: Variations de l'efficacité photosynthétique et de la CE_A de populations de S. capricornutum soumises à diverses concentrations de cadmium pendant 96 h.

	[Cd] $\mu\text{g.l}^{-1}$	Exposition		Expérience de	Expérience de
		t_{24}	t_{96}	récupération t_{96}	récupération t_{96}
Efficacité photo- synthétique*	0	3.57	3.03	5.75	5.42
	2	2.11	1.13	11.61	4.64
	4	1.20	0.86	3.62	4.13
	8	1.15	0.91	5.46	3.24
	16	1.02	2.64	7.89	1.78
	32	1.29	2.05	3.43	2.15
	CE_A	0	0.95	0.68	0.75
2		0.83	0.73	0.98	0.69
4		0.77	0.82	0.74	0.70
8		0.41	0.74	0.73	0.73
16		0.76	0.74	0.77	0.64
32		0.54	ND	0.76	0.71

* En $\mu\text{g C} \cdot \mu\text{g chl-a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

ND = non disponible

valeurs d'ATP/cellule dans la dernière partie de l'expérience sont indicatives d'une limitation en ce nutriment (fig. 2A), comme l'est la phase stationnaire de la courbe de croissance (fig. 1A). Par ailleurs, l'augmentation des rapports P/B observée entre t_{24} et t_{96} dans les populations de 16 et $32 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$ pourrait indiquer un certain degré d'acclimatation au cadmium (tableau 4). L'efficacité photosynthétique de la culture témoin de S. capricornutum se situe à l'intérieur des valeurs observées par Platt et al. (1980) chez des communautés naturelles de phytoplancton du Banc Scotian, de l'Arctique et de la Côte du Pérou ($0.81 - 15.6 \text{ mg C.mg chl-a.h}^{-1}$). Côté (1983) a aussi observé des diminutions de l'efficacité photosynthétique d'algues contaminées avec un métal trace, par exemple lorsque Chlorella vulgaris a été cultivée dans de l'eau de rivière contaminée avec $200 \mu\text{g Cu.l}^{-1}$, le rapport P/B a diminué d'une valeur témoin de 1.33 à une valeur de $0.6 \text{ mg C.mg chl-a.h}^{-1}$.

Il est une fois de plus apparent que la durée de l'exposition joue un rôle sur le degré d'inhibition produit par le cadmium. À t_{96} de l'expérience de récupération 24 h, l'efficacité photosynthétique des cultures contaminées avec du cadmium est relativement élevée et n'apparaît pas reliée à la concentration de cadmium, tandis qu'à t_{96} de l'expérience de récupération 96 h, les rapports P/B sont plus faibles dans les cultures contaminées (tableau 4). Ils diminuent en même temps que la concentration de cadmium augmente jusqu'à $16 \mu\text{g.l}^{-1}$ (fig. 4). Ceci n'est pas invraisemblable puisque Conway et Williams (1979) ont démontré pour deux espèces de diatomés qu'après 70 h de croissance dans un milieu sans cadmium, entre 7 et 16% du cadmium adsorbé demeurait à l'intérieur des cellules. La relation entre l'efficacité photosynthétique et la concentration de cadmium (fig. 4) suggère qu'aux fortes concentrations de cadmium un plus grand nombre d'enzymes sont inactivés et qu'il y a un nombre limité de sites auxquels le cadmium peut se complexer puisque augmenter la concentration de cadmium au-dessus de $16 \mu\text{g.l}^{-1}$ ne réduit pas davantage l'efficacité photosynthétique.

La CE_A qui est une mesure linéaire de la quantité d'énergie momentanément disponible à l'intérieur du réservoir de nucléotides (Atkinson, 1977), augmente rapidement pendant la phase latente. Ceci peut préparer les cellu-

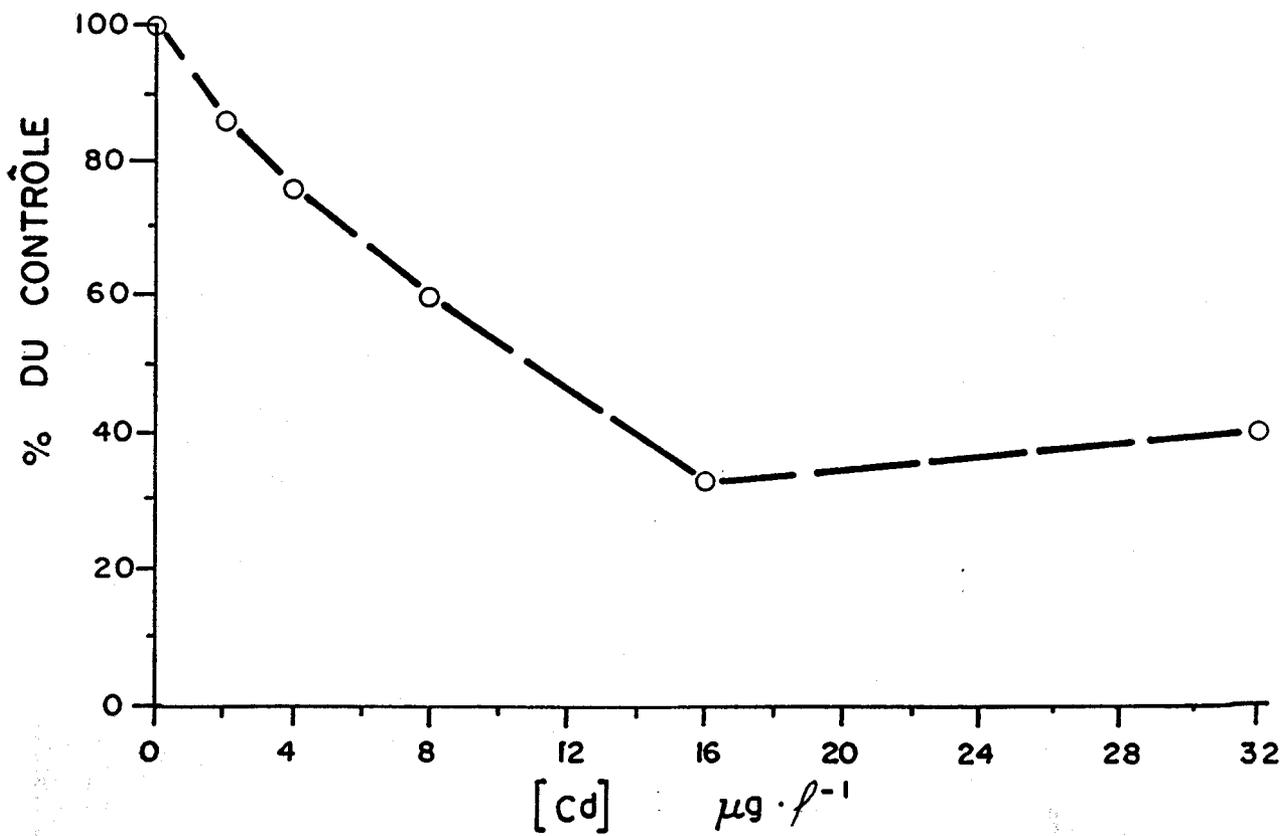


Figure 4: Efficacité photosynthétique (% du témoin) de S. capricornutum à la fin de l'expérience de récupération de 96.

les à la croissance active puisque l'ATP se renouvelle rapidement lorsque la croissance est rapide (Chapman et Atkinson, 1977). À t_{24} de l'expérience avec le cadmium les CE_A les plus faibles sont observées dans les cultures ayant les taux de croissance les plus faibles (8 et 32 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$) (fig. 1A et tableau 4). Cependant à la fin (t_{96}) des trois expériences (exposition au cadmium et récupération), la CE_A est représentative de populations en phase de croissance exponentielle (0.8-0.9) et stationnaire (0.5-0.8) (Falkowski, 1977; Riemann et Wium-Andersen, 1982).

4.3.2 Expérience avec un effluent industriel

La croissance de S. capricornutum est inhibée par l'effluent d'une usine de chlore-alcali. La phase de latence a varié entre 6 h dans le témoin et 48 h dans 10% d'effluent tandis qu'aucune croissance significative n'a été observée au cours de l'expérience dans 25% d'effluent (fig. 5A). Pendant la phase de croissance exponentielle le temps de génération moyen a varié entre 10 h dans le témoin et 14 h dans 10% d'effluent. Ceci a résulté en une corrélation négative, significative entre les taux de croissance (μ_{av}) et la concentration d'effluent ($r = 0.98$; $d < 0.01$). μ_{av} a varié entre 1.45 dans le témoin et 0.09 dans 25% d'effluent (tableau 5). Dans 25% d'effluent l'inhibition de la croissance a résulté à t_{96} en un nombre de cellules inférieur à 1% du témoin. L'effluent a eu des effets similaires sur la chl-a, l'ATP et la somme des adénylates (A_T) qui sont tous fortement corrélés aux densités cellulaires (tableau 2). En effet les CI-50-96 h calculées avec la densité cellulaire, la chl-a, l'ATP et les A_T sont respectivement 3.1, 5.9, 6.9 et 5.4% d'effluent.

À t_{24} , l'efficacité photosynthétique est non-déetectable chez les populations dans 10 et 25% d'effluent. À la fin de l'expérience (t_{96}) elle est toujours non-déetectable dans 25% d'effluent mais elle est supérieure au témoin à toutes les autres concentrations d'effluent (tableau 6). À t_{24} une efficacité photosynthétique réduite ainsi que des densités cellulaires faibles vont de paire avec des valeurs de CE_A faibles (< 0.5). Falkowski (1977) a remis en question la viabilité de population ayant des valeurs de CE_A inférieures à 0.5. Malgré cela, dans notre expérience bien qu'à t_{24} les populations dans 1 à 10% d'effluent avaient des CE_A variant entre 0.39 et 0.03, à t_{96} leur valeur de CE_A était typique de populations en phase stationnaire (1% d'effluent) et exponentielle (4 et 10% d'effluent)

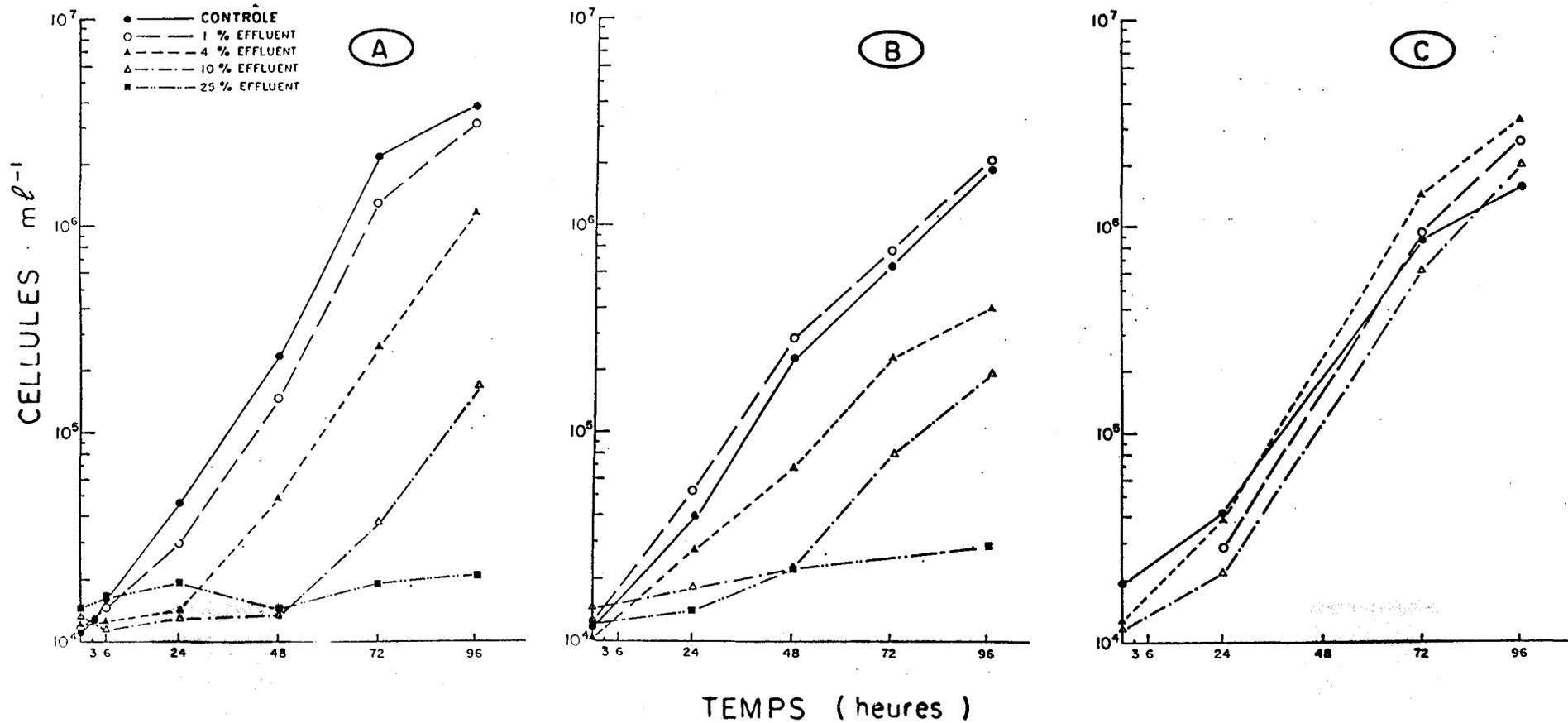


Figure 5: Croissance de populations de *S. capricornutum* exposées à divers concentrats d'effluent industriel (A) et pendant les expériences de récupération 24 (B) et 96 h (C).

Tableau 5: Taux moyen de croissance de S. capricornutum soumises à diverses concentrations d'effluent pendant 96 h.

concentration d'effluent (% v/v)	μ_{av}^*		
	exposition à l'effluent	expérience de récupération 24 h	expérience de récupération 96 h
0	1.45	1.26	1.10
1	1.40	1.28	1.23
4	1.15	0.91	1.39
10	0.64	0.64	1.28
25	0.09	0.22	-

$$* \mu_{av} = \frac{\ln X_T - \ln X_0}{T} \quad (\text{Nyholm, 1985})$$

où X_T = densité cellulaire à la fin de l'expérience ($N \cdot ml^{-1}$)

X_0 = densité cellulaire au début de l'expérience

T = durée de l'expérience (jours)

Tableau 6: Variations de l'efficacité photosynthétique et de la CE_A de S. capricornutum contaminé avec diverses concentrations d'effluent industriel pendant les expériences d'exposition et de récupération.

	[effluent] % (v:v)	Exposition		Expérience de	Expérience de
				récupération	récupération
		t_{24}	t_{96}	24 h t_{96}	96 h t_{96}
efficacité photo- synthétique*	0	1.37	1.43	1.04	1.90
	1	0.96	1.75	2.64	2.45
	4	1.07	1.50	ND	3.17
	10	0.0	2.67	ND	2.83
	25	0.0	0.0	0.90	ND
CE_A	0	0.51	0.65	0.67	0.70
	1	0.39	0.63	0.63	ND
	4	0.08	0.74	ND	0.63
	10	0.03	0.72	0.71	0.63
	25	0.06	0.30	0.27	ND

* $\mu\text{g C} \cdot \mu\text{g chl-a} \cdot \text{h}^{-1}$

ND = non disponible

(tableau 7). Ceci indique que la valeur de 0.5 suggérée par Falkowski (1977) comme étant le niveau critique de viabilité n'est pas absolue puisqu'elle représente vraisemblablement la condition moyenne de la population qui est possiblement composée d'individus avec des valeurs faibles et élevées de CE_A . Si c'est le cas, au cours de l'expérience la population s'acclimate et les individus qui ont été les plus résistants à la substance toxique au début de l'expérience seront responsables de la croissance et de la photosynthèse. Si la densité cellulaire, les rapports P/B et la CE_A sont considérés, la concentration de 25% d'effluent paraît létale pour la population de S. capricornutum car elle n'a pas récupéré au cours des 96 h de l'expérience. Par ailleurs, à t_{96} les rapports P/B et la CE_A des populations dans 1 à 10% d'effluent sont plus élevés qu'ils l'étaient à t_{24} (tableau 7), indiquant ainsi un certain degré d'acclimatation. Ceci pourrait cependant être dû à l'évaporation du chlore résiduel que Moulin (1983) considère responsable de la toxicité de cet effluent. Il a été démontré que le chlore inhibe la photosynthèse des algues (Brook et Baker, 1972).

Après 48 h de croissance l'ATP/cellule a augmenté drastiquement dans les populations dans 0, 1 et 4% d'effluent suggérant ainsi qu'elles étaient déficientes en phosphore (fig. 6A). À t_{96} les populations qui ont paru atteindre la phase stationnaire (0 et 1% d'effluent) (fig. 5A) avaient les plus faibles valeurs d'ATP/cellule (fig. 6A). À ce moment elles étaient probablement les plus limitées en phosphore. Par ailleurs dans les cultures de 10 et 25% d'effluent qui n'ont pas atteint la phase stationnaire, l'ATP/cellule était élevé suggérant que les cellules n'étaient pas limitées en phosphore (fig. 5A et 6A).

Contrairement au cadmium, les densités cellulaires des populations qui ont séjourné pendant 24 h dans des concentrations d'effluent > 4% et ont ensuite été transférées dans du milieu non-contaminé (expérience de récupération 24 h) sont demeurées plus faibles que le témoin (fig. 5B) tandis que lorsque l'exposition à l'effluent a été prolongée à 96 h avant le transfert dans du milieu sain, les densités cellulaires et l'efficacité photosynthétique ont été plus élevées aux concentrations sub-létales d'effluent (fig. 5C; tableau 7). Des densités cellulaires très faibles nous ont empêché

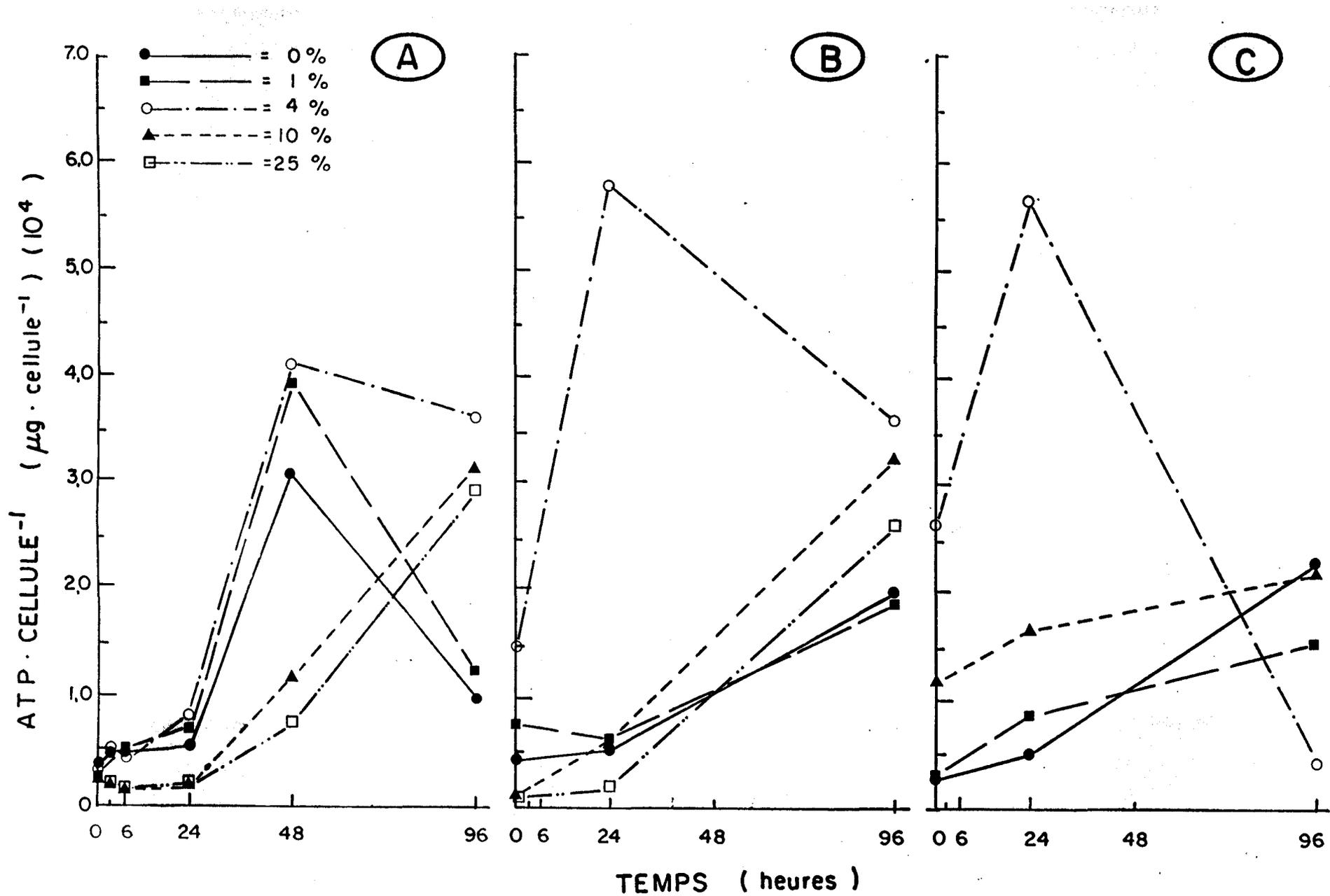


Figure 6: Variations de la concentration d'ATP par cellule chez des populations de *S. capricornutum* exposées à diverses concentrations d'effluent industriel (A) et pendant les expériences de récupération 24 (B) et 96 h (C).

d'effectuer l'expérience de récupération 96 h avec la concentration 25% d'effluent et elle a été considérée létale après 96 h. La capacité des algues à récupérer des effets de l'effluent après 96 h d'exposition mais non après 24 h peut être due à une perte plus importante de chlore résiduel et/ou à une réponse acclimative. Il est cependant difficile d'expliquer pourquoi les μ_{av} et l'efficacité photosynthétique des cultures traitées sont plus élevés que le témoin. Il est possible, comme le suggèrent les données d'ATP/cellule à t_{96} de l'expérience dans le milieu contaminé (fig. 6A) que les cultures 4 et 10% d'effluent n'étaient pas déficientes en phosphore et que la réserve de ce nutriment ait permis une meilleure croissance (μ_{av}^F) et une efficacité photosynthétique plus élevée lorsque les cellules ont été transférées dans du milieu sain (tableaux 5 et 7). À t_{96} de l'expérience de récupération 96 h l'ATP/cellule semble relié aux μ_{av} et à l'efficacité photosynthétique. De fait la population témoin qui possède le taux de croissance et l'efficacité photosynthétique les moins élevés, possède le rapport ATP/cellule le plus élevé suggérant une réserve de phosphore plus élevée à la fin de l'expérience.

À première vue, la CE_A paraît être un indicateur utile de stress. En effet à t_{24} de l'expérience en milieu contaminé, la CE_A était plus faible chez les populations à faible efficacité photosynthétique. Dans les concentrations de 1 à 10% d'effluents ces faibles CE_A ont cependant été transitoires puisqu'entre t_{24} et t_{96} , sa valeur a augmenté tout comme les rapports P/B (tableau 7). Par ailleurs à t_{96} des expériences en milieu contaminé et de récupération 24 h, μ_{av} est demeuré faible aux concentrations 4, 10 et 25% tandis qu'il n'a pas semblé y avoir de différence significative entre les valeurs de CE_A du témoin et des concentrations sub-létales d'effluent (tableaux 5 et 7). Cependant lorsque la population ne récupère pas comme c'est le cas dans 25% d'effluent, la CE_A reste faible (0.3). La CE_A n'apparaît donc pas être un indicateur fiable d'effets insidieux. Ceci est en accord avec Riemann et Wium-Andersen (1982) qui ont suggéré lors de l'étude d'une poussée phytoplanctonique, que l'étendue dynamique de la CE_A est trop étroite pour être utile dans la définition de la croissance et du statut énergétique de la communauté. Lowry *et al.* (1971) ont pour leur part argumenté que le CE_A est un indicateur métabolique insensible.

4.4 Conclusion

À t_{24} l'efficacité photosynthétique est réduite de façon marquée à toutes les concentrations de cadmium. Un certain degré d'acclimatation semble cependant se produire aux plus fortes concentrations de métal; de fait entre t_{24} et t_{96} les rapports P/B des populations contaminées avec 16 et 32 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ ont augmenté de 1.02 et 1.29 à 2.64 et 2.05 $\mu\text{g C.}\mu\text{g chl-a}^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement. Nos résultats ne permettent pas d'établir le mécanisme d'acclimatation. La CE_A de la plupart des populations est représentative de cellules en croissance exponentielle et n'apparaît pas corrélée à la concentration de cadmium.

Dans le cas de l'effluent industriel, les effets à court-terme sur les fonctions cellulaires sont plus importants qu'ils l'étaient avec le cadmium. Par exemple l'efficacité photosynthétique des cultures de 10 et 25% d'effluent est non-détectable tandis que la charge énergétique des populations dans les concentrations d'effluent $> 4\%$ est inférieure à 0.1. À t_{96} l'efficacité photosynthétique de toutes les populations à l'exception de 25% d'effluent qui est considéré létal (rapport P/B = non-détectable) est plus élevée que le témoin et leur CE_A est dans la gamme de valeurs citées pour les phases stationnaire (1% d'effluent) et exponentielle (4 et 10% d'effluent) de croissance. Dans ce contexte, il semble que la CE_A soit seulement un bon indicateur de stress aigu. Malgré le fait que ces deux paramètres fonctionnels suggèrent qu'à l'intérieur de 96 h les algues dans les concentrations d'effluent $< 25\%$ se sont acclimatées au toxique, au même moment les densités cellulaires sont toujours beaucoup plus faibles que dans le témoin et ce paramètre n'indique pas d'acclimatation à l'effluent. La croissance au cours de l'expérience de récupération 96 h semble supporter l'hypothèse d'acclimatation suggérée par les données fonctionnelles puisqu'à t_{96} elle est supérieure au témoin à toutes les concentrations d'effluent. L'expérience de récupération 96 h suggère donc qu'après 96 h, les effets de l'effluent industriel ne sont pas persistants. On devrait cependant garder en tête que ceci peut être en partie dû à l'évaporation du chlore résiduel que l'on retrouve dans l'effluent.

Notre expérience avec le cadmium suggère aussi que l'efficacité photosynthétique est un meilleur indicateur de toxicité puisqu'à t_{24} elle est fortement négativement corrélée avec la concentration de cadmium et ce malgré le fait que la croissance (μ_{av}) est plus élevée dans 4 et 8 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ que dans le témoin. Nous suggérons que le statut nutritionnel des populations utilisées pour effectuer les bio-essais est responsable de ces différences dans les taux de croissance et que le rapport ATP/cellule est un indicateur de la déficience en phosphore des cellules. La valeur de ce rapport paraît relié au rendement final des populations au cours des deux expériences. À t_{24} , le phénomène de prise en charge de phosphore qui est observé par l'augmentation de l'ATP/cellule dans le témoin et dans 2 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ (traitement et récupération) et à t_{48} dans le témoin, 1 et 4% d'effluent (traitement) n'est pas observé aux plus fortes concentrations de cadmium et d'effluent. Il est possible soit que dû à l'absence de données à t_{48} et t_{72} des expériences de récupération que nous n'ayons pu observé l'augmentation d'ATP/cellule due à une déficience en phosphore ou alternativement comme l'ont suggéré Brezonick et al. (1975) pour le mercure, que la présence de fortes concentrations de cadmium et d'effluent industriel amène des diminutions d'ATP masquant ainsi le phénomène décrit plus haut. Si c'est le cas, cette diminution d'ATP est le seul effet sous-aigu du cadmium sur S. capricornutum après une exposition de 24 h. Dans cette perspective, de la recherche incorporant des données de phosphore intra-cellulaire est nécessaire pour vérifier l'hypothèse que la suffisance en phosphore pourrait retarder la toxicité du cadmium. Il serait aussi important d'investiguer les mécanismes responsables des réponses acclimatatives à certaines concentrations de cadmium et possiblement à des concentrations sub-létales d'effluent industriel.

5. L'importance du concept de charge énergétique pour distinguer entre l'acclimatation et la perte de viabilité de communautés microbiennes aquatiques soumises à des agressions toxiques

Résumé

Les processus d'acclimatation ou de mortalité chez une communauté microbienne lotique, soumise à diverses concentrations de cadmium ou d'effluent industriel, sont discriminés en comparant les réponses détectées à partir de variables représentatives de la biomasse cellulaire (chlorophylle-a, somme des nucléotides adénylates) avec celles associées à des mesures de taux métaboliques (assimilation de carbone, charge énergétique en adénylates). Les effets reliés à l'action du cadmium sont réversibles alors que ceux associés à l'effluent ne le sont pas. Dans les deux cas, la fixation du carbone est rapidement inhibée alors que la diffusion des constituants cellulaires est lente et ne peut être décelée qu'après 8 heures d'exposition avec le cadmium. Par contre, la perte de constituants cellulaires chez la communauté soumise à l'effluent industriel est immédiate et décroît de façon exponentielle. La mortalité est nettement détectée à partir du taux de diminution de la charge énergétique. Les principales conclusions qui découlent de cette étude sont les suivantes: (1) lorsqu'il est pertinent de préciser l'impact de substances altérageènes sur les taux de renouvellement de la communauté microbienne, les changements dans la concentration des constituants cellulaires sont plus fiables que les changements observés dans les taux de processus métaboliques lesquels sont modifiés par l'acclimatation des cellules aux conditions variables de l'environnement; (2) les déterminations de taux de processus métaboliques peuvent être utilisées pour préciser si l'effet des toxiques est réversible ou, encore, comme un indicateur du temps relatif d'acclimatation.

5.1 Introduction

Dans leur démarche d'évaluation des modifications apportées à l'intégrité des communautés microbiennes aquatiques, les écologistes et les toxicologues se butent à de nombreuses contraintes d'ordre méthodologique. Parmi celles-ci, mentionnons que plusieurs mesures des taux métaboliques ne sont qu'indirectement reliées au taux de croissance de la communauté. Ceci a suscité des efforts de recherche orientés vers l'amélioration de la précision des variables utilisées pour la détermination des taux de renouvellement des espèces dominantes dans des communautés limnétiques (Harris, 1980) et océaniques (Laws et al., 1984). Cet effort est soutenu par la nécessité de déterminer si les taux spécifiques de croissance des espèces dominantes de la communauté sont optimisés et maintenus près de μ_{\max} par une série de stratégies adaptives intégrant les évènements environnementaux d'une durée inférieure ou égale au temps de génération de la cellule ou si au contraire, les taux in situ de renouvellement sont sous-optimaux et varient selon la composition spécifique et le taux de remplacement des espèces. Si μ_{\max} est maintenu, en considérant un taux moyen de croissance établi à plus long terme (mois), les transferts d'énergie (ou alternativement les changements de biomasse) le long de la chaîne alimentaire se prêteraient plus facilement à la modélisation parce que la condition d'équilibre nécessaire à la solution simultanée d'équations différentielles pourrait être envisagée avec plus de certitude.

Si μ_{\max} n'est pas maintenu, des méthodes permettant de déterminer les taux de remplacement des espèces devront être mises au point et plus particulièrement des méthodes permettant de distinguer entre l'acclimatation et la mortalité. L'échelle de temps qui correspond à ces processus dans des communautés naturelles ou perturbées par des agents d'origine anthropique devra aussi être déterminée. Lorsque le pourcentage d'inhibition d'un processus métabolique est mesuré sur une échelle temporelle inférieure au temps de génération, il s'avère souvent difficile de discriminer entre une diminution temporaire du taux métabolique (acclimatation) et la mortalité de certains membres de la communauté. Par exemple, lors de la récupération suite à une carence en éléments nutritifs, l'assimilation du ^{14}C est souvent supprimée par des réactions compétitionnant pour l'énergie de phosphorylation

(Healey, 1979; Lean et Pick, 1981); cet effet étant transitoire, il ne réduira pas nécessairement le taux moyen de reproduction de la population.

Finalement, la relation entre l'échelle temporelle nécessaire à l'acclimatation ou au remplacement d'espèces ou de niches dans les communautés microbiennes perturbées et la nature de la substance ou de son influence perturbante est très mal connue et serait d'ailleurs un aspect souhaitable du processus d'évaluation d'impacts environnementaux. Nous rendons compte de deux expériences de perturbation dans lesquelles deux paramètres reflétant le taux intrinsèque de croissance naturelle de la communauté microbienne, à savoir la concentration totale de nucléotides adénylates (A_T) et les variations de biomasse de la composante phytoplanctonique soit la chlorophylle-a ($chl-a$). Ces deux variables sont comparés à deux mesures sensibles des taux métaboliques: les déterminations de l'assimilation du ^{14}C et de la charge énergétique en adénylates. Ces expériences ont été effectuées in situ dans des enceintes placées dans une rivière perturbée par des activités anthropiques et modifiées soit par l'ajout de cadmium ou par l'ajout d'un effluent industriel.

5.2 Matériel et méthodes

Les expériences ont été effectuées en septembre et en octobre 1984 sur la rivière St-Louis située approximativement à 50 km au sud-est de Montréal, Québec (figure 1). La rivière s'écoule sur un lit d'argile et atteint une profondeur maximale de 6.7 mètres et des vitesses de courant variant entre 4.6 (étiage d'été) et 59.7 (crues printanières) $cm.s^{-1}$. Son débit moyen est de $1.7 \times 10^3 m^3.s^{-1}$. En amont, la rivière draine principalement des terres agricoles, tandis qu'en aval elle reçoit les eaux usées de plusieurs industries (Roy, 1982; Moulins, 1983). Puisque notre intérêt principal était de perturber une communauté microbienne naturelle, la station expérimentale était située près de la première décharge d'effluent industriel dans la partie aval de la rivière. Les caractéristiques chimiques de cet effluent provenant d'une usine de chlore-alcali ont été décrites antérieurement et sont présentées au tableau 1. L'expérience a consisté à perturber la communauté microbienne indigène de la partie amont avec diverses concentrations d'effluent dans le but de comparer sa réponse physiologique avec celle de

Tableau 1: Caractéristiques chimiques de l'effluent de l'usine de chlore-alcali (Fedida, 1982).

<u>Composés inorganiques</u>		<u>Métaux traces</u> $\mu\text{g.l}^{-1}$	
<u>ions majeurs</u> (mg.l^{-1})			
pH	9.1	Cd	<10
Ca	38	Co	<25
Mg	12	Cr	<20
Al	<0.20	Cu	<20
Mn	.027	Fe	101-426
SO ₄	230	Hg	2.3-6.4
sulfides	<0.2	Ni	<10-14
CN ⁻	<0.03	Pb	<10-15
NH ₃	<0.1	Zn	<10-58
Cl ⁻	160		
chlore résiduel	0.1		

<u>Composés organiques*</u>			
$(\mu\text{g.l}^{-1}; \text{T}=\text{trace}; \text{nd}=\text{non-déetectable})$			
Carbon tétrachloride	ND-02	1,2-Dichloroéthane	T
Chloroforme	ND-06	Dichlorométhane	ND-55
1,1-Dichloroéthylène	T	Bis(2-éthylhexyl)phthalate	ND-04
Trans-1,2-Dichloroéthylène	14-23	Diéthylphthalate	ND-03
Trichloroéthylène	39-66	Di-n-Butylphthalate	ND-16
1,4-Dichlorobenzène	ND-09*	Phénol	ND-01
Ethylbenzène	1	Toluène	T

* : déterminé par GC/MS.

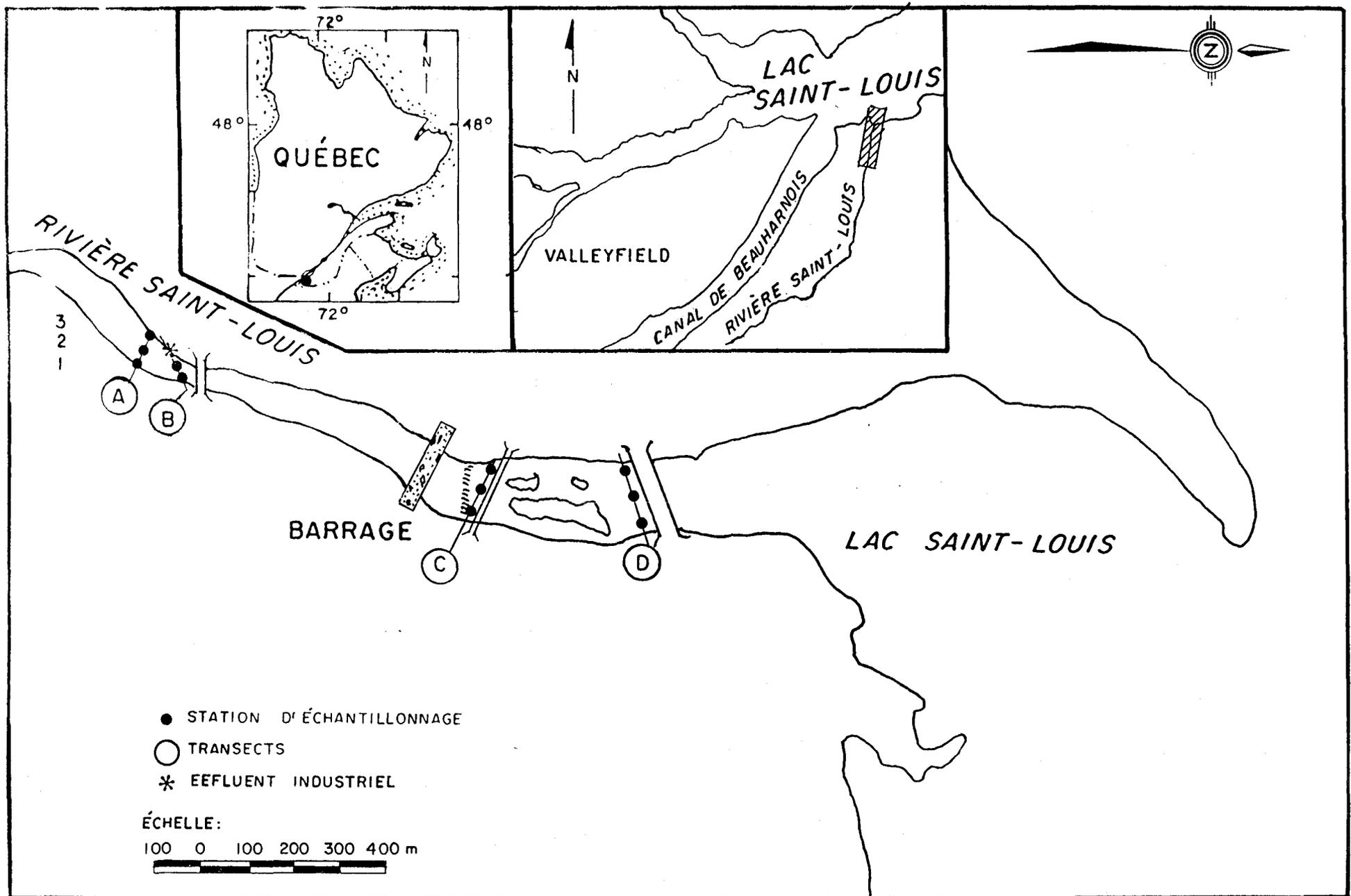


Figure 1: Localisation de la rivière St-Louis et des stations d'échantillonnage.

témoins dilués; par ailleurs, dans une autre série d'expérience la communauté a été perturbée par l'ajout de cadmium. Le cadmium a été sélectionné en tant que substance toxique de référence parce que nous voulions examiner des réponses sub-létales dans les paramètres biologiques mesurés.

Ces expériences ont été réalisées in situ dans des enceintes de 12 L, pendant presque 24 heures. L'expérience avec le cadmium a été réalisée le 20 septembre tandis que celle avec l'effluent l'a été le 26 septembre 1984. Pour toutes les expériences un grand volume d'eau (60 L) contenant la communauté microbienne indigène a été obtenu 100 m en amont de la décharge d'effluent et subdivisé dans des enceintes de 12 L, puis contaminé par l'ajout de cadmium ou d'effluent. L'ajout d'effluent a dilué la biomasse initiale de sorte que dans ces expériences les témoins ont été dilués avec de l'eau Millipore (procédé "Q"). L'assimilation de carbone-14 a été mesurée dans des bouteilles séparées (4 L), auxquelles 50 μCi de NaHCO_3 ont été ajoutés. Elles ont été incubées de façon identique aux enceintes de 12 L. La première expérience a consisté à mélanger dans 5 enceintes, de l'eau de rivière filtrée (100 μm) avec du cadmium afin d'obtenir des concentrations finales de 8,99 $\mu\text{g.l}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ et 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Des concentrations élevées du métal trace ont été nécessaires pour compenser pour sa complexation à la matière humique de l'eau de rivière. Les échantillons utilisés dans les analyses décrites ci-dessous ont été obtenus à 0 (09:45 heure locale), 1, 2, 4, 8 et 20 heures. Dans la deuxième expérience l'effluent industriel a été mélangé à de l'eau de rivière dans 4 enceintes pour obtenir des rapports v:v de 0, 10, 25 et 50% effluent: eau de rivière. Pour les deux expériences, aux temps spécifiés ci-dessus, des sous-échantillons ont été prélevés pour les déterminations de chl-a, du ^{14}C assimilé et des nucléotides adénylates. La chl-a a été mesurée en fluorescence selon la méthode décrite au chapitre 4. Des sous-échantillons ont été prélevés en duplicata des bouteilles d'incubation de carbone-14, filtrés sur des membranes de 0.4 μm de Nucleopore et comptés par scintillation liquide (LKB Rackbeta). La correction pour l'affaiblissement lumineux a été effectuée sur les échantillons en utilisant un standard interne d'hexadécane et la méthode des rapports des canaux des échantillons. L'activité spécifique des bouteilles a été déterminée en injectant 100 μl d'éthanolamine avec un comptage subséquent dans du

Scintiverse. Les blancs au temps zéro ont été soustraits et l'assimilation du ^{12}C calculée en tenant compte de l'alcalinité et du pH.

Pour la détermination des nucléotides adénylates, les échantillons ont été filtrés sur des filtres Nuclepore $0.4\ \mu\text{m}$ et extraits selon la méthode décrite au chapitre 4.

5.3 Résultats

5.3.1 Expérience avec le cadmium

Immédiatement après l'ajout de cadmium, une réduction importante du taux d'assimilation de ^{14}C a été observée dans les enceintes de 100 et 1000 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ (figure 2). Cependant, un rétablissement progressif de la capacité d'assimilation du carbone a débuté après le temps 0 de sorte qu'après 8 heures d'incubation l'enceinte traitée avec 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cd avait atteint des niveaux d'assimilation qui n'étaient plus statistiquement différents du témoin et de l'enceinte 8.99 $\mu\text{g.l}^{-1}$. À la plus forte concentration de métal, l'assimilation de ^{14}C n'a pas été rétablie à des niveaux voisins du témoin, et ce même après 20 heures. Puisque cette dernière mesure a été effectuée tôt le matin à la fin de la période d'incubation, il nous a été impossible de déterminer la réversibilité de l'inhibition de l'assimilation de ^{14}C à cette concentration de métal.

La variation temporelle des valeurs de charge énergétique (CE_A) a suivi un patron semblable aux variations d'assimilation de ^{14}C : une réduction dans les 30 secondes (i.e. première mesure) qui ont suivi l'ajout de cadmium pour les deux plus fortes concentrations, suivie dans le cas de l'enceinte 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ d'une récupération dans les 8 heures (figure 3). Au moment de la dernière mesure, les valeurs de CE_A étaient inversement proportionnelles à la concentration de métal ajoutée.

Par ailleurs, comme pour l'assimilation du ^{14}C , cette mesure a été effectuée à la fin de la période d'incubation et si nous supposons que la

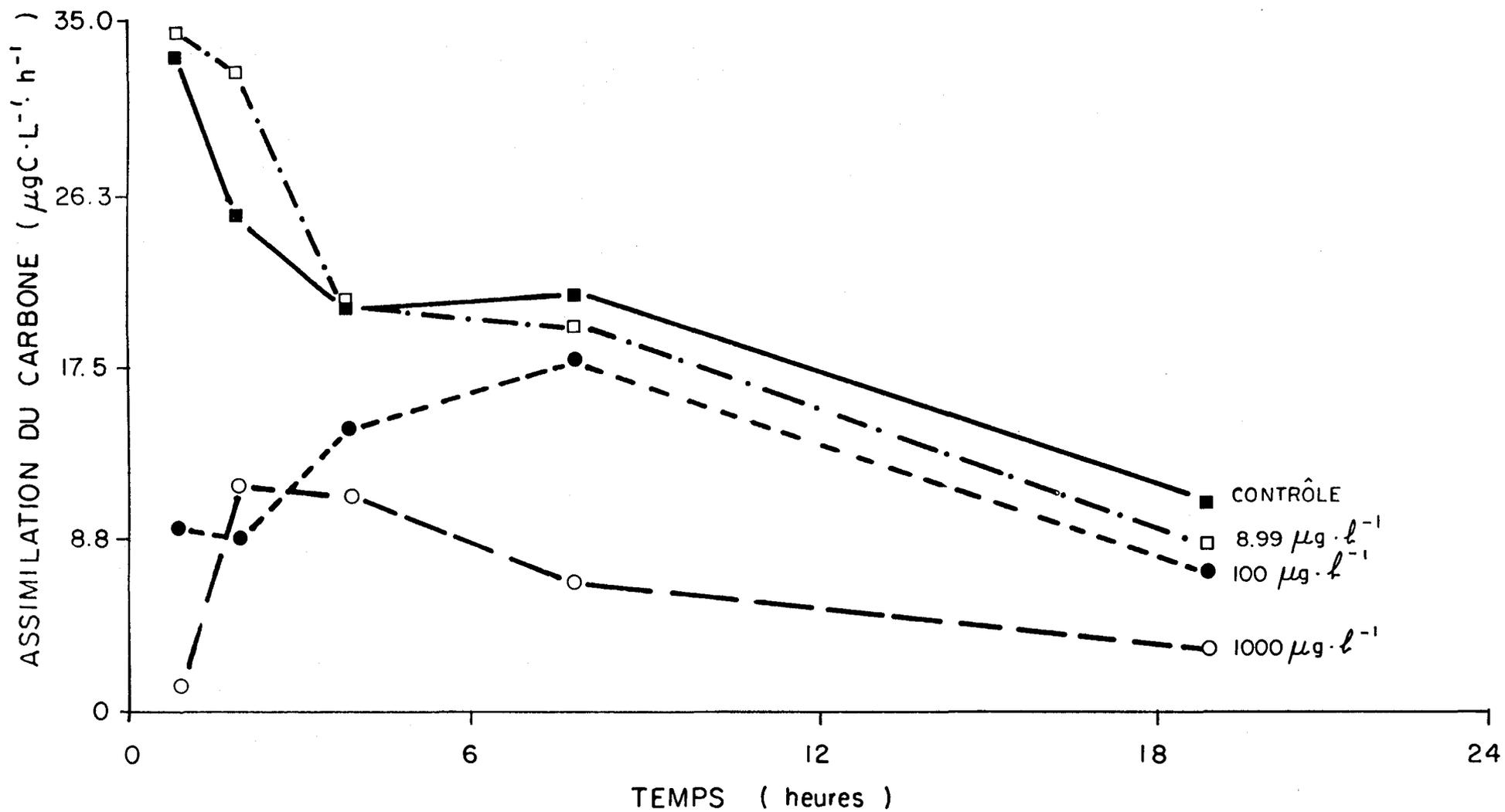


Figure 2: Assimilation du carbone 14 avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium: 8.99 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

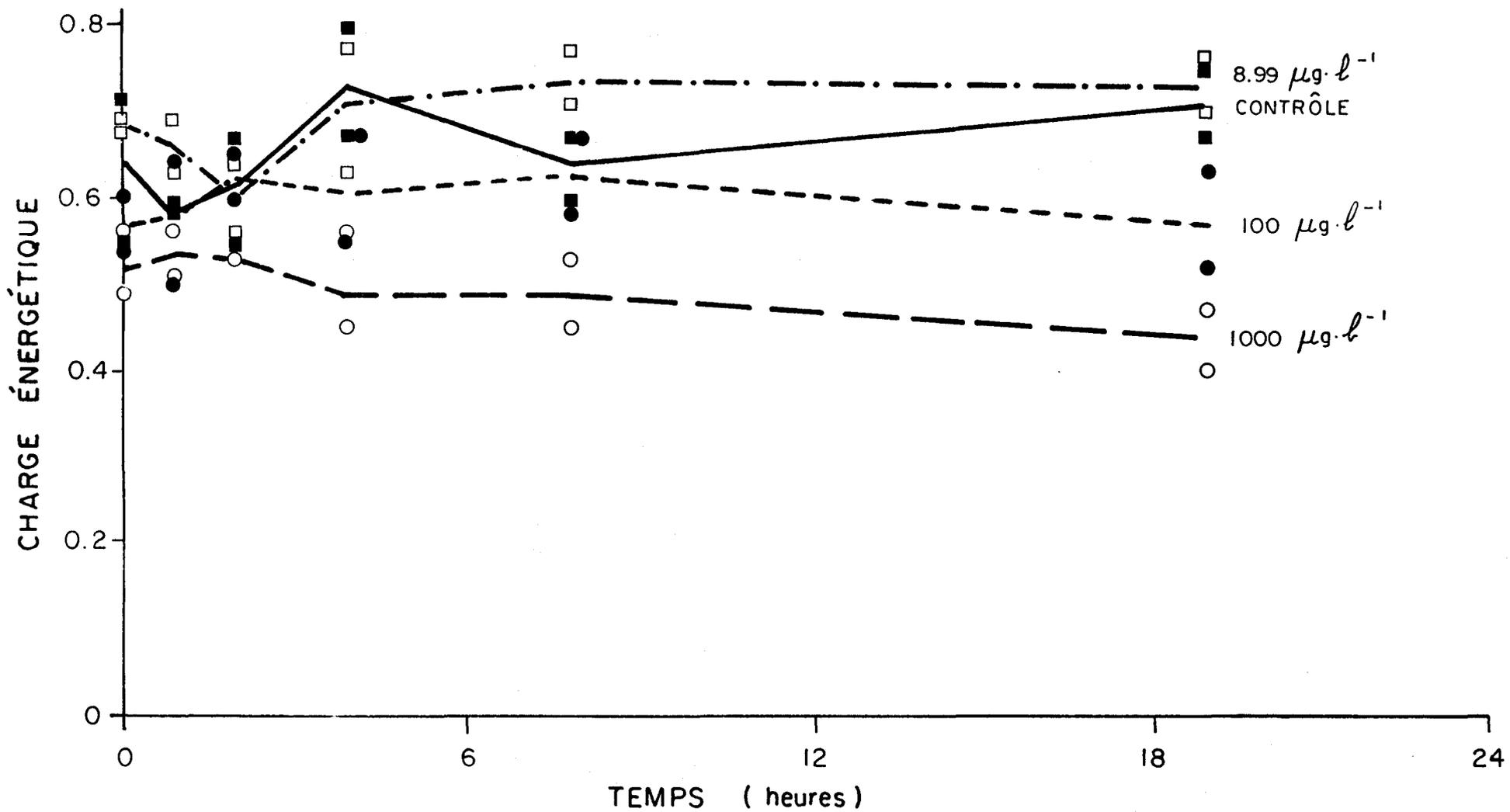


Figure 3: Variations de la charge énergétique avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium.
Symboles cf. fig. 2

Tableau 2: Analyse de variance menée sur les mesures de CE_A de l'expérience avec le cadmium.

Analyse de variance

Variable énergétique

Cadmium vs Contrôle	DF	F	Signification
0.08 μ M	22	3.337	.05 < p < .10
0.89 μ M	22	9.300	.025 < p < .05
8.90 μ M	22	45.077	p < .001

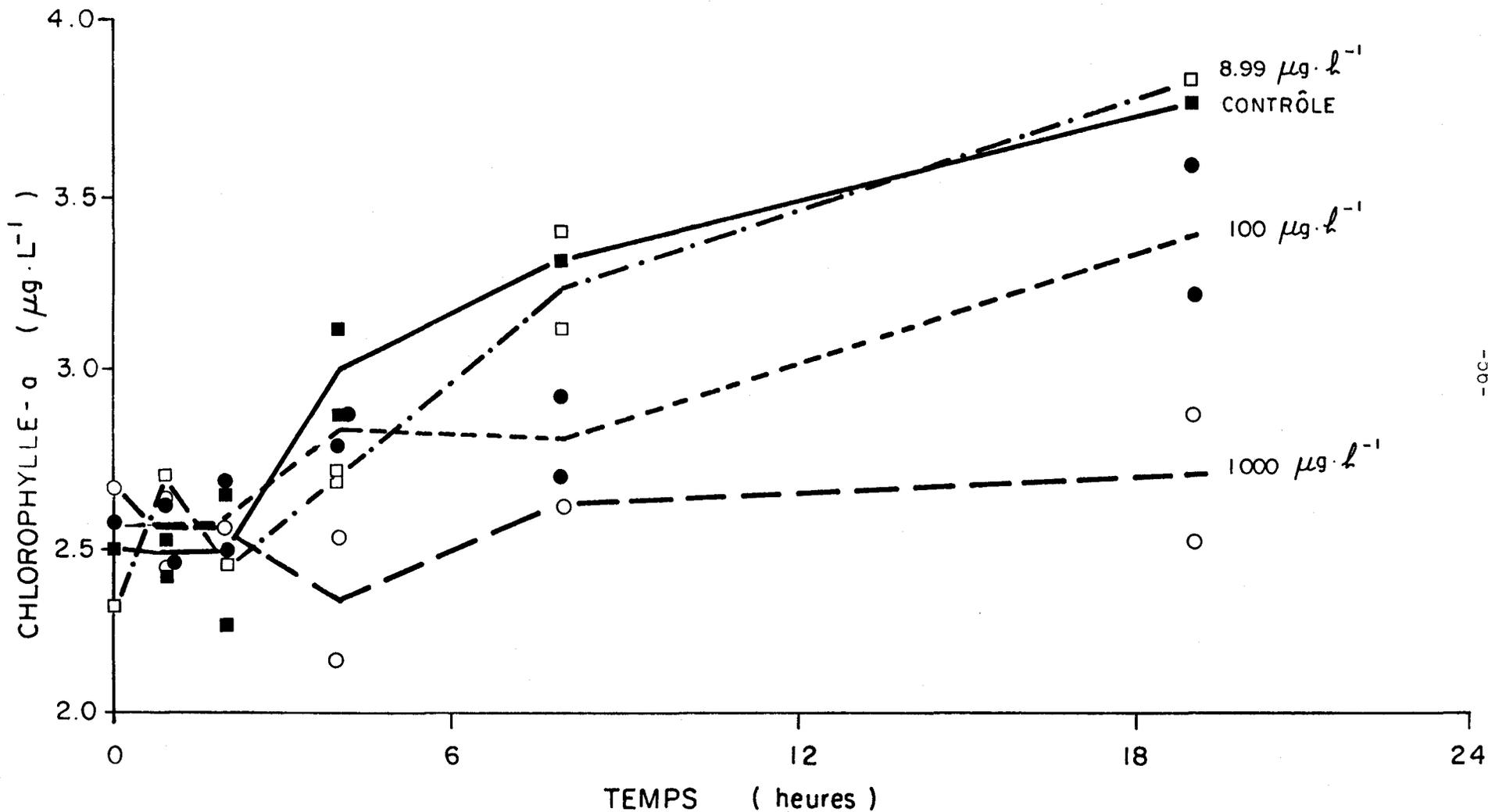


Figure 4: Variations de chlorophylle-a avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium.
Symboles cf. fig. 2.

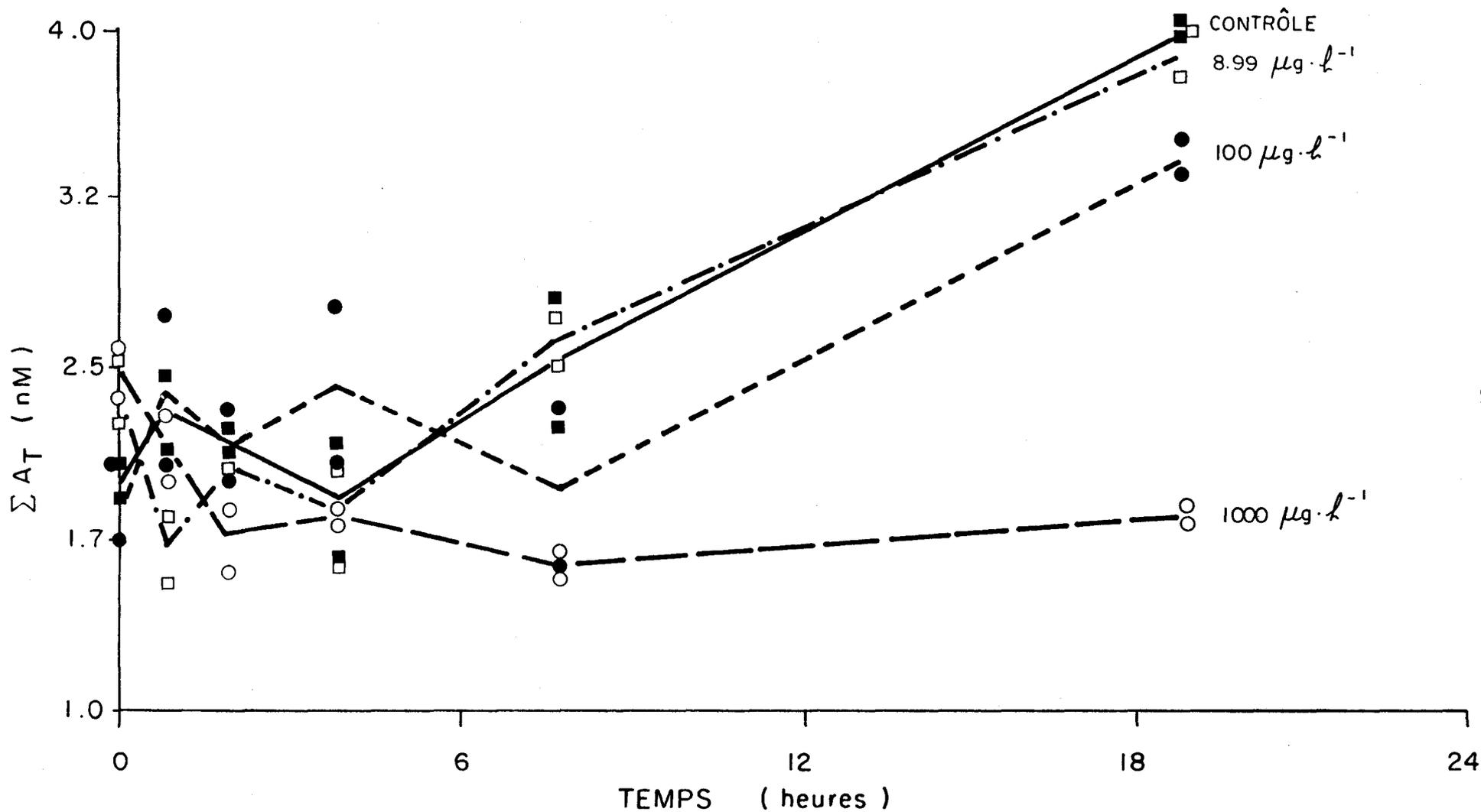


Figure 5: Variations des adénylates totales avec le temps au cours de l'expérience avec le cadmium.
Symboles cf. fig. 2.

récupération nécessite de l'ATP, les faibles valeurs observées dans les enceintes traitées avec 100 et 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pourraient indiquer son utilisation pendant cette période pour permettre la récupération. Une analyse de variance à un critère (ANOVA) (tableau 2) a révélé des différences entre les moyennes des valeurs de CE_A des enceintes traitées avec les plus fortes concentrations de cadmium et le témoin.

Contrairement aux données d'assimilation de carbone 14 et de charge énergétique, les concentrations de chl-a étaient initialement semblables dans toutes les enceintes. Des différences significatives ne sont apparues qu'après 20 heures d'incubation dans les enceintes traitées avec 100 et 1000 $\mu\text{g Cd.l}^{-1}$ (figure 4). La croissance a été complètement inhibée à la plus forte concentration du métal. Un patron similaire de variations temporelles a été observé pour les concentrations en adénylates totales, avec des diminutions évidentes observées après 8 et 20 heures aux deux plus fortes concentrations de cadmium (figure 5). D'ailleurs, à la concentration 1000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ la croissance semble, dans ce cas aussi, être complètement inhibée. Au temps 20 heures, le rapport chl-a: A_T était inférieur dans les enceintes traitées qu'après 8 heures d'incubation. Ceci pourrait être dû à des variations diurnes des concentrations intracellulaires de chl-a, ou représenter une différence de sensibilité au cadmium entre le phytoplancton et les bactéries. Il est intéressant de noter qu'au cours des premières heures d'incubation, ni la chl-a, ni les A_T , n'ont varié en fonction du traitement. Le fait que ces deux constituants cellulaires (mais particulièrement les adénylates) sont conservés, suggère que l'ajout d'une forte concentration de métal trace n'effecte apparemment pas, à très court terme, l'intégrité cellulaire, comme par exemple, par la perte rapide de métabolites critiques. Cependant, la diminution initiale de charge énergétique suggère soit une demande énergétique intracellulaire qui ne peut pas être complètement compensé par la glycolyse ou alternativement, un changement rapide dans les rapports entre les adénylates par l'entrave d'une voie métabolique productrice d'ATP empêchant ainsi la restauration immédiate des valeurs élevées de CE_A .

5.3.2 Expérience avec l'effluent industriel

Les effets physiologiques de l'effluent industriel ont été plus sévères que ceux observés avec le cadmium. Le premier point distinctif est la perte apparemment irréversible soit de constituants cellulaires ou soit de l'activité métabolique avec le temps. Après le temps zéro, les adénylates, la CE_A et les concentrations de chl-a ont diminué à une vitesse approchant celle d'une réaction cinétique de premier ordre (figures 6, 7 et 8). Les constantes de vitesse pour les divers constituants cellulaires et l'ajustement des données à une relation log-normale apparaissent au tableau 3. L'assimilation de ^{14}C présente la diminution la plus importante de l'activité métabolique; reflétant probablement ainsi l'inhibition de l'assimilation plutôt que l'excrétion de métabolites marqués. Nos résultats ne nous permettent cependant pas de vérifier cette hypothèse (figure 9). Une comparaison des constantes de vitesse pour tous les paramètres aux diverses concentrations d'effluent a mis en évidence des différences significatives seulement pour le mélange 50% d'effluent. À cette concentration la perte d'ATP et la diminution de la CE_A ont été beaucoup plus rapides que les variations correspondantes A_T . Étant donné que les variations A_T n'ont pas été plus importantes dans le mélange 25% que dans celui de 10% mais que la diminution de la charge énergétique a été plus forte, nous suggérons que la cause première des diminutions d'ATP et de CE_A était soit la disparition du gradient de protons nécessaire à la phosphorylation photosynthétique ou respiratoire, ou l'entrave directe d'une voie métabolique productrice d'ATP. La vitesse de diminution de la CE_A était presque identique à celle calculée lors de la mortalité d'E. coli déficient en glucose (0.04 h^{-1} , c.f. figure 9 de Chapman et al., 1971).

Après 20 heures d'incubation, les diminutions de biomasse, mesurées par la chl-a, étaient semblables pour les trois concentrations d'effluent. Elles étaient de 75% dans l'enceinte 10% et de 77% pour les concentrations de 25 et 50% d'effluent (figure 8).

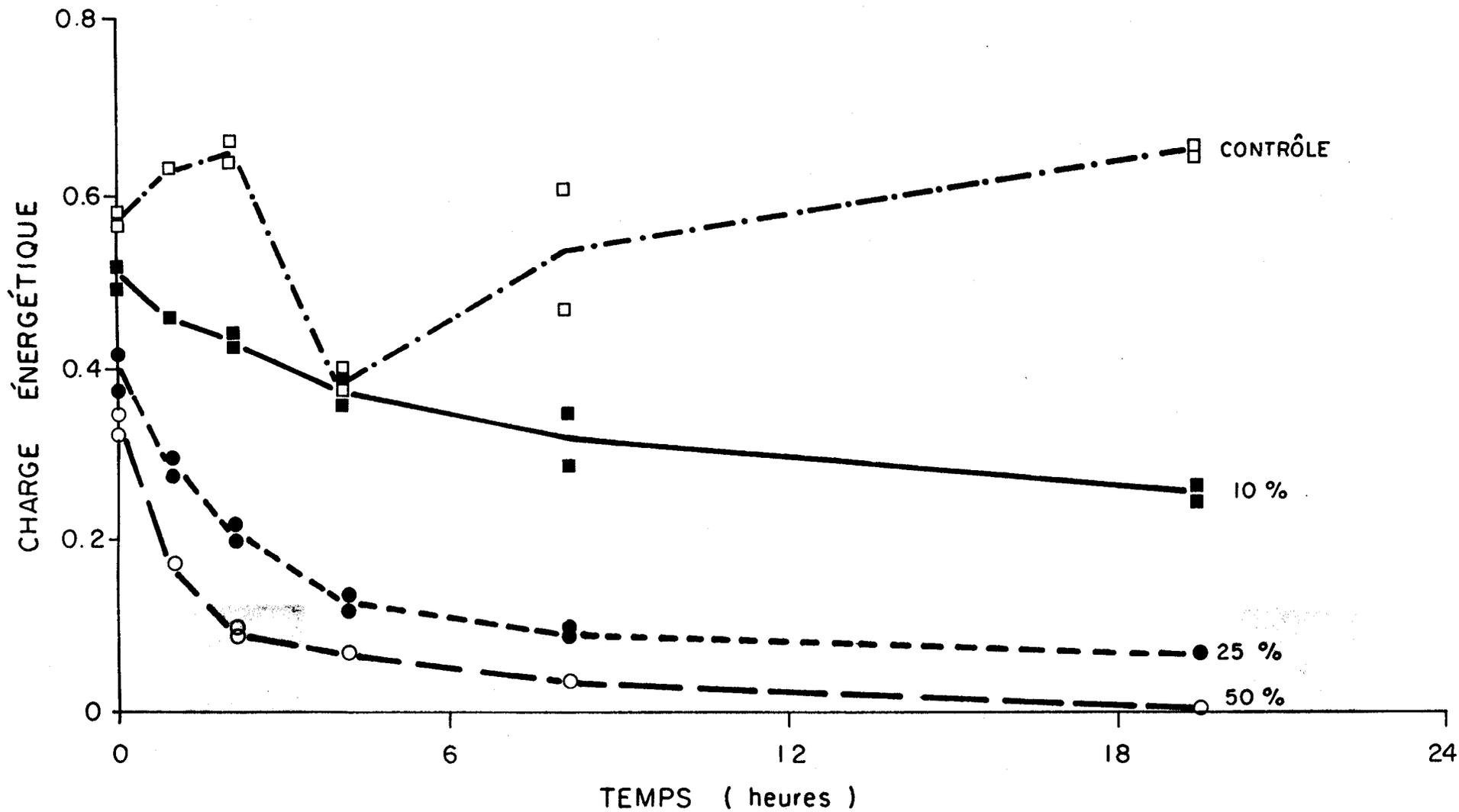


Figure 6: Variations de la charge énergétique avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent contrôlé: 10%, 25%, 50%.

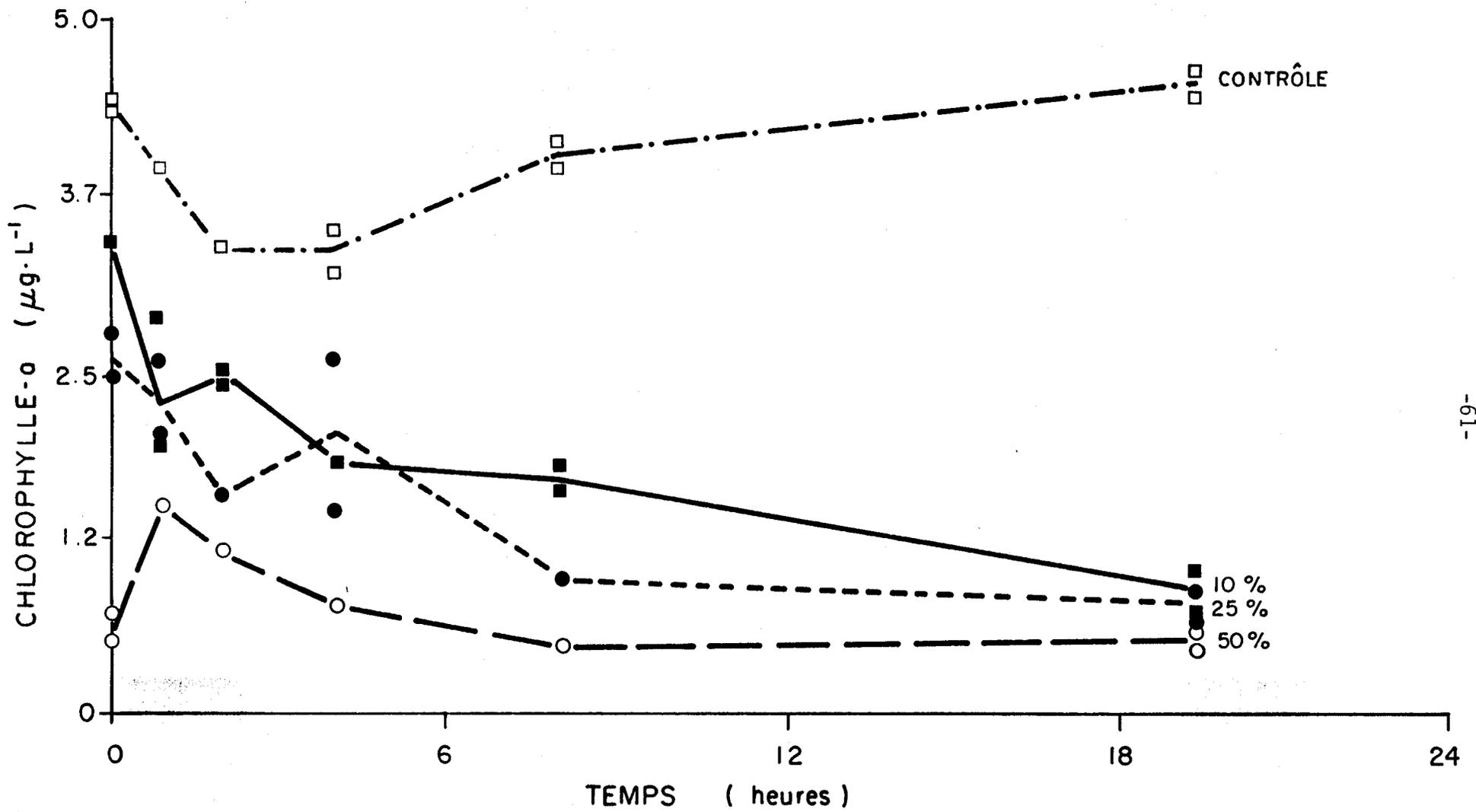


Figure 7: Variations de chlorophylle-a avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent.
Symboles cf. fig. 6.

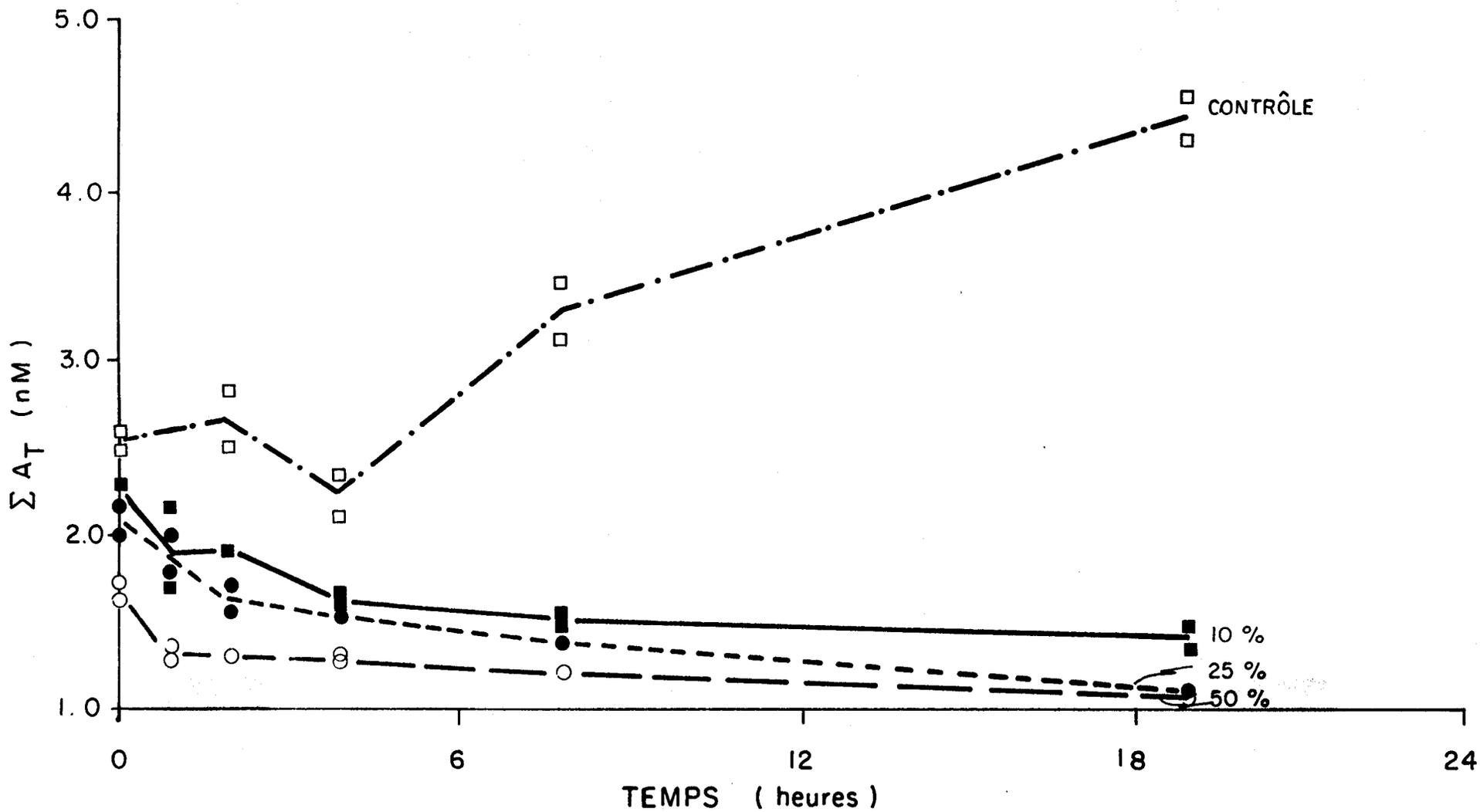


Figure 8: Variations des adénylates totales avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent.
Symboles cf. fig. 6.

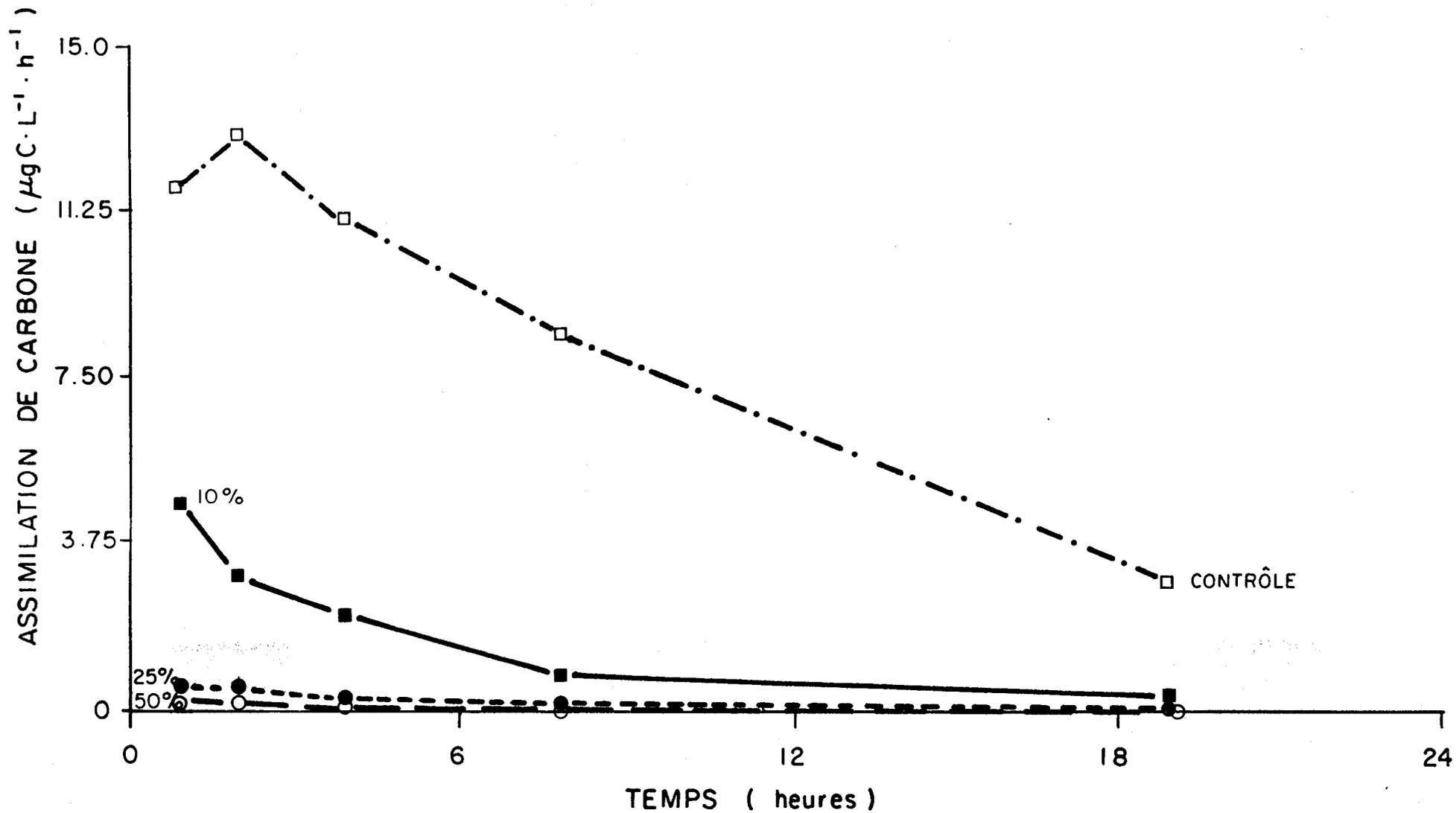


Figure 9: Assimilation du carbone 14 avec le temps au cours de l'expérience avec l'effluent.
Symboles cf. fig. 6

Tableau 3: Constantes de vitesse de premier ordre calculées avec les valeurs provenant de l'expérience avec l'effluent.
(valeur r^2 entre parenthèse, na = pas un ajustement log-linéaire).

Traitement	10%	25%	50%
<u>Constituants</u>			
Chlorophylle-a	.05 (.86)	.05 (.87)	na
Adénylates totales	.02 (.71)	.02 (.83)	.01 (.61)
<u>Processus</u>			
assimilation ^{14}C	.10 (.79)	.08 (.94)	na
charge énergétique	.03 (.92)	.07 (.72)	na

5.4 Discussion

Malgré l'utilité potentielle dans les études de toxicologie aquatique du concept de la charge énergétique en adénylates telle que suggérée par Karl (1980), à notre connaissance une seule étude s'est depuis adressée à ce sujet (Fitzwater et al., 1983). Un nombre d'excellents investigateurs ont suggéré que la CE_A serait un indicateur métabolique insensible puisque des changements absolus dans les rapports entre les adénylates ne se reflètent pas dans la CE_A (Lowry et al., 1971). De plus, dans des conditions où le taux d'activation glycolytique n'est pas inhibé ou réduit, une CE_A faible peut être rétablie sur une échelle de temps (secondes) qui ne peut être investiguée par les méthodes expérimentales actuelles. Des travaux récents sur la physiologie des procaryotes (résumés dans Chapman et Atkinson, 1977) et des algues eucaryotes (Weiler et Karl, 1979; Laws et al., 1983) ont raisonnablement démontré la non-variabilité de ce paramètre pendant un cycle diurne et dans des conditions où l'azote, le phosphore et la lumière étaient limitants. D'ailleurs, des diminutions sans équivoque de la CE_A sont perçues seulement lorsque: 1) le substrat catabolique est restreint, limitant ainsi l'activation glycolytique (Chapman et al., 1971) ou 2) lorsque des inhibiteurs spécifiques du flux glycolytique (Feldheim et al., 1966; Maitra et Estabrook, 1967) ou des trappes pour la chaîne respiratoire de transport d'électrons, comme le CCCP, sont utilisées (Kopperschlager et al., 1967; Robertson et Wolfe, 1970; Slayman, 1973). La destruction directe de l'ATP, via la réaction de l'ATP sulfurylase lorsque des oxyanions du groupe VI, analogues au sulfate sont co-transportés rapidement à l'intérieur de Desulfovibrio, a aussi été démontrée (Taylor et Oremland, 1979).

C'est précisément cet ajustement étroit entre la synthèse et l'utilisation des adénylates, permettant de maintenir un contrôle homéostatique de la CE_A qui nous a incité à utiliser sa variation comme mesure de la perte de viabilité des communautés microbiennes naturelles. Attendu que les rapports entre les adénylates sont les principaux métabolites modulant le flux à travers les voies métaboliques productrices d'ATP, contrôlées allostériquement, il ne serait pas surprenant de découvrir que les rapports résistent à la plupart des perturbations de nature transitoire. Nos résultats des expé-

riences avec le cadmium et l'effluent industriel révèlent une diminution de la CE_A immédiatement après leur ajout. Dans le cas de la série expérimentale avec le cadmium, la valeur de la CE_A a ensuite augmenté et elle a fluctué autour des valeurs de l'enceinte témoin. Ceci indique la réversibilité et la restauration de valeurs proches de la normale. Par contre, l'exposition à l'effluent a apparemment eu comme résultat une incapacité de maintenir le gradient de protons à travers les membranes des organites et une perte de viabilité. Étant donné la nature hétérogène de l'effluent, il est difficile d'attribuer cet effet à une substance en particulier. Moulins (1983) a cependant suggéré que la quantité de chlore résiduel pourrait être invoquée comme agent causal (tableau 1).

Bien que le pourcentage d'inhibition de l'assimilation du carbone est souvent utilisé comme mesure de la toxicité d'un métal trace donné (Rueter et al., 1979; Fitzwater et al., 1982), il existe peu d'information dans la littérature concernant les mécanismes responsables de ces diminutions. En partant de l'état actuel des connaissances des interactions phytoplancton-métal trace, une hypothèse de travail vraisemblable peut être mise de l'avant. Premièrement, lors de l'ajout d'un métal trace à une population clonale en croissance dans un milieu de culture chimiquement défini, une part importante du métal semble être rapidement (< 10 minutes) échangeable avec des agents chélatants suggérant qu'il réagit ou s'adsorbe à la paroi cellulaire, à la membrane ou se retrouve dans l'espace périplasmique (Cossa, 1976; Sakaguchi et al., 1979). Bates et al. (1982) ont démontré que dans la première heure, seulement 11 à 27% du zinc adsorbé était transporté dans le cytoplasme. Deuxièmement, dans des cultures de Selenastrum capricornutum perturbée par l'ajout de cadmium, une petite quantité de métal atteignait les lamelles internes du chloroplaste et compétitionnait avec le DCMU, un inhibiteur de la phosphorylation. De plus cette réaction n'était rapide qu'aux fortes concentrations (Madariaga, 1985). Quoique cette dernière observation n'exclut pas l'interaction du métal avec les enzymes du cycle de Calvin, l'inhibition très rapide de l'assimilation du ^{14}C observée dans nos expériences avec le cadmium suggère plutôt une interférence avec un processus à la surface de la cellule tel que l'inactivation de l'assimilation du CO_2 par la complexation du cadmium à des sites transporteurs critiques et/ou

la compétition pour l'énergie de phosphorylation entre l'assimilation du CO₂ et la synthèse "de novo" de protéines membranaires de transport.

L'évaluation de l'importance écologique des perturbations de l'environnement pour les communautés microbiennes exige la capacité de distinguer entre les réponses acclimatatives et les taux de remplacement de niche. À cette fin, nous avons évalué deux méthodes qui reflètent les taux métaboliques et les avons comparées aux variations de deux constituants cellulaires, les concentrations de chl-a et d'A_T. Nos résultats suggèrent que les mesures de constituants cellulaires liés au taux intrinsèque de croissance ou aux variations temporelles de biomasse sont des mesures fiables des taux de renouvellement de la communauté en autant qu'elles puissent être effectuées en l'absence de broutage et avant que les effets de confinement deviennent importants. Bien que la détermination de l'assimilation du carbone soit une évaluation sensible des taux métaboliques, elle est cependant susceptible d'être influencée par des effets transitoires étant donné que les cellules s'acclimatent continuellement aux conditions changeantes du milieu. De plus, il a été démontré qu'il est difficile de relier l'assimilation du carbone-14 aux taux de renouvellement de la communauté parce que, même dans des conditions d'équilibre, ce processus n'est pas toujours une fonction linéaire du taux spécifique de croissance (Li et Goldman, 1981). D'autres évaluations des taux métaboliques comme par exemple lors de bio-essais avec des éléments nutritifs limitants, se sont butées à des problèmes similaires (Lean et Pick, 1981).

Ces mesures peuvent toutefois être utilisées dans un contexte écologique dans le but de déterminer la réversibilité des effets d'un polluant en fournissant une mesure relative du temps nécessaire à l'acclimatation. D'ailleurs si une perte de viabilité pouvait être démontrée lorsqu'un seuil de diminution de la CE_A ou de l'ATP est atteint (i.e. 0.04 h⁻¹), suivre la diminution de l'ATP avec le temps s'avérerait un outil puissant d'évaluation de la toxicité de substances altérageènes.

Dans des conditions d'équilibre, la concentration totale d'adénylates est le traceur idéal de la variation de la biomasse. Sauf lors de perturbations persistantes de l'environnement, la somme des adénylates est invaria-

ble. En effet, les rapports molaires entre les adénylates gouvernent le flux des voies métaboliques productrices d'ATP et de NTP; des différences mineures dans les rapports entre les adénylates résultent en des modifications importantes du flux de ces voies métaboliques qui rétabliront ainsi dans la plupart des conditions transitoires, les valeurs initiales des rapports entre adénylates. Considérant la nécessité pour l'homéostasie, la croissance et la santé des cellules de maintenir le contrôle des voies métaboliques productrices d'ATP, on peut raisonnablement s'attendre à ce que la sélection naturelle ait optimisé ces voies métaboliques pour qu'elles soient peu sensibles aux perturbations extérieures.

6. Caractéristiques structurelles et fonctionnelles de communautés phytoplanctoniques et microbiennes en relation avec la décharge d'effluent industriel: une approche écotoxicologique

6.1 Introduction

Les études en milieu aquatique qui s'intéressent à l'évaluation de la toxicité de substances altérageènes, utilisent très largement les bio-essais avec microorganismes (algues, bactéries) (Wong et Couture, 1986; Chang et al., 1981). Quelques essais monospécifiques sont reconnus pour le dépistage de substances toxiques par plusieurs agences gouvernementales telles que la U.S. Environmental Protection Agency (Miller et al., 1978), Environnement Canada (Blaise et al., 1984, 1981) et Environnement Québec (Joubert, 1981; 1984). Même si cette approche fournie de l'information générale sur les effets toxiques de produits chimiques sur les algues (synergisme, antagonisme, disponibilité), la signification écologique des résultats est souvent difficile à conclure (Harris, 1980; Goss et Wyzga, 1982): i) l'exactitude des prédictions des effets sur les systèmes naturels faites à partir d'essais en laboratoire, en utilisant des réponses au niveau de l'écosystème est souvent remise en question ; ii) en ce qui concerne plusieurs composés les essais de laboratoire peuvent indiquer une toxicité plus élevée que ce qui existe réellement dans les écosystèmes parce qu'ils n'incluent pas les pertes, les transformations et les autres processus permettant de réduire la toxicité dans les systèmes naturels. Par contraste, des mesures sur les populations indigènes de microorganismes aquatiques donnent un meilleur aperçu de la réponse de l'écosystème que les essais monospécifiques puisqu'ils fournissent de l'information sur l'impact au niveau des espèces et de la communauté.

Des effets à court terme sur les populations peuvent amener des changements dans la croissance, la reproduction où dans les fonctions métaboliques des organismes, tandis que les effets à long terme peuvent produire des modifications dans la composition spécifique et dans les relations prédateur-proie, sélectionnant ainsi les espèces plus tolérantes. Au niveau d'organisation de la communauté microbienne, la courte échelle de temps nécessaire à la reproduction ajoute une dimension supplémentaire à la problématique: celle de l'acclimatation par rapport au remplacement des espèces. Il apparaît donc nécessaire, comme l'ont souligné Matthews et al. (1982), d'obtenir de l'information sur les modifications fonctionnelles (métaboliques) et structurelles (composition spécifique) afin de comprendre

la réponse de l'écosystème à l'impact de polluants. Le besoin d'incorporer des indicateurs fonctionnels dans la surveillance biologique est reconnu par le Congrès américain qui spécifie que les documents concernant les critères relatifs à la qualité de l'eau devraient inclure des données obtenues par des stratégies d'évaluation structurelle et fonctionnelle.

Dans un tel contexte il est proposé d'utiliser un indicateur anabolique tel que le taux de photosynthèse par unité de chlorophylle-a (rapport P/B: $\mu\text{g C} \cdot \mu\text{g Chl-a}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) et un indicateur d'équilibre énergétique telle que la charge énergétique en adénylates (CE_A) afin de suivre l'état de perturbation des fonctions de la communauté microbienne. Les rapports P/B sont une mesure de l'état physiologique de la communauté phytoplanctonique, tandis que la CE_A est reliée à l'ensemble de la communauté microplanctonique (populations non-photoautotrophes et photoautotrophes: De Souza-Lima et Romane, 1983).

En écotoxicologie, à notre connaissance, seules quelques études ont utilisé le taux de photosynthèse comme indicateur physiologique dans la détermination des effets de polluants sur des populations indigènes. Par exemple, suite à 2 heures d'exposition à diverses concentrations de mercure (0.056 à 1.25 mg h.l^{-1}), Blinn et al. (1977) ont démontré une inhibition du processus de photosynthèse. Wurtsbaugh et Horne (1982) ont mené des bio-essais in vitro avec du phytoplancton lacustre, non-concentré, représentant six stades d'une poussée printanière d'Aphanizomenon flos-aquae. Ils ont trouvé que le cuivre avait un effet d'inhibition sur la fixation de l'azote et un effet comparable ou supérieur sur l'assimilation du carbone et sur la chlorophylle-a: après 1 jour, 20 $\mu\text{g Cu}$ avait réduit significativement l'assimilation du carbone. Côté (1983) a aussi effectué des bio-essais in vitro pour évaluer la toxicité du cuivre pour la biomasse et la photosynthèse du phytoplancton de la rivière Saguenay (Québec, Canada). Après 8 heures le rapport P/B était réduit par une exposition à 10 $\mu\text{g Cu.l}^{-1}$. Dans des études sur l'écologie du phytoplancton, les rapports P/B sont utilisés pour estimer l'efficacité photosynthétique de la communauté (Harris, 1983; Morris, 1981). À notre connaissance, il n'y a cependant pas d'information disponible sur

l'utilisation du rapport P/B comme indicateur fonctionnel pour la détermination des risques pour la communauté phytoplanctonique de la décharge d'eaux usées industrielles dans une rivière.

La CE_A a été conceptualisée à l'intérieur de la théorie du contrôle des adénylates formulées par Atkinson (1968). Elle tient compte des trois formes de nucléotides adénylates (ATP, ADP et AMP) qui induisent la synthèse d'enzymes intracellulaires et agissent comme régulateurs des réactions métaboliques. La CE_A est exprimée par la relation suivante: $CE_A = ([ATP] + \frac{1}{2} [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$; ce rapport est considéré comme étant une mesure linéaire de la quantité d'énergie momentanément emmagasinée dans le réservoir de nucléotides: les concentrations relatives d'adénosine triphosphate [ATP], d'adénosine diphosphate [ADP] et d'adénosine monophosphate [AMP] reflètent l'énergie métabolique disponible à une cellule (Atkinson, 1977). Comme l'ont mentionné Heath (1984) et Fitzwater et al. (1983), l'étendue théorique de la valeur de la CE_A est entre 0.0 (AMP seulement) et 1.0 (ATP seulement); chez les invertébrés et les microorganismes cependant, les formes non-stressées présentent une valeur de CE_A supérieure à environ 0.8 (Ivanovici, 1980; Atkinson 1977). Plusieurs études ont examiné les variations de la CE_A chez des organismes soumis à diverses substances toxiques et à des conditions diverses de salinité, de température, de lumière et de carence nutritive (Heath, 1984; Fitzwater et al., 1983; Ivanovici, 1980; Chapman et al., 1971); par contre, il ne semble pas exister d'informations concernant les effets de la décharge d'eaux usées industrielles sur la CE_A des communautés microbiennes d'une rivière.

Dans cette étude nous évaluons l'utilité du rapport P/B et de la CE_A comme indicateur in situ des risques que représentent les substances toxiques pour les communautés phytoplanctonique et microbienne. Nous avons vérifié en rivière, l'hypothèse d'acclimatation en suivant les changements dans les rapports P/B et dans la CE_A d'une communauté de microorganismes en amont et en aval d'une décharge d'effluent industriel.

6.2 Matériel et méthodes

6.2.1 Site d'étude

Le bassin de la rivière Saint-Louis est situé sur le versant sud du fleuve Saint-Laurent à environ 50 km au sud-est de Montréal (Québec, Canada). La rivière coule dans la direction sud-ouest/nord-est parallèlement au canal de Beauharnois et se jette dans le fleuve au niveau de la ville de Beauharnois. Trois villes supportant des activités agricoles sont situées sur le bassin hydrographique de 145.5 km² de la rivière Saint-Louis. La rivière qui s'écoule sur un lit d'argile a une profondeur moyenne de 5 mètres.

Certaines caractéristiques de cette rivière ont été revues par Roy (1982) et Moulins (1983). Mentionnons que la profondeur varie entre 1.83 et 6.7 mètres, la transparence (Secchi) fluctue entre 40.6 et 249.0 cm et les vitesses de courant varient entre 4.6 cm.sec⁻¹ durant l'étiage et 59.7 cm.s⁻¹ en période de crue. Tout en drainant des terres agricoles, la rivière reçoit de nombreux effluents industriels: ferro-alliage, papeterie, chlore, soude caustique, chlorate de sodium et aluminium. Des charges en plomb, cadmium, cuivre, manganèse, zinc, nickel, chrome, fer et mercure constituent les principales sources de pollution de la rivière Saint-Louis. De plus les concentrations de manganèse, de fer et de mercure dans les sédiments de la rivière dépassent le seuil de tolérance du fleuve Saint-Laurent (Roy, 1982).

Afin de vérifier l'hypothèse de la présence et de la persistance des effets précédemment observés en enclos (Auclair et al., 1985), la toxicité de l'effluent industriel a été vérifiée directement sur la communauté microbienne indigène, en aval de la décharge de l'effluent. Ces expériences ont été effectuées pendant trois campagnes d'échantillonnage où quatre transects situés en amont et en aval de l'effluent industriel furent identifiés (fig. 1). Chaque transect était constitué de trois stations respectivement située environ à 10 m de la rive est, au centre et à environ 30 m de la rive ouest. Dans le cas du transect B, la station de la rive ouest était située directement à la sortie de l'effluent industriel. Un échantillon représen

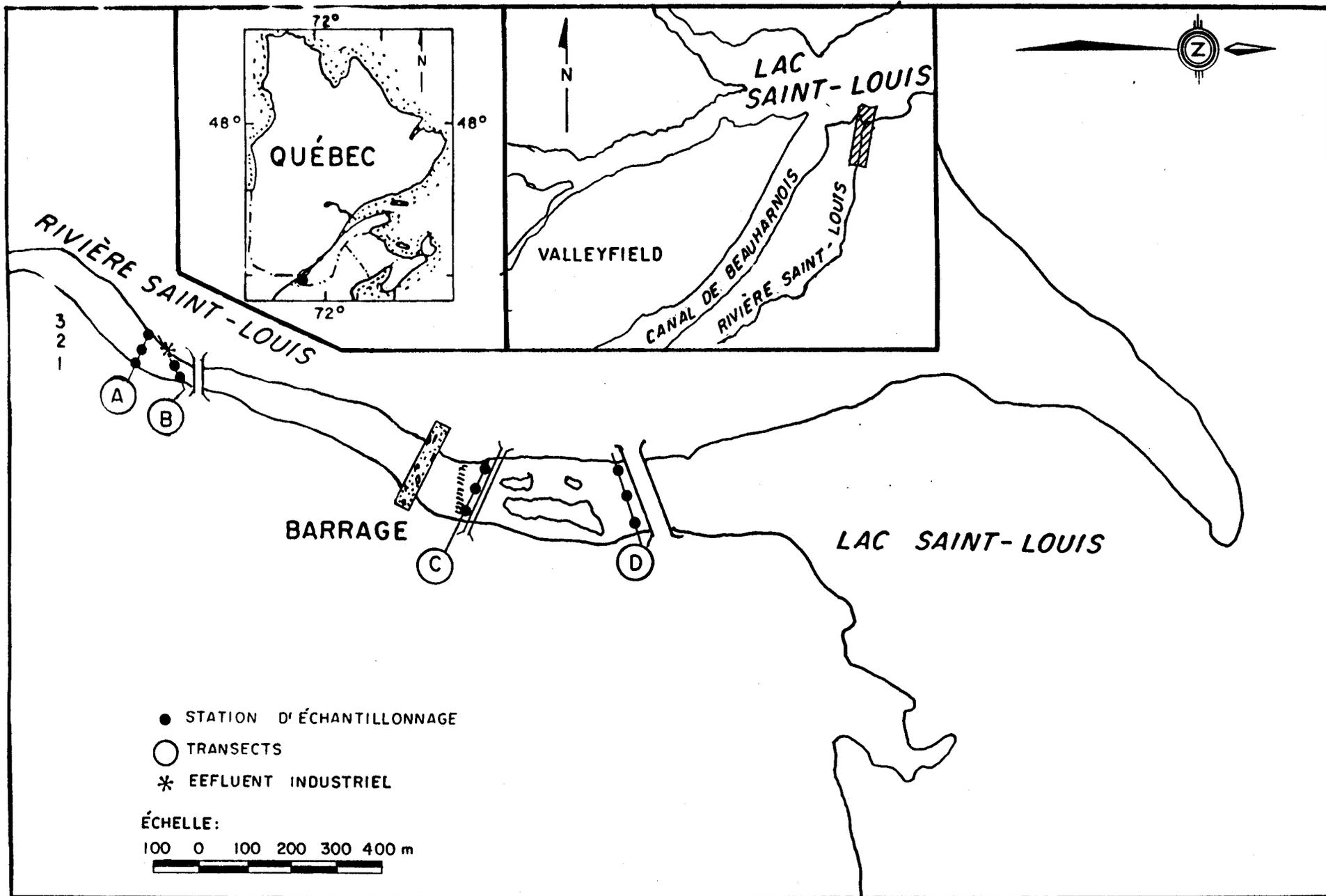


Figure 1: Localisation de la rivière St-Louis et des stations d'échantillonnage.

tatif de la composition moyenne des eaux de surface de la rivière a été préparé pour chaque transect. Cet échantillon qui était composé de sous-échantillons récoltés aux trois stations du même transect, était ensuite divisé en sous-échantillons servant aux analyses physiques chimiques et biologiques.

6.2.2 Méthodes

La température et le pH ont été mesurés immédiatement après la préparation de l'échantillon composé tandis que les autres analyses physico-chimiques ont été effectuées au laboratoire dans un délais de 24 heures. Les échantillons ont été conservés à l'obscurité, à 4°C.

Les analyses physico-chimiques et d'E. coli (total et fécal) ont été effectuées selon des méthodes standards décrites dans APHA et al. (1980). Les échantillons de phytoplancton ont été préservés avec une solution de Lugol acide (Vollenweider, 1974) et comptés par la méthode d'Utermöhl. La chlorophylle-a a été dosée par la méthode décrite au chapitre 4. L'assimilation de carbone 14 a été mesurée en duplicata avec des sous-échantillons de 300 ml ayant reçu 10 μCi de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ radioactif et incubé pendant une heure en lumière saturante dans la rivière. La filtration, le comptage par scintillation liquide et le calcul de l'assimilation du ^{14}C ont été effectués selon les méthodes décrites au chapitre 4.

La détermination des nucléotides adénylates a été effectuée en duplicata sur des échantillons de 100 ml récoltés à chaque station selon la méthode décrite au chapitre 4.

Une analyse de variance à un critère ainsi qu'une comparaison a posteriori des moyennes par le test de Scheffe ont été effectuées sur les résultats.

6.3 Résultats et discussion

La forte contamination en métaux de cette rivière a déjà été mise en évidence par les travaux de Roy (1982) où il ressort clairement que les

concentrations en plomb, en chrome, en magnésium, en cuivre et en mercure dans la végétation aquatique dépassent la moyenne des teneurs en ces mêmes éléments dans les macrophytes du fleuve Saint-Laurent. Par ailleurs, la toxicité de l'effluent industriel chez deux espèces indigènes au milieu, Catostomus commersoni et Daphnia magna fut clairement mis en évidence dans les travaux de Moulins (1983). À l'aide de bioessais in situ: entre la décharge de l'effluent et l'embouchure de la rivière dans le lac Saint-Louis, les mortalités observées variaient respectivement entre 95.% et 6.8% (C. commersoni) et entre 100% et 1.7% (D. magna). De plus, Fedida (1982) a précisé les teneurs en métaux lourds dans l'effluent industriel à divers intervalles sur une période de quatre jours; les plages de variation des concentrations (mg.l^{-1}) étaient les suivantes: Fe 0.101-0.426; Cr < 0.020-0.192; Cu 0.020; Ni < 0.010-0.014; Pb < 0.010-0.015; Cd < 0.010; Zn < 0.010-0.058; Co < 0.025; Hg 0.0023-0.0064. Par ailleurs, au cours de cette même période les solides totaux variaient entre 530 et 900 mg.l^{-1} , les solides dissous entre 28 et 85 mg.l^{-1} , le pH entre 6.6 et 11.3 et la température entre 1.5 et 20°C.

Nos résultats concernant l'effluent (tableau 1) sont en accord avec ceux présentés au paragraphe précédent et démontrent clairement l'influence de l'effluent sur l'augmentation de la température, du pH, des solides totaux et du mercure total observée au transect B. Mentionnons aussi que la rivière Saint-Louis demeure fortement influencée par des activités eutrophisantes d'origine anthropogénique parce qu'elle draine un territoire supportant de nombreuses activités agricoles. Les fortes concentrations en phosphore inorganique ainsi que les concentrations excessives d'E. coli mesurées dans cette rivière sont indicatives de cette influence.

6.3.1 Structure de la communauté phytoplanctonique

L'état eutrophe de cette rivière est aussi apparent lorsque la communauté phytoplanctonique est considérée. En effet pendant les trois campagnes d'échantillonnage, les diatomés sont toujours dominantes à chacun des quatre transects (40-70%). De plus Cyclotella sp. est toujours le genre dominant (tableau 2). Symoens et al. (1981) ont observé des milieux eutrophes dominés par des diatomés, où Melosira granulata et Cyclotella

Tableau 1: Les caractéristiques physiques, chimiques et microbiologiques de l'effluent et de l'eau de surface de la rivière St-Louis.

		T°C	pH	ST (mg.L ⁻¹)	SS (mg.L ⁻¹)	P-in (mg.L ⁻¹)	Hg (mg.L ⁻¹)	<u>E. Coli</u>	
								FECAL (N.100 mL ⁻¹)	TOTAL (N.100 mL ⁻¹)
Septembre 26									
	Effluent		9.1	502	13.1	< 0.01	0.0030	< 3	< 3
	River (A)		7.2	256	35.6	0.06	< 0.0001	24 000	46 000
Septembre 27									
	A	14.0	8.1	255	30.7	0.12	< 0.0001	24 000	46 000
	B	15.0	8.8	346	25.1	0.02	0.0010	430	930
	C	15.3	8.4	508	29.9	0.08	0.0009	930	930
	D	16.0	8.4	494	32.4	0.04	0.0007	9 300	21 000
Octobre 4									
	A	8.8	7.8	270	23.9	0.08	< 0.0001	2 300	9 300
	B	10.1	8.7	323	16.3	0.04	0.0013	4 300	7 500
	C	11.4	8.2	293	19.6	0.06	0.0007	4 300	9 300
	D	11.6	8.0	295	21.5	0.08	0.0007	4 600	9 300
Octobre 5									
	A	8.9	7.9	278	16.2	0.04	< 0.0001	4 300	46 000
	B	10.1	8.7	315	16.8	0.04	0.0012	2 300	23 000
	C	10.1	8.4	293	14.4	0.04	0.0006	4 300	43 000
	D	10.0	8.2	291	18.9	0.04	0.0007	4 300	24 000

Tableau 2: Composition taxonomique et abondance relative (%) des diatomés dominantes.

Septembre 26		A	B	C	D
	Cocconeis	2			
	Cyclotella	37			
	Navicula	2	n	n	n
	Nitzchia	6			
	Melosira	7			
Σ		54			
Septembre 27					
	Asterionella	-	-	-	1
	Cocconeis	-	-	1	-
	Cyclotella	36	31	31	48
	Gomphonema	1	-	-	-
	Gyrosigma	1	-	-	-
	Melosira	9	12	5	8
	Navicula	5	2	2	4
	Nitzschia	4	-	1	1
Σ		58	47	40	63
Octobre 4					
	Cocconeis	-	-	1	-
	Cyclotella	28	30	26	22
	Gyrosigma	-	-	2	-
	Melosira	8	6	17	13
	Navicula	1	4	13	4
	Nitzschia	1	-	3	2
	Stephanodiscus	-	-	1	-
Σ		45	42	74	46

n = aucun échantillon

stelligera étaient les espèces les plus abondantes. Par ailleurs, une étude de Côté (1983) sur la rivière Saguenay (Québec, Canada), un système hydrographique fortement contaminé par des métaux lourds (Loring, 1975, 1976; Smith et Loring, 1981), révèle que la communauté est dominée par les diatomées Tabellaria fenestrata, T. flocculosa, Asterionella formosa, Melosira sp. et Fragilaria sp. pendant les mois d'été.

La décharge d'effluent au niveau du transect B ne modifie pas de façon importante la structure de la communauté. En septembre, les diatomés composent 58% de la communauté en A et 63% en D; alors qu'en octobre, en A elles représentent 45% de la communauté et 46% en D. Les modifications les plus évidentes apparaissent en C qui se situent immédiatement en amont d'un barrage. Il faut signaler cependant que le débit au déversoir du barrage est élevé et que ce réservoir est rempli de sédiments formés par la haute charge en particules transportée par la rivière (Moulin, 1983). Un autre facteur, soit les vitesses de courant, rend peu vraisemblable la manifestation de modifications de structure pouvant être induite par la décharge d'effluent industriel. En effet, selon les vitesses de courant calculées par Moulin (1983), la distance entre les transects A et D est couverte entre 0.5 heure en période de crue et 6.6 heures en période d'étiage. Par conséquent, dans la région étudiée, les effets de la décharge d'effluent industriel ne se feront sentir que sur une courte distance rendant ainsi improbable l'apparition et/ou la dominance de nouvelles espèces. Harris (1984) a, en effet suggéré que des changements dans les espèces présentes ne surviennent qu'à des échelles de temps semblables à celles requises pour l'acclimatation physiologique, présumément > 12 heures. Cette échelle de temps suggérée pour l'acclimatation physiologique est cependant beaucoup plus longue que celle généralement acceptée pour les réponses cellulaires aux diminutions d'ATP, de la somme des adénylates (A_T) et de charge énergétique (CE_A). Pour ces réponses, Atkinson (1977) suggère une échelle de temps inférieure à 10 minutes.

6.3.2 Caractéristiques fonctionnelles: rapport P/B

L'uniformité relative des valeurs de chl-a démontre que la diminution des rapports P/B (figure 2) est reliée aux diminutions des taux de photo-

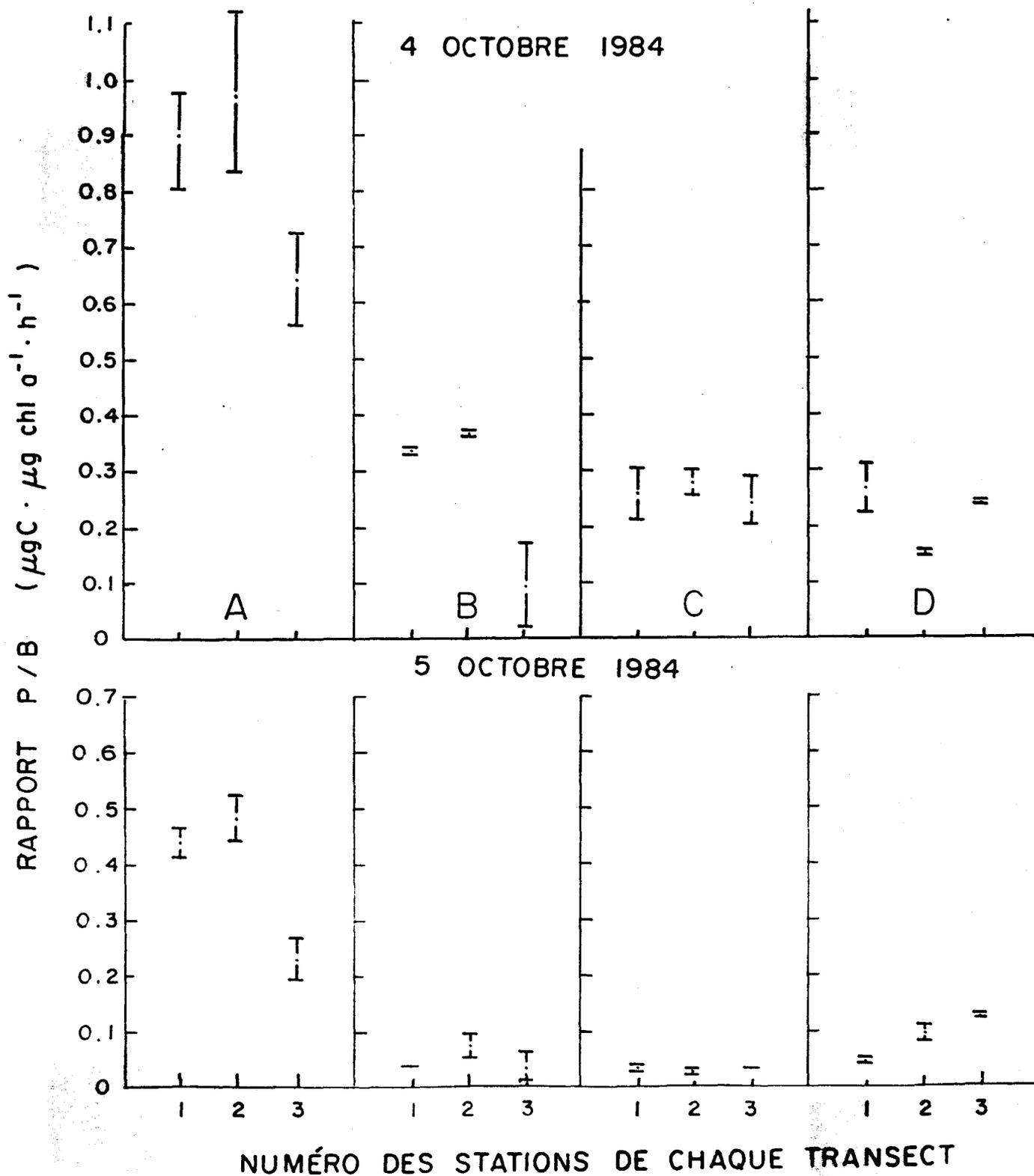


Figure 2: Variations des rapports P/B aux transects A, B, C et D, les 4 et 5 octobre 1984. La moyenne et l'étendue des duplicata sont représentées pour chaque station (1, 2, 3).

synthèse de la communauté phytoplanctonique lorsque celle-ci rencontre la décharge d'effluent industriel. Les taux de photosynthèse ont passé d'une valeur moyenne de $2.6 \mu\text{g C.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ au transect A à une valeur moyenne de 0.77, 0.83 et $0.69 \mu\text{g C.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ aux transects B, C et D respectivement. La plus faible valeur, $0.15 \mu\text{g C.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ a été observée à la station 3 du transect B qui est située directement à la décharge de l'effluent. Ces faibles valeurs sont particulièrement significatives lorsque l'on considère les données de chl-a. En effet, seule une diminution temporaire de la chl-a a été observée à la station 3B, à la sortie de l'effluent, où les concentrations de chl-a les 4 et 5 octobre, sont respectivement 1.49 et $1.56 \mu\text{g.l}^{-1}$. Étant donné qu'à toutes les autres stations la biomasse est généralement supérieure à $3 \mu\text{g chl-a.l}^{-1}$, cette diminution transitoire de la chl-a semble être le résultat d'une dilution par l'effluent.

La somme des nucléotides adénylates (A_T) diminue lorsque la communauté microbienne atteint la décharge d'effluent industriel. Les 4 et 5 octobre les valeurs variaient entre 620 et $690 \mu\text{g.l}^{-1}$ et 820 et $890 \mu\text{g.l}^{-1}$ respectivement au transect A, comparativement à des valeurs de 360 à $590 \mu\text{g.l}^{-1}$ et 350 à $650 \mu\text{g.l}^{-1}$ au transect B (directement à la sortie de l'effluent) (figure 3). Aux transects C et D, l' A_T est demeurée plus faible qu'au transect A le 5 octobre tandis que des concentrations plus élevées (690 à $890 \mu\text{g.l}^{-1}$) ont été mesurées le 4 octobre. Ces variations dans le pool des nucléotides sont probablement le résultat d'une dilution vu qu'aux deux périodes d'échantillonnage, des rapports chl-a/ A_T (0.0047 ± 0.0009) relativement constants ont été observés à tous les transects. Ceci suggère que les deux indicateurs de biomasse ont subi des variations proportionnelles dues à la dilution.

Nos résultats (figure 2) démontrent que l'efficacité photosynthétique est fortement influencée par la décharge d'effluent industriel. Les 4 et 5 octobre des diminutions de 70 à 91% de la valeur moyenne des rapports P/B sont observées entre le transect A (P/B = 0.64 à 0.95 et 0.23 à 0.48) qui ne reçoit pas d'effluent et ceux des transects B (P/B = 0.1 à 0.36 et 0.04 à 0.07), C (P/B = 0.24 et 0.28 et 0.03 à 0.04) et D (P/B = 0.14 à 0.26 et 0.04 à 0.13) situés en aval de la décharge d'effluent. Même si les rapports P/B

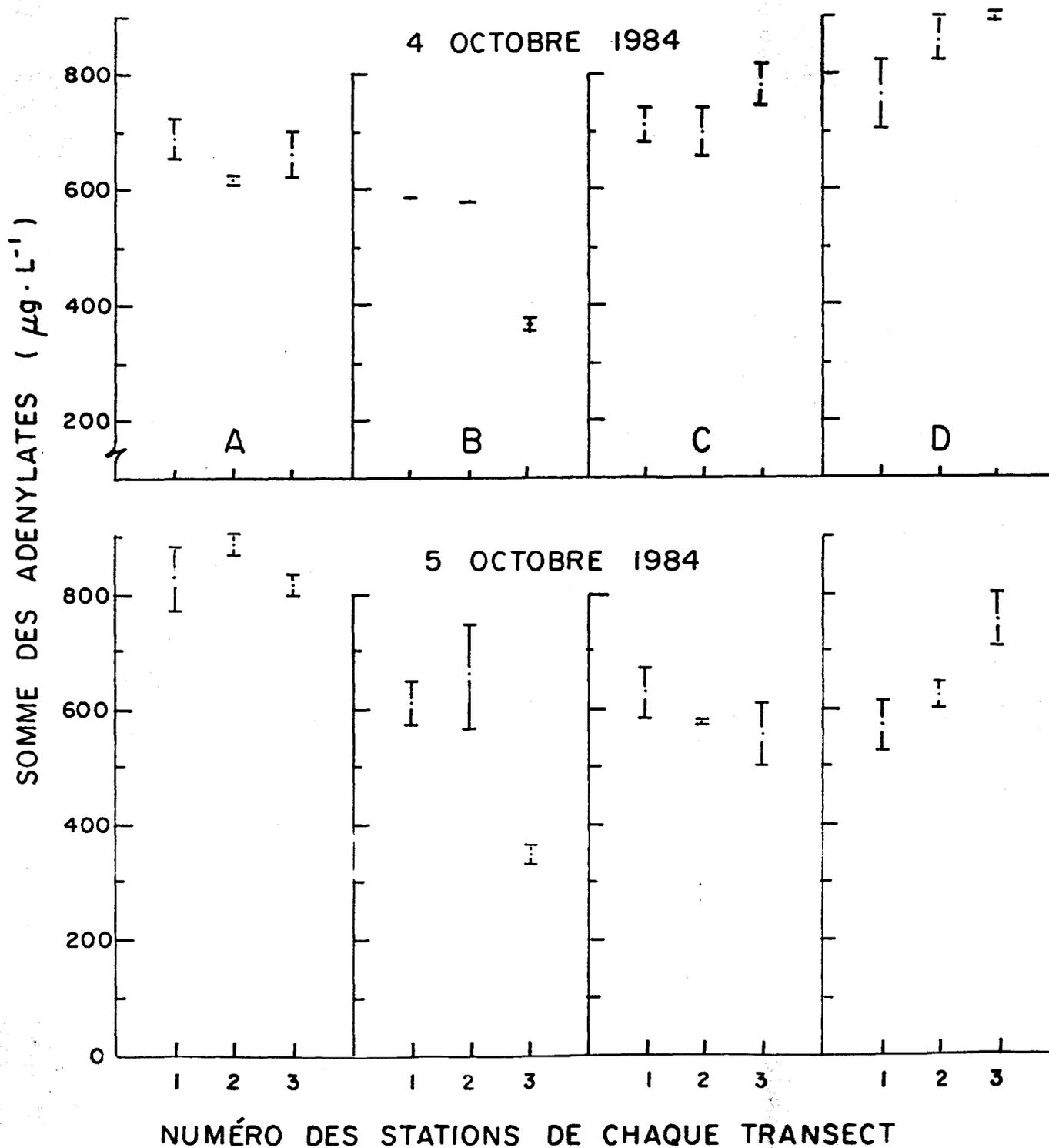


Figure 3: Variations de la somme des adénylates (ATP+ADP+AMP) aux transects A, B, C et D les 4 et 5 octobre 1984. La moyenne et l'étendue des duplicata sont représentées pour chaque station (1, 2, 3).

semblent fluctuer de façon importante d'une journée à l'autre en réponse aux variations des conditions environnementales, leur diminution en réponse à l'effluent industriel sont toutefois toujours très hautement significative (tableau 3). Une comparaison des moyennes par le test de Scheffe révèle que le transect A est significativement différent des transects B, C et D. La sensibilité des rapports P/B aux substances toxiques a aussi été observée par Côté (1983) qui a enregistré des diminutions supérieures à 75% des rapports P/B de phytoplancton de la rivière Saguenay soumis in vitro à des concentrations élevées de cuivre ($> 10 \mu\text{g Cu.l}^{-1}$). Lors de cette étude, il a été noté qu'à ces concentrations de cuivre les rapports P/B ne dépassent jamais $0.1 \mu\text{g C.}\mu\text{g Chl-a.h}^{-1}$ tandis que le témoin ne dépasse pas $0.4 \mu\text{g C.}\mu\text{g chl-a.h}^{-1}$. En ce qui concerne la détermination in situ des rapports P/B dans la rivière Saguenay, Côté (1983) a observé les valeurs minimums (0.1) en mai et les valeurs maximums en août (2.1). Ceci est en accord avec Platt et Jassby (1976) qui ont trouvé une corrélation hautement significative entre les rapports P/B et la température ($N = 52$; $p < 0.01$; $r = 0.529$). Platt et al. (1980) ont aussi trouvé des rapports P/B plus faibles, de 0.98 et 0.64 à des stations situées dans l'Arctique ($T^\circ = 0.5$ et -0.5°C) tandis que les valeurs maximums (15.2) sont atteintes à des températures beaucoup plus élevées ($\sim 19^\circ\text{C}$).

Le fait que les rapports P/B restent faibles aux trois transects en aval de la décharge d'effluent industriel (figure 2) indique qu'à l'échelle de temps considérée, les processus photosynthétiques du phytoplancton ne se sont pas acclimatés à l'effluent toxique. Il serait intéressant d'étudier cet effet toxique à plus long terme pour déterminer si les taux de photosynthèse atteindraient de nouveau les valeurs observées au transect A et si c'est le cas, par quel mécanisme cette acclimatation s'est elle effectuée.

6.3.3 Caractéristique fonctionnelle: CE_A

Au cours de la présente étude, la CE_A a varié entre 0.58 et 0.68 et entre 0.62 et 0.64 les 4 et 5 octobre respectivement aux trois stations en amont de la décharge d'effluent (transect A) (figure 4). Ces valeurs se rapprochent de la CE_A suggérée pour des microorganismes non-perturbés et sont indicatives d'une population phytoplanctonique en phase stationnaire (Falkowski, 1977).

Tableau 3: Analyse de variance sur les données de rapport P/B, de CE_A et de rapport ATP/AMP récoltées sur la rivière Saint-Louis le 4 et 5 octobre 1984.

Période d'échan- tillonnage	Source de variation	Degré de liberté	P/B (Production/Biomass)			CE_A (Charge énergétique en adénylates)			Rapport ATP/AMP		
			Somme des carrés	Variance	F	Somme des carrés	Variance	F	Sources des carrés	Variance	F
4 octobre	décharge d'effluent industriel	3	0.784	0.261	18.1**	0.013	0.0043	1.8(ns)	1.44	0.48	2.2(ns)
	erreur résiduelle	8	0.111	0.014		0.018	0.0023		1.74	0.22	
	Total	11	0.895			0.031			3.18		
5 octobre	décharge d'effluent industriel	3	0.24	0.08	16.1**	0.018	0.006	2.60(ns)	2.15	0.72	5.1*
	erreur résiduelle	8	0.039	0.005		0.018	0.0023		1.11	0.14	
	Total	11	0.279			0.036			3.26		

** très significatif < 0,01

* significatif < 0,05

ns non significatif

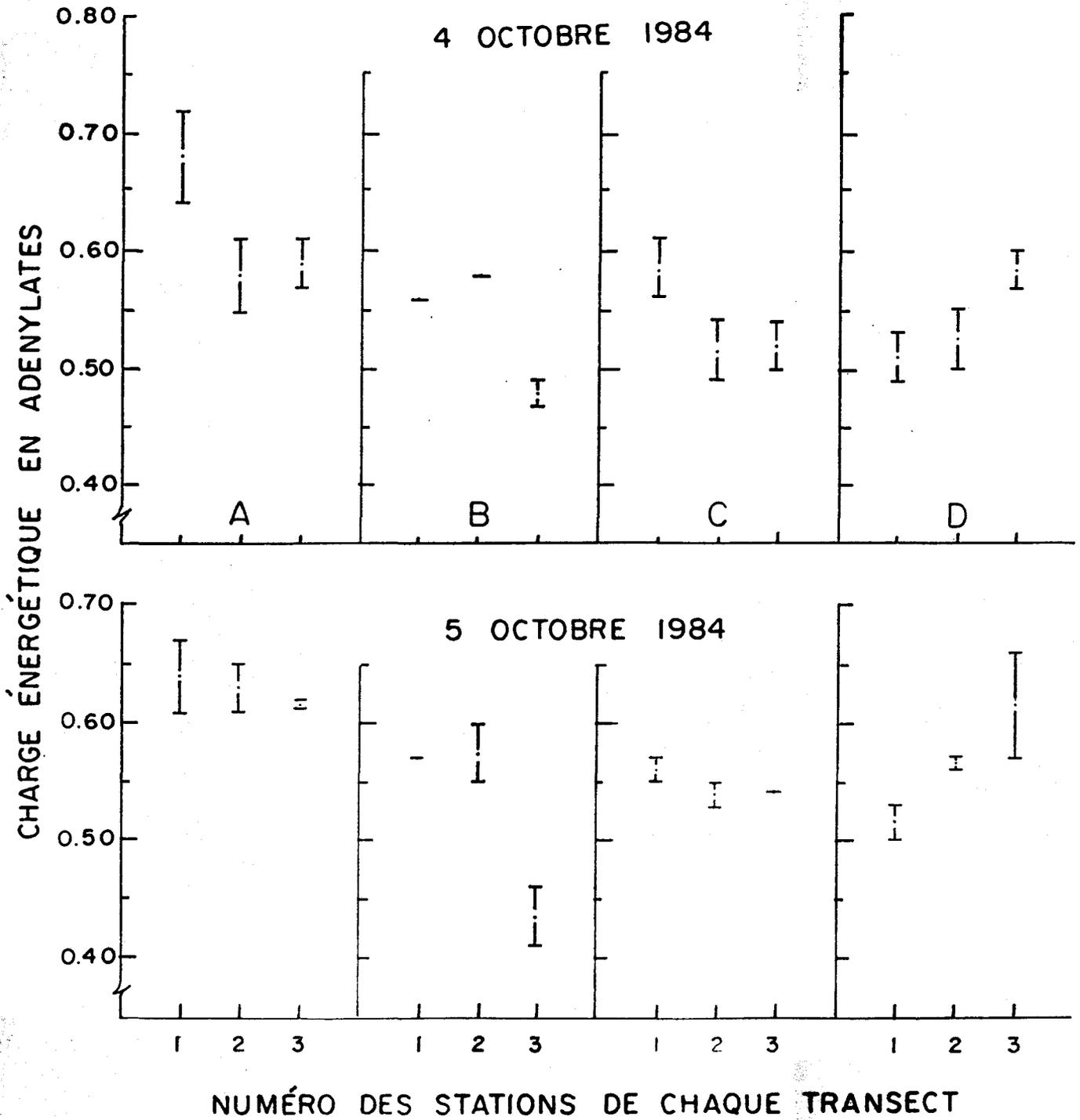


Figure 4: Variations de la charge énergétique en adénylates (CE_A) aux transects A, B, C et D les 4 et 5 octobre 1984. La moyenne et l'étendue des duplicata sont représentées pour chaque station (1, 2, 3).

Au point de décharge de l'effluent, une diminution de la CE_A est observée. Par exemple, pendant les deux campagnes d'échantillonnage, des diminutions moyennes de 12 et 16% sont observées au transect B. Par ailleurs, la diminution la plus importante (29%) s'est produite à la station adjacente à la décharge d'effluent (station 3B) où des CE_A de 0.48 et 0.44 ont été mesurées les 4 et 5 octobres respectivement (figure 4). Plus en aval (transects C et D), les valeurs de CE_A restent plus faibles (10 à 15%) que celles observées au transect A.

Même si généralement ces résultats sont en accord avec la suggestion que des CE_A faibles indiquent la présence de microorganismes perturbés (De Souza-Lima et Romano, 1983), les différences de CE_A observées entre le transect A et les stations perturbées par la décharge d'effluent industriel (transects B, C et D) ne sont pas significatives (tableau 3). Toutefois, à la lumière du fait qu'une valeur approximative de CE_A de 0.5 a été suggérée comme valeur critique au maintien de la viabilité (Falkowski, 1977), les diminutions de CE_A observées aux transects en aval de la décharge d'effluent industriel apparaissent significatives du point de vue physiologique. De fait, des valeurs de CE_A de 0.44 et 0.48 (station 3B), 0.51 (station 1D), 0.52 (stations 2C, 3C et 1D) et 0.53 (station 2D) suggèrent que la viabilité de la communauté microbienne est en danger. La diminution initiale de la CE_A révèle soit une plus grande demande d'énergie intracellulaire qui ne peut pas être complètement compensée ou alternativement un changement rapide dans les rapports entre adénylates par l'entrave de voies métaboliques productrices d'ATP telles que la phosphorylation oxydative par transport d'électrons et/ou la glycolyse des communautés microbiennes.

Des CE_A faibles peuvent être attribuables à une plus forte concentration d'AMP dans les cellules (Heath, 1984; Fitzwater et al., 1983). Dans le gradient spatial examiné le rapport chl-a/ A_T est demeuré constant suggérant que la proportion de phytoplancton et de bactéries s'est maintenue constante et que la diminution de biomasse observée à la station 3B est principalement due à un effet de dilution provoqué par l'arrivée d'effluent. Les concentrations d'ATP ont aussi été maintenues à travers le gradient. Malgré cela, et plus particulièrement le 5 octobre, les rapports ATP/AMP sont significativement plus faibles (tableaux 3 et 4) en aval de la décharge d'effluent.

Tableau 4: Variation des rapports ATP/ADP et ATP/AMP de la communauté microbienne en amont (transect A) et en aval (transects B, C, et D) de la décharge d'effluent le 5 octobre 1984.

	A	B	C	D
ATP/ADP 1	4.41	6.41	4.34	5.64
	4.41	12.96	6.07	4.55
2	2.33	3.34	3.75	29.31
	2.77	9.64	5.00	9.76
3	4.79	3.93	5.32	7.18
	5.37	4.80	6.29	8.63
n (d.s)	4.01 ± 1.19	6.85 ± 3.75	5.13 ± 0.18	10.8 ± 9.24
ATP/AMP 1	2.43	1.99	1.83	1.45
	3.46	1.97	2.04	1.64
2	2.63	2.42	1.94	1.91
	3.36	1.85	1.66	1.98
3	2.54	0.95	1.76	1.95
	2.48	1.21	1.73	3.00
	2.82 ± 0.47	1.73 ± 0.55	1.82 ± 0.14	1.99 ± 0.54

Cette observation suggère que les rapports normaux entre adénylates ne sont pas restaurés dans l'échelle spatiale étudiée. Ceci est confirmé par le test de Scheffe qui révèle que les rapports ATP/AMP sont significativement plus élevés au transect A qu'aux transects B, C et D. Des observations similaires ont été effectuées dans d'autres études et Amblard (1981) a proposé que la réaction: $ATP \rightarrow AMP + P\sim P$ menant directement au clivage du pyrophosphate, prédominerait dans certains systèmes. Présumément cette réaction augmenterait la vitesse de détoxification en "chargeant" certaines molécules d'un lien fortement énergétique, d'une manière analogue à l'estérification des acides gras pour produire l'acyl-CoA comme première étape au processus d'activation menant à leur passage dans les mitochondries et à leur oxydation subséquente (Lehninger, 1977). Il faut cependant noter que les fortes concentrations d'AMP pourraient être le résultat de l'inactivation d'une voie métabolique productrice d'ATP empêchant la restauration de concentrations élevées d'ATP. De Souza-Lima et Romano (1983) ont aussi trouvé une relation positive, directe entre les rapports P/B et ATP/AMP.

6.4 Conclusion

La capacité de discerner entre des réponses d'acclimatation qui ne modifient pas la structure de la communauté et les taux de remplacement des espèces est nécessaire à l'évaluation de perturbations de l'environnement. Dans ce cadre, on se doit de tenir compte de caractéristiques structurelles (chlorophylle-a, composition spécifique) et fonctionnelles (P/B, CE_A , ATP/AMP) afin de mieux comprendre au niveau de la communauté microbienne, les modifications métaboliques induites par la décharge d'effluents. À la lumière des résultats présentés ici, il semble que la décharge d'effluent d'une usine de chlore-alcali ne modifie pas les caractéristiques structurelles de la communauté microbienne. De fait, dans l'échelle spatiale étudiée, la composition en espèces phytoplanctoniques ainsi que la chlorophylle-a sont demeurées relativement constantes. Cependant des effets plus insidieux se sont révélés au niveau des propriétés fonctionnelles de la communauté. Les diminutions significatives des taux de photosynthèse et d'efficacité photosynthétique, non-accompagnées de diminutions de chl-a et de modifications de la structure de la communauté phytoplanctonique, indiquent que

l'assimilation de carbone des espèces dominantes Cyclotella sp. et Melosira sp. est très sensible à l'effluent toxique. Les données d'assimilation de carbone et de rapports P/B suggèrent que dans l'échelle de temps étudiée, les fonctions photosynthétiques des cellules ne s'acclimatent pas à l'effluent industriel. Cependant étant donné qu'il est difficile de relier l'assimilation de carbone à la biomasse (Li et Goldman, 1981) il n'est pas possible de prédire à partir des données de photosynthèse et d'efficacité photosynthétique, les effets à long terme de l'effluent industriel sur la biomasse et la structure de la communauté.

En ce qui concerne les valeurs de CE_A , des faibles diminutions (10 à 16%) se sont produites en même temps qu'ont été observées des diminutions plus importantes (27 à 40%) des rapports ATP/AMP. Ceci n'est pas surprenant puisque des changements de CE_A peuvent dissimuler des changements plus importants dans les valeurs absolues des rapports ATP/ADP ou ATP/AMP auxquels les enzymes répondent (Lowry et al., 1971). On s'attendrait avec des diminutions aussi importantes des rapports ATP/AMP que les fonctions métaboliques de la communauté soient perturbées. De fait, en réponse à la décharge d'effluent industriel, des diminutions de 70 à 90% des taux de photosynthèse sont observées. Il faut aussi tenir compte du fait que des valeurs de CE_A (~ 0.5) indicatives de microorganismes perturbés ont été enregistrées en conjonction avec des taux de photosynthèse et des rapports P/B affaiblis même si la biomasse et la structure de la communauté sont restées inchangées.

7. Conclusion

L'analyse de paramètres structurels et fonctionnels chez les populations de S. capricornutum soumises à diverses concentrations de cadmium et d'un effluent industriel a permis de mettre en évidence des différences dans le mode d'action de ces deux substances toxiques. Dans les deux cas la croissance (μ_{av}) et l'efficacité photosynthétique des algues sont inhibées. Le degré de récupération des algues suite à une exposition de 24 et 96 h à des concentrations de cadmium variant entre 2 et 32 $\mu\text{g.l}^{-1}$ révèle cependant que l'action toxique du cadmium est fonction de la concentration et de la durée de l'exposition. De plus, les algues se comportent comme si une partie du métal absorbé dans les cellules s'y fixait de façon permanente (sur 96 h). En effet même si au cours de l'expérience de récupération 96 h, la croissance et l'efficacité photosynthétique sont supérieures aux valeurs observées à t_{96} de l'expérience en milieu contaminé, elles n'atteignent pas les valeurs témoins. Par ailleurs la CE_A de l'ensemble des populations est représentative des phases exponentielle et stationnaire de croissance et ne semble pas relié aux concentrations de cadmium.

L'expérience avec l'effluent industriel suggère par ailleurs qu'à des concentrations > 25% d'effluent, S. capricornutum n'est pas viable. Ceci est mis en évidence par la CE_A qui reste inférieure à 0.5 pendant toute la durée de l'expérience. À t_{24} la croissance, l'efficacité photosynthétique et la CE_A sont réduites à toutes les concentrations d'effluent tandis qu'à la fin de l'expérience, l'efficacité photosynthétique et la CE_A sont supérieures au témoin aux concentrations d'effluent < 25%. Ceci suggère une acclimatation des populations d'algues à l'effluent; nous ne pouvons cependant pas éliminer l'hypothèse de l'évaporation du chlore résiduel en cours d'expérience.

Plusieurs auteurs questionnent la validité des prédictions faites à partir des bio-essais effectués avec des populations monospécifiques tel que S. capricornutum. Il serait évidemment avantageux si l'extrapolation aux conditions du milieu pouvait être améliorée par l'utilisation de relations structure-fonction à l'intérieur de tests de dépistage monospécifiques. Dans le cas de l'effluent industriel nos résultats suggèrent que les effets notés au laboratoire sur la photosynthèse, la chl-a et la CE_A concordent

avec les effets observés sur la communauté phytoplanctonique indigène à la rivière St-Louis lors d'expérience en enclos et directement dans la rivière. En enclos des diminutions de chl-a apparaissent à des concentrations > 10% d'effluent. Par ailleurs une perte très marquée de viabilité, signalée par une $CE_A < 0.5$ est observée très rapidement chez les communautés exposées à 25 et 50% d'effluent. L'expérience avec S. capricornutum avait révélé une sensibilité à l'effluent d'importance semblable. En effet à t_{24} de l'expérience avec S. capricornutum, des taux d'inhibition de la photosynthèse variant de 30% (1% d'effluent) à 100% (10 et 25% d'effluent) sont observés et correspondent aux effets notés chez les communautés phytoplanctoniques. Il semble par ailleurs que la durée de l'expérience en enclos se soit avérée trop courte pour observer les réponses acclimatatives qui se sont révélées à t_{96} de l'expérience au laboratoire.

Malgré que dans la rivière le temps de contact de la communauté phytoplanctonique avec l'effluent soit relativement court (0.5 à 6 h) et les concentrations d'effluent relativement faibles (< 25%), des effets toxiques sont tout de même perçus. En l'absence de diminutions de biomasse, des diminutions d'assimilation de carbone et d'efficacité photosynthétique aussi importantes que 95% sont observées (station 3B, directement à la sortie de l'effluent). Cette inhibition de la photosynthèse est accompagnée d'une CE_A inférieure à 0.5 suggérant une perte de viabilité qui n'est cependant que transitoire. Ceci concorde avec les expériences en laboratoire avec S. capricornutum qui suggère que la CE_A reste faible seulement dans les cas de toxicité aiguë.

La prédiction du seuil de toxicité du cadmium pour une communauté phytoplanctonique à partir de l'expérience avec S. capricornutum effectuée dans un milieu de culture AAP modifié est erronée. En effet les effets du cadmium sur la chl-a sont perçus à des concentrations de 16 et 32 $\mu\text{gCd.l}^{-1}$ alors que les effets sur l'efficacité photosynthétique se font sentir à des concentrations > 2 $\mu\text{gCd.l}^{-1}$. En comparaison, au cours de l'expérience en enclos une concentration de 1000 $\mu\text{gCd.l}^{-1}$ est nécessaire pour causer une diminution significative de la photosynthèse. Ces résultats ne sont pas inattendus puisque la capacité de complexation des métaux des eaux naturelles est beaucoup supérieure à celle du milieu AAP modifié.

En conclusion, les résultats du présent rapport mettent en évidence l'utilité des paramètres fonctionnels pour la caractérisation des effets toxiques de substances altérageènes. Bien que l'utilisation de la CE_A apparait limitée au dépistage de substances ou de concentrations produisant des effets létaux, le rapport ATP/AMP et plus particulièrement l'efficacité photosynthétique semblent sensibles aux manifestations toxiques. Il nous semble que le rapport ATP/AMP mériterait une investigation plus poussée afin de mieux cerner dans quelle mesure il pourrait servir au dépistage de substances toxiques et pour mieux comprendre sa signification physiologique.

8. Bibliographie

B I B L I O G R A P H I E

- Albertano, P., G. Pinto, et R. Taddei, 1978. Evaluation of toxic effects of heavy metals to unicellular algae. 1. The influence of inoculum concentration on the evolution of toxicity. *Delpinos* 20: 75-86.
- Amblard, C., 1981. Intérêts du dosage des adénosynes 5 phosphate pour l'étude dynamique des populations phytoplanctoniques lacustres (le Pavin, France). *Hydrobiologia* 85: 257-270.
- American Public Health Association, American Water Works Association et Water Pollution Control Federation, 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th Ed., Washington, DC. 1134 p.
- Atkinson, D.E., 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter: interaction with feedback modifiers. *Biochem. J.* 7: 4030-4034.
- Atkinson, D.E., 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press, New York, N.Y. 293 p.
- Auclair, J.C., P. Couture, et C. Thellen, 1985. The importance of the energy charge concept to distinguish acclimatation from loss of viability in perturbed aquatic microbial communities. *Limnol. Oceanogr.* (submitted for publication).
- Bates, S.B., A. Tessier, P.G.C. Campbell et J. Buffle, 1982. Zinc adsorption and transport by Chlamydomonas variabilis and Scenedesmus subspicatus (Chlorophyceae) grown in semi-continuous cultures. *J. Phycol.* 18: 524-529.
- Bates, S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell et M. Létourneau, 1985. Zinc-phosphorus interactions and variation in zinc accumulation during growth of Chlamydomonas variabilis (Chlorophyceae) in batch culture. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42: 86-94.
- Blaise, C., N. Bermingham et R. Van Coillie, 1985. The integrated ecotoxicological approach to assessment of ecotoxicity. *Water Qual. Bull.* 10: 3-10.
- Blaise, C., R. Legault, N. Bermingham, R. Van Coillie et P. Vasseur, 1984. Microtest mesurant l'inhibition de la croissance des algues (CI50) par le dosage de l'ATP. *Sci. Tech. Eau* 17: 245-250.

- Blaise, C., B. Ska, G. Sabatini et R. Legault, 1981. Potentiel de bioaccumulation de substances toxiques d'eaux résiduelles industrielles à l'aide d'un essai utilisant des algues et des bactéries. In: Les colloques de l'INSERM: les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique, edited by H. Leclerc et D. Dive, INSERM, France, pp. 155-165.
- Blinn, D.W., T. Tompkins et L. Zaleski, 1977. Mercury inhibition on primary productivity using large volume plastic chambers in situ. J. Phycol. 13: 58-61.
- Brezonik, P.L., F.X. Browne et J.L. Fox, 1975. Applications of ATP to plankton biomass and bioassay studies. Water Res. 9: 155-162.
- Brook, A.J. et A.L. Baker, 1972. Chlorination at power plants: Impact on phytoplankton productivity. Science 176: 1414-1415.
- Burnisson, B. K., 1980. Modified dimethyl sulfonide (DMSO) extraction for chlorophyll analyses of phytoplankton. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37: 729-733.
- Butterwick, C., S.I. Heaney et J.F. Talling, 1982. A comparison of eight methods for estimating the biomass and growth of planktonic algae. Br. Phycol. J. 17: 69-79.
- Carpenter, E.J. et J.S. Lively, 1980. Review of estimates of algal growth using ^{14}C tracer techniques. In: Primary productivity in the sea, Falkowski, P. (ed), Plenum Press, pp. 161-178.
- Chang, J.C., P.B. Taylor et F.R. Leach, 1981. Use of the Microtox assay system for environmental samples. Bull. Environ. Cont. Toxicol. 26: 150-156.
- Chapman, A.G. et D.E. Atkinson, 1977. Adenine nucleotide concentrations and turnover rates. Their correlation with biological activity in bacteria and yeast. Adv. Microb. Physiol. 15: 253-306.
- Chapman, A.G., L. Fall et E.D. Atkinson, 1971. Adenylate energy charge in Escherichia coli during growth and starvation. J. Bacteriol. 108: 1072-1082.
- Chiaudani, G. et M. Vighi, 1978. The use of Selenastrum capricornutum batch cultures in toxicity studies. Mitt. Internat. Verein. Limnol. 21: 316-329.
- Clement-Metral, J.D. et M. Lefort-Tran, 1974. Relation between fluorescence and thylacoïd structure in Porphyridium cruentum. Biochim. Biophys. Acta 333: 560-569.

- Conway, H.L. et S.C. Williams, 1979. Sorption of cadmium and its effects on growth and the utilization of inorganic carbon and phosphorus of two freshwater diatoms. *J. Fish. Res. Board Can.* 36: 579-586.
- Cossa, D., 1976. Sorption du cadmium par une population de la diatomée Phaeodactylum tricornutum en culture. *Mar. Biol.* 34: 163-167.
- Côté, R., 1983. Aspects toxiques du cuivre sur la biomasse et la productivité du phytoplancton de la rivière du Saguenay, Québec. *Hydrobiologia* 98: 85-95.
- Couture, P., D. Couillard et G. Croteau, 1981. Un test biologique pour caractériser la toxicité des eaux usées. *Environ. Poll. (Series B)*, 2: 217-222.
- Couture, P., R. Van Coillie, P.G.C. Campbell et C. Thellen, 1982. Le phytoplancton, un réactif biologique sensible pour détecter rapidement la présence de substances toxiques. Compte rendu du Colloque International d'Écotoxicologie, 17-19 novembre 1981, France. In: Les colloques de l'INSERM: Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique, INSERM, 106: 255-272.
- De Souza-Lima, Y. et J.C. Romano, 1983. Ecological aspects of the surface microlayer. 1. ATP, ADP, AMP contents, and energy charge ratios of microplankton communities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 70: 107-122.
- Downes, M.T. et H.W. Paerl, 1978. Separation of two dissolved reactive phosphorus fractions in lake water. *J. Fish. Res. Bd Can.* 35: 1636-1639.
- Eichenberger, E., F. Schlatter, H. Weilenmann et K. Wuhrmann, 1981. Toxic and eutrophicating effects of Co, Cu and Zn on algal benthic communities in rivers. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21: 1131-1134.
- Environment Canada, 1979. Analytical methods manual, Ottawa, Ont. 267 p.
- Falkowski, P.G., 1977. The adenylate energy charge in marine phytoplankton: the effect of temperature on the physiological state of Skeletonema costatum (Grev.) Cleve. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 27: 37-45.
- Fedida, E., 1982. Étude de la qualité des effluents de la fabrique de chlore, de chlorite et de soude caustique de la compagnie Stanchem-Beauharnois (Standard Chemicals Limited). Environment Canada, Report No 4728-37/308.
- Feldheim, M.E., H.W. Augustin et E. Hoffmann, 1966. Über die Wirkung von 2-desoxy-D-glucose auf Atmung und Adenylsauresystem von Hefezellen. *Biochemische Zeitschrift* 344: 238-255.

- IOS, 1983. International Organization for standardization. Algal growth inhibition test. Draft method. Delft. Netherlands.
- Ivanovici, A.M., 1980. Application of adenylate energy charge to problems of environmental assessment in aquatic organisms. *Helgoländer wiss. Meeresunters* 33: 556-565.
- Jacobczak, E. et H. Leclerc, 1980. Mesure de l'ATP bactérien par bioluminescence: étude critique des méthodes d'extraction. *Ann. Biol. Clin.* 48: 297-304.
- Joubert, G., 1980. A bioassay application for quantitative toxicity measurements using the green alga *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* 14: 1759-1763.
- Joubert, G., 1981. Étude comparative des réactions à la toxicité entre la truite (*Salmo gairdneri*) et quatre autres intégrateurs biologiques sur trente-six cas de bio-essais statiques. In: Rapport technique canadien des sciences halieutiques et aquatiques, Ministère des Pêches et Océans, Ottawa, no 990, pp. 251-264.
- Källgvist, T., K. Ormerod et O. Storkijaer, 1980. Ring-test med metoder for mikroorganismer. Report No 15. Ecotoxicological methods for aquatic environments. Nordic Cooperative Organization for Applied Research, Helsinki, Finland.
- Karl, D.M., 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44: 739-796.
- Kopperschlager, G., M.L. Von Baehr et E. Hofmann., 1967. Zur regulation des mehrphasigen verlaufes des aeroben und anaeroben glukoseverbrauches in hefezellen. *Acta Biologica et Medica Germanica* 19: 691-704.
- Laube, V.M., C.N. McKenzie et D.J. Kushner, 1980. Strategies of response to copper, cadmium and lead by a blue-green and a green alga. *Can. J. Microbiol.* 26: 1300-1311.
- Laws, E.A., D.M. Karl, D.G. Redalje, R.S. Jurick et C.D. Winn, 1983. Variability in ratios of phytoplankton carbon and RNA to ATP and chlorophyll a in batch and continuous cultures. *J. Phycol.* 19: 439-445.
- Laws, E.A., D.G. Redalje, L.W. Hass, P.K. Bienfang, R.W. Eppley, W.G. Harrison, D.M. Karl et J. Marra, 1984. High phytoplankton growth and production rates in oligotrophic Hawaiian coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* 29: 1161-1169.

- Maitra, P.K. et R.W. Estabrook, 1967. Studies of Baker's yeast metabolism II. The role of adenine nucleotides and inorganic phosphate in the control of respiration during alcohol oxidation. *Archives Biochem. Biophysics* 121: 129-139.
- Martox, 1984. Proceeding of International Symposium on Ecotoxicological Testing for the Marine Environment, University of Ghent, Belgium.
- Matthews, R.A., A.L. Buikema Jr, J. Cairns Jr, et J.H. Rodgers Jr., 1982. Biological monitoring. Part IIA- Receiving system functional methods, relationships and indice. *Water Res.* 16: 129-139.
- Menzel, D.W. et J. Case, 1977. Concept and design: controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27: 1-7.
- Miller, W.E., J.C. Greene et T. Shiroyama, 1978. The Selenastrum capricornutum Printz algal assay bottle test. U.S. Environmental Protection Agency, EPA-60019-78-018, Corvallis, Oregon, 126 p.
- Monaham, T.J., 1973. Lead inhibition of Hormotila blennista (Chlorophyceae, Chloroccales). *Phycologia*, 12: 247.
- Monod, J., 1950. La technique de culture continue. Théorie et application. *Ann. Inst. Pasteur*, 79: 390-410.
- Morris, I., 1981. Photosynthetic products, physiological state and phytoplankton growth. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 210: 83-102.
- Morris, I. et H.E. Glover, 1974. Questions on the mechanisms of temperature adaptation in marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, 24: 147-154.
- Moulin, L.J., 1983. Impacts des effluents d'une usine de chlore-soude caustique sur l'environnement bio-physique du lac et de la rivière Saint-Louis. M.Sc. Thesis, Université de Montréal.
- Nalewajko, C. et D.R.S. Lean, 1978. Phosphorous kinetics - Algal growth relationships in batch cultures. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 21: 184-192.
- Nyholm, N., 1985. Response variable in algal growth inhibition tests-biomass or growth rate? *Water Res.* 19, 273-279.
- OCDE (Organisation pour la coopération et le développement économique), 1981. Lignes directrices de l'OCDE pour les essais des produits chimiques. Section 2: Effets sur les systèmes biologiques, "Algues, test d'inhibition de croissance", No 201, p. 1-14.
- OCDE (Organisation pour la coopération et le développement économique), 1984. International workshop on biological testing of effluents (and related receiving waters), Duluth, Minnesota, USA.

- Palmer, P.M., 1962. Algae in water supplies. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Ohio. 88 p.
- Planas, D. et A. Lamarche, 1983. Lack of effect of arsenic on phytoplankton communities in different nutrient conditions. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 40: 156-161.
- Platt, T. et A. Jassby, 1976. The relationship between photosynthesis and light for natural assemblages of coastal marine phytoplankton. J. Phycol. 12: 421-430.
- Platt, T., C.L. Gallegus et W.G. Harrison, 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. J. Mar. Res. 38: 687-701.
- Plumb, R.H. Jr. et G.F. Lee, 1979. A comparison of C-14 incubation technique. Water, Air, Soil Pollut. 11: 289-299.
- Rachlin, J.W., B. Warkentine et T.E. Jensen, 1982. The Growth Response of Chlorella saccharophila, Navicula incerta and Nitzschia closterium to selected concentrations of cadmium R.M. Torrey Botanical Club, 109(2): 129-135.
- Rai, L.C., J.P. Gaur et H.D. Kumar, 1981. Phycology and heavy metal pollution. Biol. Rev. 56: 99-151.
- Rainer, S.F., A.M. Ivanovici et V.A. Wadley, 1979. Effect of reduced salinity on adenylate energy charge in three estuarine molluscs. Mar. Biol. 54: 91-99.
- Rehnberg, B.G., D.A. Schultz et R.L. Raschke, 1982. Limitations of electronic particule counting in reference to algal assays. J. Wat. Pollut. Control Fed. 54: 181-186.
- Riemann, B., 1978. Absorption coefficient for chlorophylls a and b in methanol and a comment in interference of chlorophyll b in determinations of chlorophyll- a. Vatten 3: 187-194.
- Riemann, B. et S. Wium-Andersen, 1982. Predictive value of adenylate energy charge for metabolic and growth states of planktonic communities in lakes. Oikos, 39: 256-260.
- Rigler, F.H., 1968. Further observations inconsistent with the hypothesis that the molybdenum blue method measures orthophosphates in lake water. Limnol. Oceanogr. 13: 7-13.

- Riper, D.M., T.G. Owens et P.G. Falkowski, 1979. Chlorophyll turnover in Skeletonema costatum, a marine plankton diatom. *Plant. Physiol.* 64: 49-54.
- Robertson, A.M. et R.S. Wolfe, 1970. Adenine triphosphate pools in Methanobacterium. *Journal of Bacteriology* 102: 43-51.
- Round, F.E., 1973. *The Biology of the algae*, London: Edward Arnold, 278 p.
- Roy, C., 1982. Bioaccumulation des métaux lourds dans les macrophytes aquatiques de la rivière et du Lac Saint-Louis. M.Sc. Thesis, Université de Montréal.
- Rueter, J.G., J.J. McCarthy et E.J. Carpenter, 1979. The toxic effect of copper on Oscillatoria (Trichodesmium) theibautii. *Limnol. Oceanogr.* 24: 558-562.
- Sakaguchi, T., T. Tsuji, A. Nakajima et T. Horikoshi, 1979. Accumulation of cadmium by green microalgae. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8: 207-215.
- Shehata, F.H.A. et B.A. Whitton, 1981. Field laboratory studies on blue-green algae from aquatic site with high levels of zinc. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21: 1466-1471.
- Shiroyama, T., W.E. Miller et J.C. Greene, 1975. Effect of nitrogen and phosphorus on the growth of Selenastrum capricornutum. In: *Proc. Biostim. Nutr. Assess. Workshop*, U.S. Environmental Protection Agency, Oregon, EPA-66-/3-75-034, pp. 132-142.
- Shubert, L.E. (ed), 1984. *Algae as ecological indicators*. Academic Press, New-York, 434 p.
- Sicko-Goad, L. et D. Lazinsky, 1983. Synergistic effects of phosphorus nutrient status and lead exposure in three algae. *Micron and Macroscopica Acta*, 14(3): 261-262.
- Slayman, C.L., 1973. Adenine nucleotide levels in Neurospora as influenced by conditions of growth and by metabolic inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 114: 752-766.
- Smith, J.N. et D.H. Loring, 1981. Geochronology for mercury pollution in the sediment of the Saguenay Fjord, Québec. *Envir. Sci. Technol.* 15: 944-951.
- Solomons, G.L., 1972. Improvements in the design and operation of the chemostat. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 22: 217-228.

- Stainton, M.P., 1980. Error in molybdenum blue methods for determining orthophosphate in freshwater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 472-478.
- Stauffer, R.E., G.F. Lee et D.E. Armstrong, 1979. Estimating chlorophyll extraction biases. *J. Fish. Res. Bd Can.* 36: 152-157.
- Stockner, J.G. et N.J. Antia, 1976. Phytoplankton adaptation to environmental stress from toxicants, nutrients and pollutants - a warning. *J. Fish. Res. Bd Can.* 33: 2089-2096.
- Symoens, J.J., S. Janssen, L. Remels et D. Van de Gucht, 1981. Algae as indicators of water quality in a lowland fen nature reserve. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21: 1472-1475.
- Tailling, J.F. et D. Driver, 1983. Some problems in the estimation of chlorophyll-a in phytoplankton. In: M.S. Doty (ed). Conference of primary productivity measurement, marine and freshwater, Hawaiï, 1961. U.S. Atomic Energy Comm. TID -7633 pp. 142-146.
- Taylor, B.F. et R.S. Oremland, 1979. Depletion of adenosine triphosphate in Desulfovibrio by oxyanions of group VI elements. *Curr. Microbiol.* 3: 101-103.
- Vallée, B.L. et D.D. Ulmer, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead, p. 91-128. In: E.E. Smell et al. [ed.]. Annual review of biochemistry, vol. 4. Annual Reviews Inc.
- Van Coillie, R., P. Couture, R. Schoenert et C. Thellen, 1982. Mise au point d'une évaluation rapide de la toxicité originale des effluents et de leurs composantes à l'aide d'algues. INRS-Eau, rapport scientifique no. 148, 138 p.
- Vollenweider, R.A., 1974. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environment. 2nd edition, Blackwell Scientific Publication, IBP Handbook No 12, London.
- Walsh, G.E. et R.G. Merrill, 1984. Algal bioassays of industrial and energy process effluents. In: L.E. Shubert (ed). Algae as Ecological Indicators. Academic Press, New-York, pp. 329-360.
- Weiler, C.S. et D.M. Karl, 1979. Diel changes in phased-dividing cultures of Ceratium furca (Dinophyceae): nucleotide triphosphates, AEC, cell carbon and patterns of vertical migration. *J. Phycol.* 15: 384-391.
- Wells, P.G., 1984. Marine Ecotoxicology Test - Zooplankton. In: G. Persoone et al. (eds), Proceedings of International Symposium on Ecotoxicological Testing for the Marine Environment, University of Ghent, Belgium.

- White, E. et G. Payne, 1980. Distribution and biological availability of reactive high molecular weight phosphorus in natural waters in New Zealand. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 664-669.
- White, E., G. Payne, S. Pickmere et F.R. Pick, 1981. Orthophosphate and its flux in lake waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1215-1219.
- Whitton, B.A. et B.M. Diaz, 1980. Chemistry and plants of streams and rivers with elevated zinc. In: *Proceeding of the 14th Annual Conference on Trace Substance and Environmental Health*, 14: 457-463.
- Williams, L.G. et D.I. Mount, 1965. Influence of zinc on periphytic communities. *Am. J. Bot.* 52: 16-34.
- Wong, P.T.S. G. Burnison et Y.K. Chau, 1979. Cadmium Toxicity to Freshwater Algae. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 23: 487-490.
- Wong, P.T.S., Y.K. Chan et D. Patel, 1983. The use of algal batch and continuous culture techniques in metal toxicity study. In: J.D. Nriagu (ed), *Aquatic toxicology*, John Wiley and Sons, New York, 525 p.
- Wong, P.T.S. et P. Couture, 1986. Toxicity screening using phytoplankton. In: B.J. Butka and G. Bitton (eds), *Toxicity testing using microorganisms* CRC Press, Boca Raton, Florida. (in press).
- Wurtsbaugh, W.A. et A.H. Horne, 1982. Effects of copper on nitrogen fixation and growth of blue-green algae in natural plankton associations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 1636-1641.