

Thèse de doctorat

**EFFET DE LA MATIERE ORGANIQUE DISSOUTE
SUR LA BIODISPONIBILITÉ DU FER POUR
L'ALGUE VERTE *SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*.**

Présentée à
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INRS-EAU

par
RENÉ LANGIS

Juin 1989.

REMERCIEMENTS

Bien que la présentation d'une thèse de doctorat doit être le fruit d'un travail individuel, sa réalisation ne saurait être atteinte sans le concours de nombreuses personnes.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le professeur Pierre Couture, ainsi que mon codirecteur, le professeur, Peter G.C. Campbell, pour leurs nombreux et sages conseils et surtout pour le soutien qu'ils ont su m'apporter tout au long de ce travail. Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance au professeur Joël de la Noüe, de l'Université Laval, dont l'érudition et l'expertise m'ont été précieuses à l'occasion de nos fréquentes rencontres.

Tout travail de recherche expérimental nécessite un support technique important. Des remerciements sont adressés au directeur du laboratoire de l'INRS-Eau, monsieur Bertrand Dubreuil et à son prédécesseur, monsieur René Bougie, ainsi qu'aux techniciens madame Michelle Geoffroy-Bordeleau, monsieur Bernard Veilleux et monsieur Paul Boisvert.

Je ne saurais non plus oublier tous ceux et celles, professeurs, stagiaires post-doctoraux, agents et associés de recherche et collègues pour l'aide qu'ils m'ont apportée en de nombreuses occasions. Je souligne particulièrement le concours de monsieur Jean-Luc Mouget pour sa participation à la mise au point de la technique du Percoll.

Je voudrais aussi souligner le concours de monsieur Marc Bisson (Ministère de l'Environnement du Québec) pour avoir autorisé les nombreuses analyses effectuées par le personnel du Ministère et celui de madame Renée Patenaude en microbiologie. Les analyses par microscopie électronique me sont devenues accessibles grâce aux techniciens du Centre de Recherches Minérales et de l'INRS-géoresources.

Finalement, je remercie mes parents, Julie et Maurice, pour leur support essentiel.

RÉSUMÉ

Les agents chélateurs organiques sont soupçonnés d'affecter la biodisponibilité du fer en milieu aquatique en maintenant des quantités suffisantes de fer non sédimentable dans la colonne d'eau pour permettre la croissance du phytoplancton. Plusieurs substances organiques non caractérisées, couramment rejetées dans les eaux naturelles ont des propriétés chélatrices et pourraient stimuler la biodisponibilité du fer.

Dans cette thèse, sont présentés les résultats de trois séries d'expériences dont l'objectif général était de démontrer que la matière organique dissoute (MOD) résiduaire d'un traitement secondaire d'eaux usées domestiques était capable de faciliter la biodisponibilité du fer pour l'algue verte *Selenastrum capricornutum*.

La première série d'expériences avait pour but de montrer que la stimulation de la croissance du phytoplancton observée en présence de MOD était en grande partie le résultat de son influence sur la biodisponibilité du Fe. Les travaux, réalisés avec une fraction de MOD de poids moléculaire de 1000-10 000

daltons, ont montré que celle-ci pouvait stimuler la biodisponibilité du fer pour *S. capricornutum*, sans pour autant favoriser la biodisponibilité du manganèse ou autres métaux traces.

Dans une deuxième série d'expériences on cherchait à savoir si une fraction de poids moléculaire 10 000 à 100 000 daltons était également capable de stimuler la biodisponibilité du fer en comparant son effet à celui de la fraction 1000-10 000 daltons extraite du même effluent secondaire. Les résultats des expériences de croissance réalisées avec des cultures de *S. capricornutum*, ont montré que la biodisponibilité du fer était significativement stimulée en présence de chacune des deux fractions, mais qu'elle était davantage favorisée par la fraction de MOD de faible poids moléculaire (1000 à 10 000 daltons).

Ces derniers résultats ont pu être approfondis par les travaux réalisés dans le cadre de la dernière série d'expériences. Une expérience de croissance et de prise en charge réalisée à l'aide de ^{59}Fe a montré d'une manière directe que la biodisponibilité d'oxyhydroxydes ferriques était significativement affectée par la fraction de MOD de faible poids moléculaire. Des incubations abiotiques réalisées parallèlement à ces bioessais ont, de plus, montré que la dissolution des particules de Fe était aussi plus importante en présence de MOD qu'en son absence. Ces résultats ont permis

d'inférer que la meilleure disponibilité du fer pour *S. capricornutum* en présence de MOD peut être associée à l'effet de la MOD sur la labilité des oxyhydroxydes ferriques.

L'ensemble des résultats permet de suggérer que la MOD résiduaire d'un traitement secondaire d'eaux usées municipales peut stimuler la productivité phytoplanctonique dans les eaux naturelles pauvres en matière organique.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	i
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	xi
1 INTRODUCTION	1
2 PROBLÉMATIQUE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE	7
2.1 INTRODUCTION	7
2.2 MOD et Fe: aspects chimiques	
2.2.1 Chimie inorganique du Fe	11
2.2.2 Chimie organique du Fe	15
2.2.3 Fe colloïdal	17
2.2.4 Dissolution et dissociation photochimique des complexes et des colloïdes de Fe	20
2.3 AGENTS COMPLEXANTS ET BIODISPONIBILITÉ DU Fe	29
2.3.1 Chélateurs artificiels	29
2.3.2 Chélateurs naturels et considérations écologiques	34
2.4 MODÈLE CONCEPTUEL	39

3	MATÉRIEL ET MÉTHODES GÉNÉRALES	44
3.1	Origine de la matière organique dissoute (MOD) ..	44
3.2	Ultrafiltration et diafiltration	45
3.3	Dosage du Fe	48
3.4	Dosage du carbone organique dissous	49
3.5	Dosage des éléments nutritifs	50
3.6	Conditions de culture	50
4	EFFET D'UNE FRACTION DE MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE SUR LA BIODISPONIBILITÉ DE MÉTAUX A L'ÉTAT DE TRACES POUR <i>SELENASTRUM CAPRICORNUTUM</i>	53
4.1	Introduction	53
4.2	Matériel et méthodes	56
4.2.1	Préparation des milieux de culture	56
4.3	Résultats et discussion	59
4.4	Conclusions	68
5	EFFET DE DEUX FRACTIONS DE MATIÈRE ORGANIQUE DE POIDS MOLÉCULAIRE DIFFÉRENT SUR LA BIODISPONIBILITÉ DU FER POUR <i>SELENASTRUM CAPRICORNUTUM</i>	70
5.1	Introduction	70
5.2	Matériel et méthodes	72
5.2.1	Préparation des fractions de MOD	72
5.2.2	Bioessais	73
5.2.3	Statistiques	77
5.3	Résultats	77
5.3.1	Effet de la MOD	77
5.3.2	Effet des ajouts de Fe	79
5.4	Discussion	82

5.5	Conclusions	89
6	EFFET D'UNE FRACTION DE MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE SUR LA BIODISPONIBILITÉ DE L'OXYHYDROXYDE DE FER POUR LE PHYTOPLANCTON	91
6.1	Introduction	91
6.2	Matériel et méthodes	95
6.2.1	Expérience de croissance	96
6.2.3	Expérience de prise en charge du Fe	100
6.2.4	Expérience de dissolution et de réduction	105
6.3	Résultats	109
6.3.1	Expérience de croissance	109
6.3.2	Expérience de dissolution et de réduction	109
6.3.3	Expérience de prise en charge	115
6.4	Discussion	117
6.4.1	Dissolution et réduction	117
6.4.2	Incidence de la dissolution sur la prise en charge du Fe	121
6.4.3	Colloïdes et précipités	123
6.5	Conclusions	126
7	CONCLUSIONS	129
8	RÉFÉRENCES CITÉES	133
9	ANNEXE	154

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1	Taille approximative de différentes espèces de Fe dans les eaux naturelles	14
TABLEAU 2.2	L'effet de la préparation et des conditions expérimentales sur la photolabilité et la biodisponibilité du Fe	26
TABLEAU 3.1	Caractéristiques des membranes d'ultra-filtration utilisées dans cette étude	46
TABLEAU 3.2	Composition du milieu AAP modifié	51
TABLEAU 4.1	Valeurs des aires sous la courbe calculées à partir des mesures de fluorescence in vivo	60
TABLEAU 4.2	Signification des différences entre les traitements pris deux à deux, obtenus par le test Wilcoxon-Mann-Whitney. Les chiffres sont les probabilités d'effectuer l'erreur de type I	61

TABLEAU 5.1 Concentrations de Fe ($\mu\text{M Fe}$) mesurées 48 h après la préparation des milieux de culture et après filtration sur filtre Nuclepore de $0.2 \mu\text{m}$ 76

TABLEAU 5.2 Croissance dans chaque milieu de culture. Valeurs calculées selon l'aire sous la courbe de croissance à partir des mesures du nombre de cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$ (méthode 1) et des volumes cellulaires totaux (VCT) (méthode 2) 80

TABLEAU 5.3 Dénombrement ($\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1} \times 10^5$) et VCT ($\text{nL}\cdot\text{mL}^{-1}$) mesurées dans chaque milieu de culture au jour 8 81

TABLEAU 6.1 Activité (^{59}Fe , comptes par minute) recueillie sur des filtres Nuclepore à partir du milieu AA marqué au ^{59}Fe ($10^{-2} \text{mCi}\cdot\text{L}^{-1}$), inoculé avec 10^5 cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$ ou non inoculé 103

TABLEAU 6.2 Distribution des pourcentages de l'activité isotopique totale mesurés dans des gradients étagés de Percoll à partir des suspensions "A" et "B" sans algues .. 104

TABLEAU 6.3 Valeurs des surfaces sous les courbes de croissance pour les trois milieux de culture (AM, AA et AB) 111

TABLEAU 6.4 Prises en charge du ^{59}Fe lors des expériences réalisées à $t= 21 \text{ h}$ et $t= 42 \text{ h}$ 116

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Modèle conceptuel du cycle du Fe dissous dans les eaux naturelles	40
Figure 4.1	Courbes de croissance de <i>S. capricornutum</i> dans le milieu témoin (A) et le milieu AAP enrichi de MOD sans oligo-éléments secondaires (AM-MT)	67
Figure 5.1	Courbes de croissance obtenues à l'aide (A) des dénombrements cellulaires et (B) des volumes cellulaires totaux (VCT) pour les milieux expérimentaux et le témoin	78
Figure 5.2	Relation entre les concentrations de Fe dissous et les dénombrements au jour 8 dans chacun des milieux de culture	87
Figure 6.1	Préparation des milieux AM, AA et AB	97
Figure 6.2	Photographies par MEB des particules de Fe des milieux (A) AA, (B) AM et (C) AB	106

Figure 6.3 Spectre en diffraction d'énergie obtenu à partir de particules du milieu AA 107

Figure 6.4 Courbes de croissance de *S. capricornutum* dans les milieux AA, AM et AB, obtenues à partir, (A) des valeurs de dénombrement ($\text{cellules} \cdot \text{mL}^{-1} \times 10^6$) et (B) des valeurs de VCT ($\mu\text{l} \cdot \text{mL}^{-1} \times 10^{-9}$) 110

Figure 6.5 Pourcentages de ^{59}Fe obtenus dans les filtrats des milieux AA, AM et AB, (A) à la lumière et (B) à l'obscurité 112

Figure 6.6 Pourcentages de Fe(II) dans les milieux AA, AM et AB, (A) à la lumière et (B) à l'obscurité 114

INTRODUCTION

La dynamique chimique des éléments nutritifs dans les écosystèmes aquatiques est une question d'intérêt scientifique fondamental. L'étude de cette dynamique devient, cependant, particulièrement pertinente dans la mesure où l'un (ou plusieurs) de ces éléments chimiques peut (peuvent) influencer significativement la structure et la productivité des communautés phytoplanctoniques. Au cours des dernières années, les efforts des chercheurs ont permis d'identifier le phosphore et l'azote comme étant les principaux éléments nutritifs qui contrôlent la productivité primaire dans les eaux naturelles et qui, par conséquent, sont souvent à l'origine des problèmes d'eutrophisation lorsqu'ils sont en concentration excessive. Ces deux éléments ne peuvent à eux seuls expliquer toute la complexité des interactions entre la chimie des systèmes aquatiques et la production phytoplanctonique. En effet,

certaines travaux connexes ont montré que la matière organique (MO) peut aussi exercer un contrôle sur la production primaire (Provasoli, 1963; Prakash et Rashid, 1968; Verduin, 1971; Sachdev et Clesceri, 1978; De Haan et al., 1983, 1985).

La matière organique dissoute (MOD) peut affecter la production primaire dans les eaux naturelles, directement et indirectement (Wetzel, 1983). Dans le premier cas, elle peut agir comme une source de carbone organique (acides aminés ou polysaccharides) et comme une source d'énergie pour les algues capables, comme *Chlorella* (Lalucat et al., 1984), de passer de leur mode de nutrition habituel, à savoir la photoautotrophie, à l'hétérotrophie. Indirectement, elle peut interagir avec certains éléments nutritifs ou toxiques et, le cas échéant, affecter leur biodisponibilité, et évidemment, elle peut fournir des substances nutritives inorganiques (à base de N, P, C) après sa minéralisation.

La MO dans les eaux naturelles peut être d'origine autochtone ou allochtone. La MO autochtone résulte de l'activité biologique produite à l'intérieur du milieu aquatique (métabolisme et décomposition). La MO allochtone origine de sources extérieures au milieu; elle comprend les particules et substances apportées par l'écoulement des eaux du bassin versant ainsi que les substances organiques rejetées avec les eaux usées. La diversité des sources de MO explique que les

substances organiques soient un assemblage de composés très hétérogène.

La MOD est définie ici comme étant la fraction de carbone organique qui peut traverser un filtre à porosité de 0.2 μm . Bien que des filtres à porosité de 0.45 μm aient été utilisés à cette fin, l'utilisation de filtres à porosité de 0.2 μm en polycarbonate est plus rigoureuse (Williams, 1986), car certaines particules telles que bactéries et picoplancton (0.2-2.0 μm) peuvent traverser un filtre de 0.45 μm (Beers, 1986). Signalons que la partie la plus importante du carbone organique dans les systèmes aquatiques est sous la forme dissoute (Wetzel, 1983).

Une question de grande importance écologique est l'influence possible de la MO, grâce à ses propriétés de chélation, sur la biodisponibilité des métaux à l'état de traces. Le cas du fer est intéressant; en effet, alors que les substances organiques peuvent diminuer la toxicité de certains métaux tels que le Cu (Sunda et Lewis, 1978), elles semblent capables de maintenir et même de favoriser la biodisponibilité du Fe (Shapiro, 1969; Finden et al., 1984). L'attention accordée aux interactions métaux-MOD dans cette recherche s'appuie en partie sur ces considérations et sur les résultats d'une expérience préliminaire (voir Annexe). Celle-ci a permis d'inférer que l'effet dominant de la MOD résiduaire d'un traitement secondaire sur la croissance d'une culture de

phytoplancton découlait de modifications de l'état physico-chimique de certains micro-éléments.

Quoique la question de l'effet des substances organiques sur la biodisponibilité du Fe ait souvent été évoquée dans la littérature scientifique, relativement peu de travaux ont traité directement de cette problématique. De plus, la majorité de ces travaux se sont concentrés soit sur des chélateurs synthétiques, soit sur les substances humiques, une classe de composés organiques largement distribués dans les eaux naturelles. Toutefois, vue la complexité des interactions MOD-Fe-phytoplancton, l'étude de sources plus diversifiées de MOD est nécessaire afin d'offrir une image plus complète de cette problématique.

L'objectif général de cette thèse est donc d'étudier l'effet potentiel sur la biodisponibilité du Fe d'une catégorie de substances organiques jusqu'à présent négligée par les chercheurs: la MOD résiduaire d'un traitement secondaire d'un effluent municipal. Alors que des quantités énormes de MO sont rejetées dans les écosystèmes aquatiques avec les eaux résiduaires traitées, les connaissances acquises devraient permettre de mieux prévoir dans quelle mesure la biodisponibilité du Fe peut être modifiée par ces rejets.

Les divers éléments qui seront discutés au chapitre 2 (problématique et revue de la littérature) permettent de poser

l'hypothèse générale que la MOD résiduaire d'un traitement secondaire peut influencer la croissance du phytoplancton en favorisant la biodisponibilité du Fe.

Cette hypothèse générale est vérifiée par trois sous-hypothèses plus spécifiques:

i) la biodisponibilité du Fe est celle qui est la plus améliorée par la MOD comparativement à celle des autres micro-éléments essentiels;

ii) la biodisponibilité du Fe est affectée différemment par différentes catégories de MOD (caractérisées sur la base de leur poids moléculaire);

iii) la biodisponibilité et la prise en charge du Fe découlent de l'influence de la MOD sur les colloïdes ou les précipités de Fe, que ceux-ci soient formés en présence ou en absence de MOD. Ces hypothèses respectives sont confirmés ou infirmées dans les travaux décrits aux chapitres 4, 5 et 6.

La vérification de l'hypothèse (i) (décrite au chapitre 4) fut nécessaire afin de montrer que la MOD avait une influence plus importante sur la biodisponibilité du Fe que sur la biodisponibilité des autres métaux à l'état de traces couramment utilisés dans les milieux de culture artificiels. Cette expérience, qui se devait d'être réalisée au préalable, a justifié le fait que l'accent soit porté sur le Fe.

L'objectif de expérience décrite au chapitre 5 fut de montrer dans quelle mesure la MOD extraite d'un effluent secondaire peut influencer la biodisponibilité du Fe pour *S. capricornutum*. De plus, l'effet d'une fraction de poids moléculaire relativement élevé (10 000 à 100 000 daltons) y est distingué de l'effet d'une fraction de poids moléculaire dit faible (1000 à 10 000 daltons) afin de vérifier l'hypothèse (ii).

Enfin, l'objectif de l'expérience décrite au chapitre 6 fut de montrer comment la MOD peut influencer la biodisponibilité de précipités et colloïdes de Fe, préparés selon deux modes différents: en présence, ou en absence de MOD durant leur formation. De plus, des contrôles dans des milieux abiotiques ont été réalisés afin de pouvoir relier les phénomènes observés aux réactions chimiques de dissolution et de réduction. La biodisponibilité du Fe a été vérifiée (hypothèse iii) par une expérience effectuée sur la croissance de *S. capricornutum* et par une expérience de prise en charge du radioisotope ^{59}Fe .

Chacune de ces sous-hypothèses a été traitée à l'intérieur de trois sections indépendantes comprenant chacune une introduction, une présentation du matériel et des méthodes spécifiques à l'expérience, une section de résultats et une discussion (ces deux dernières sections ont été regroupées dans le cas du chapitre 4).

PROBLÉMATIQUE ET REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1 INTRODUCTION

La question de la disponibilité du Fe est d'intérêt écologique: certains auteurs, ont par exemple, observé que cet élément peut limiter la productivité primaire dans certains habitats dulcicoles (Schelske, 1962; Elder, 1977; Lin et Schelske, 1981; Wurtsbaugh et Horne, 1983) et dans certains habitats marins tels que des récifs coralliens (Entsch et al., 1983) et la mer des Sargasses (Ryther et Guillard, 1959; Menzel et Ryther, 1961; Subba Rao et Yeats, 1984). L'essence même de la biodisponibilité, directe ou indirecte, est que le flux de Fe vers le phytoplancton soit assuré par la présence de composés de Fe résistants à la sédimentation et susceptibles d'alimenter les cellules. La présence de MOD favorise ces conditions. En effet, la MOD a été reconnue comme pouvant maintenir le Fe dans

la colonne d'eau par la formation de complexes solubles ou par la stabilisation des suspensions colloïdales (Shapiro, 1964). Toutefois, le mécanisme par lequel la MOD peut favoriser la biodisponibilité du Fe n'a pu être établi jusqu'à présent de manière non équivoque.

La prise en charge du Fe par le phytoplancton est contrôlée par son état physico-chimique (Anderson et Morel, 1982). Les concentrations de Fe en solution et le taux d'oxydation du fer ferreux (Fe(II)) en fer ferrique (Fe(III)) dans les eaux oxygénées sont, à leur tour, affectés principalement par le pH, le potentiel rédox et la température du milieu (Wetzel, 1983). Par ailleurs, il est maintenant reconnu que la MO peut, elle aussi, influencer la distribution des espèces de Fe (Shapiro, 1964; Schnitzer et Khan, 1972; Cameron et Liss, 1984); l'idée qu'elle puisse ainsi affecter la biodisponibilité du Fe a aussi été évoquée (Plumb et Lee, 1973; Elder, 1975; Anderson et Morel, 1982; Finden et al., 1984).

Tel que mentionné précédemment, il y a cependant une contradiction apparente entre le fait que la MOD puisse, d'une part, réduire la disponibilité de certains métaux tel que le cuivre (Sunda et Lewis, 1978) et le cadmium (Sedlacek et al., 1987) et, d'autre part, l'hypothèse qu'elle puisse augmenter la biodisponibilité du Fe. Deux propriétés chimiques du Fe qui le distinguent des autres métaux à l'état de traces peuvent expliquer ce paradoxe: sa très faible solubilité (lorsque

présent sous forme ferrique) et sa capacité de passer rapidement d'un état d'oxydation à l'autre (section 2.2).

Il est utile de définir ici ce qu'on entend par "Fe biodisponible". Au niveau de la cellule phytoplanctonique, le critère fondamental de biodisponibilité sera qu'un flux adéquat de Fe soit maintenu à partir de la solution pélagique ambiante, à travers la micro-couche de diffusion qui englobe la cellule et ceci jusqu'à la surface cellulaire. D'un point de vue géochimique, cela implique que des formes de Fe non sujettes à la sédimentation soient présentes dans la zone pélagique et qu'elles puissent diffuser à travers la micro-couche péricellulaire (par exemple, les complexes inorganiques: $\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$, $\text{Fe}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6$, $\text{Fe}^+(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})$, $\text{Fe}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_5(\text{OH})\dots$), ou encore qu'elles fournissent une source suffisante d'espèces mobiles, soit par dissociation (par exemple, des complexes organoferriques labiles à haut poids moléculaire), soit par réaction d'oxydo-réduction (par exemple, par réduction des colloïdes de Fe(III)).

Une source adéquate de Fe biodisponible est essentielle au phytoplancton, car ses besoins physiologiques en Fe sont nombreux. Par exemple, plusieurs travaux ont suggéré que la synthèse de la chlorophylle-a dépendait des ressources en Fe (Hayward, 1968; Glover, 1978; Trick et al., 1983a). Quoiqu'aucun précurseur de chlorophylle ne contienne du Fe, celui-ci est nécessaire à la synthèse de plusieurs de ces

précurseurs (Miller et al., 1986). D'ailleurs Rueter et Ades (1987) ont montré que le Fe joue un rôle déterminant dans le métabolisme du carbone et de l'azote. Ses propriétés métaboliques découlent de l'équilibre judicieux des états d'oxydation Fe(II)-Fe(III), lequel lui permet de participer aux réactions de transport d'électrons dans les processus de la respiration et de la photosynthèse. Ainsi, chez le phytoplancton ce sont les composantes responsables du transfert d'électrons dans les réactions de la photosynthèse qui sont les cibles immédiates des déficiences en Fe (Sandmann, 1985).

L'objectif de ce chapitre est de discuter de la biodisponibilité du Fe, sous les formes dissoute ou colloïdale et de proposer un modèle conceptuel qui intègre les concepts qui ont cours actuellement. Anderson et Morel (1982) ont proposé un certain nombre de réactions chimiques pour expliquer l'influence des chélateurs organiques naturels sur la biodisponibilité du Fe pour le phytoplancton. Plus récemment, quelques découvertes importantes (par ex. Waite et Morel, 1984a, b, c; Finden et al., 1984) ont partiellement appuyé leurs hypothèses. Toutefois, en raison des conditions expérimentales différentes et de résultats parfois contradictoires, les résultats de ces travaux n'ont pas apporté une compréhension globale du phénomène. Le modèle proposé ici s'inspire des concepts mis de l'avant par Anderson et Morel (1982) auxquels quelques ajustements requis par les découvertes récentes sont apportés. Le but du modèle n'est pas de fournir une image globale du cycle géochimique du Fe dans le

milieu naturel; il est de préciser le rôle des processus chimiques qui participent au flux des espèces biodisponibles de Fe.

2.2 MOD et Fe: aspects chimiques

L'hypothèse que la MOD augmente la biodisponibilité du Fe est soutenue par: 1) la dynamique chimique du Fe dans les eaux naturelles, 2) les stimulations de croissance observées en présence d'agents chélateurs organiques artificiels ou naturels (EDTA, NTA, substances humiques).

2.2.1 Chimie inorganique du Fe

Le Fe dans les milieux aquatiques se trouve généralement à l'état ferrique (Fe(III)); l'état ferreux (Fe(II)) est surtout le résultat de conditions réductrices typiquement rencontrées dans les sédiments ou les hypolimnions anoxiques. Ce fer ferreux, qui provient, soit du mélange des eaux anoxiques avec les eaux oxiques, soit de la diffusion verticale du Fe réduit provenant des sédiments (Stumm et Lee, 1960), est plus ou moins rapidement oxydé selon la relation:

$$-d [\text{Fe(II)}]/dt = k [\text{Fe(II)}] [\text{OH}]^2 p\text{O}_2$$

où k correspond à la constante de vitesse dont les unités sont $\text{M}^{-2} \text{atm}^{-1} \text{min}^{-1}$, $[\text{OH}]$ représente la concentration molaire des ions hydroxydes, $[\text{Fe(II)}]$ la concentration molaire du Fe ferreux total et $p\text{O}_2$, la pression partielle en oxygène (en atm)

(Sung et Morgan, 1980). La relation est fortement dépendante du pH. Par exemple, Davison et Seed (1983) ont obtenu une valeur de demi-vie du Fe(II) d'approximativement 35 min dans des eaux naturelles à pH 6.8, alors que Kester et al. (1975) ont obtenu une demi-vie d'environ 3 min à pH 8.0.

A l'équilibre et sous des conditions oxygénées (potentiel rédox = 12) le Fe sera donc sous l'état ferrique. En absence de ligands organiques ce Fe ferrique est pratiquement insoluble: le produit de solubilité ($\log K_s$) de l'hydroxyde ferrique ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) (s) est égal à -38.8 (Smith et Martell, 1976) et celui de l'hydroxyde ferreux ($\text{Fe}(\text{OH})_2$) (s) est égal à -15.1 (25°C; I~0) (Baes et Mesmer, 1976). En effet, les concentrations à l'équilibre du Fe(III) inorganique dissous total pour une gamme de pH de 6 à 8 sont de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-10} M dans une solution saturée de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ (s) amorphe (Morel, 1983).

De Haan et al. (1985) ont estimé qu'une concentration minimale de 10^{-6} M était nécessaire au maintien de la communauté phytoplanctonique du lac Tjeukemeer. Cette valeur est de plusieurs ordres de grandeur au-dessus de la concentration des ions de Fe(III) dissous de 10^{-23} M calculée à partir des équilibres chimiques et sous les conditions ($p\text{O}_2$ élevée, pH= 9 à 10) du lac Tjeukemeer. Bien que cette comparaison illustre la différence apparente entre l'activité à l'équilibre des espèces inorganiques dissoutes et l'estimation du Fe requis pour la croissance, la signification écologique des valeurs obtenues par

calcul des équilibres chimiques est limitée par deux facteurs: premièrement, les processus chimiques dans les eaux naturelles atteignent rarement l'équilibre et, deuxièmement, la contribution possible d'espèces transitoires de Fe (autres que l'ensemble des hydroxo-complexes du Fe) au flux total du Fe biodisponible est négligée (voir section 2.3).

Dans ce contexte, on doit noter que les concentrations de Fe filtrable sont fréquemment de plusieurs ordres de grandeur supérieures aux valeurs prédites par les calculs d'équilibre chimique (Oborn, 1960; Livingstone, 1963; Perdue et al., 1976). Une ambiguïté réside dans le fait que plusieurs auteurs ont arbitrairement associé le Fe dissous au Fe filtrable, puisque même le Fe filtré sur une membrane (0.2 μm) peut contenir du Fe colloïdal dont le diamètre se situe entre 0.01 μm et 0.2 μm (Stumm et Morgan, 1981). Koenings (1976) a apporté une définition du Fe dissous plus rigoureuse: la fraction dialysable à travers une membrane semi-perméable de 0.005 μm (ce qui correspond à un poids moléculaire de 12 000 daltons). La taille des espèces de Fe organique et inorganique reconnues à ce jour apparaît au tableau 2.1.

Si la présence de composés de Fe labiles dans la colonne d'eau est déterminante pour la biodisponibilité du Fe, la concentration de ces composés doit être suffisamment élevée pour permettre un flux adéquat d'espèces biodisponibles. Outre les formes de Fe libre et les complexes inorganiques, les autres

TABLEAU 2.1. Taille approximative de différentes espèces de Fe dans les eaux naturelles (Stumm et Morgan, 1981).

ESPÈCES DE Fe	DIAMÈTRE (Å)	LIMITE D'EXCLUSION DU FILTRE (µm)
Fe libre: $\text{Fe}^{3+}(\text{aq})$, $\text{Fe}^{2+}(\text{aq})$	10	<0.001
Complexes inorganiques: FeOH^{2+} , $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$	"	"
Complexes organiques: Fe-EDTA, Fe-NTA, Fe-MOD	10-100	0.001
Colloïdes ferriques: $\text{Fe}(\text{OH})_3$, FeOOH , Fe_2O_3	<100-1000	0.005
Précipités: FeOOH polymérisé	>1000	0.2
MO particulaire (morte ou vivante)	"	"

Note: EDTA= éthylènediaminetétraacétate
NTA= acide nitrilotriacétique

espèces de Fe répertoriées au tableau 2.1 sont aussi susceptibles de participer à ce flux.

La MO est une composante de plusieurs de ces formes, notamment pour les complexes organiques et les colloïdes hydroxy-ferriques dispersés (MO adsorbée). Etant donné que la chimie du Fe inorganique ne permet pas d'expliquer les mécanismes qui entraînent sa biodisponibilité, le rôle potentiel joué par ces substances organiques doit être considéré.

La MOD peut augmenter la solubilité du Fe en participant directement ou indirectement à au moins quatre mécanismes non exclusifs: 1) la formation de complexes dissous avec des espèces ioniques, 2) la stabilisation du Fe colloïdal, 3) la dissolution photochimique des oxyhydroxydes de Fe et 4) le ralentissement de l'oxydation du Fe ferreux.

2.2.2 Chimie organique du Fe

Complexes de Fe-MOD dissous

Au laboratoire, dans des solutions synthétiques, les substances humiques (SH) peuvent former des complexes dissous avec le Fe (Schnitzer et Khan, 1972); il n'existe cependant aucune preuve concluante de l'existence de tels complexes dans les eaux naturelles. En effet, il est virtuellement impossible, avec les méthodes analytiques actuelles, de séparer les

microcolloïdes des complexes dissous¹; en conséquence, on ne peut qu'inférer l'existence de tels complexes. Par exemple, Perdue et al. (1976) ont observé des corrélations significatives entre la MOD et les teneurs en Fe et Al d'une rivière acide; ils ont conclu que ces complexes dissous existaient après avoir estimé que le rapport molaire MOD/(Fe + Al) était voisin de 1. Ce rapport a été estimé à partir du poids moléculaire moyen (1 269 daltons) de la MOD extraite de la rivière déterminé par osmométrie sous pression de vapeur. Plus récemment, Clair et Freedman (1986) ont obtenu des corrélations significatives entre le carbone organique dissous et le Fe dans trois ruisseaux acides en Nouvelle Ecosse.

Les SH sont des acides organiques polymères qui donnent une couleur brune aux eaux qui en sont chargées. Elles peuvent, par exemple, être extraites à l'aide d'une résine macroréticulaire XAD et être séparées en acides fulviques et humiques selon leur solubilité dans une solution à pH < 2. Les plus solubles, les acides fulviques, ont un poids moléculaire moyen entre 500 et 2000 daltons; les acides humiques, souvent sous forme colloïdale, ont un poids moléculaire variant entre 2000 et 5000 daltons, mais qui peut aussi atteindre 100 000 daltons (Thurman, 1985). Les acides humiques comme les acides fulviques ont des propriétés chélatrices reconnues (Schnitzer et Khan,

¹ Par rapport aux termes utilisés au tableau 2.1, le terme "microcolloïde" réfère à l'expression colloïde ferrique alors que le terme "complexe dissous" est associé aux expressions "complexes inorganiques" et "complexes organiques".

1972). Ces propriétés résultent surtout des groupements fonctionnels qui contiennent de l'oxygène, tels que, les COOH, les OH phénoliques et les groupements C=O (Stevenson, 1982). Ces groupements sont impliqués dans 86% des liaisons avec le Fe(III) (Schnitzer et Khan, 1972). D'autres caractéristiques des SH sont discutées à la section 2.3.2.

La réaction des métaux avec les SH n'entraîne pas toujours la solubilisation du complexe métal-MOD. Les acides organiques à haut poids moléculaire, tels que les acides humiques, sont plus susceptibles de précipiter que les acides fulviques de plus faible poids moléculaire et à degré d'acidité plus élevé (Stevenson, 1982). Les acides humiques et fulviques ionisés, mais non chélatés, adoptent une configuration "étalée" à cause de la répulsion des charges. Lorsque des ions métalliques sont ajoutés, la charge est réduite par la formation de liaisons O - métal; ceci entraîne un effondrement de la molécule et son hydrophilicité (et donc sa solubilité dans l'eau) s'en trouve diminuée (Stevenson, 1982).

2.2.3 Fe colloïdal

Aspects physico-chimiques

D'après Shapiro (1964) la capacité qu'ont les SH de prévenir la précipitation du Fe(III) s'explique mieux par la stabilisation des colloïdes que par la formation de complexes

solubles. La stabilisation des hydroxydes ferriques par la MOD préviendrait leur polymérisation excessive. Par ses expériences novatrices, Shapiro a, de plus, observé que même si le Fe était maintenu en solution apparente en présence de SH, une part importante du Fe filtrable ($<0.2 \mu\text{m}$) était retenue par un filtre de $0.1 \mu\text{m}$.

La plupart des auteurs ont ultérieurement proposé que la plus grande part du Fe filtrable est dans un état colloïdal stabilisé par de la MOD (Boyle et al., 1977; Sholkowitz et al., 1978; Moore et al., 1979; Florence et Batley, 1980; Florence, 1982; Cameron et Liss, 1984). Le mécanisme proposé consiste en la formation de complexes avec les ions de Fe à la surface du colloïde; ce dernier est alors enrobé d'une couche protectrice d'acides humiques, ce qui prévient toute polymérisation subséquente (Davis et Leckie, 1978). Le Fe est alors maintenu dans la colonne d'eau sous forme de fine particules colloïdales.

Les résultats obtenus par Tipping et Ohnstad (1984), à l'aide de particules d'hématite synthétique (Fe_2O_3) enrobée de SH extraites d'un lac dulcicole, ont montré qu'aux concentrations de particules dans le lac étudié (10^{10} - 10^{11} particules $\cdot\text{L}^{-1}$) les forces opposées de l'attraction de Van der Waals et de la répulsion électrostatique contrôlaient la stabilité de ces colloïdes ferriques. Plus tôt, Tipping et Cooke (1982) avaient montré que les SH adsorbées conféraient une charge négative à la surface de particules de goethite

(α -FeOOH). Les SH améliorent la stabilité des colloïdes uniquement par effet électrostatique; cependant, dans des eaux plus riches en matières humiques, un effet dû à la conformation stérique des molécules pourrait aussi être important (Tipping et Higgings, 1982; Tipping et Ohnstad, 1984).

Biodisponibilité

Harvey (1937) a suggéré que le Fe colloïdal pourrait être directement utilisé par le phytoplancton. Aujourd'hui, il apparaît peu probable que cette hypothèse soit vraie. Il appert plutôt que la prise en charge du Fe implique des formes chimiques spécifiques, à savoir les formes ioniques dissoutes Fe^{3+} (Anderson et Morel, 1982) et Fe^{2+} (Schenck et al., 1988), les hydroxo-complexes $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ et $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ (Schenck et al., 1988), ainsi que des complexes organiques très spécifiques au Fe^{3+} (sidérophores, section 2.3.2) (Neilands, 1973; Trick et al., 1983a, b).

Wells et al. (1983) ont considéré que la biodisponibilité du Fe colloïdal dépendait de sa capacité de se dissoudre à une vitesse adéquate. Ils ont comparé les réponses de croissance de l'algue marine *Thalassiosira pseudonana* à différentes sources de Fe. Le colloïde d'hydroxyde de Fe frais a produit de meilleures réponses de croissance que, soit les formes plus cristallisées de la goethite et de l'hématite, soit les formes obtenues après le vieillissement ou le chauffage de l'hydroxyde ferrique frais.

Ils en ont conclu que la capacité du Fe colloïdal à fournir suffisamment de Fe biodisponible réside dans sa stabilité thermodynamique (laquelle déterminerait son taux de dissolution).

En conséquence, si, d'une part, les complexes de Fe dissous ou encore les colloïdes stabilisés permettent l'accès à du Fe potentiellement disponible et que, d'autre part, seules les formes ioniques sont directement disponibles, dès lors les colloïdes doivent d'abord se dissoudre et les complexes se dissocier avant que le Fe ne soit assimilé par les algues.

2.2.4 Dissolution et dissociation photochimique des complexes et des colloïdes de Fe

Anderson et Morel (1982) ont suggéré que la photodégradabilité de certains chélateurs aminocarboxylates pouvait expliquer les vitesses de prise en charge plus élevées déterminées en présence du CDTA-Fe (CDTA: trans-1,2-diaminocyclohexanetetraacétate) et du EDTA-Fe (EDTA: éthylènediaminetetraacétate) par la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*. Ils ont expliqué que l'absence de prise en charge notée avec le puissant chélateur EDDHA (éthylènediaminedi(o-hydroxyphenylacétate)) et le sidérophore bactérien desferrioxamine-B était due à la résistance de ces chélateurs à la photodégradation. De même, Finden et al. (1984) ont observé que, parmi diverses sources de Fe, le complexe

Fe(III)-desferrioxamine résistait à la photodégradation et, par conséquent, ne pouvait pas soutenir la croissance de l'algue d'eau douce *Monoraphidium*.

La susceptibilité des colloïdes de Fe(III) à la photodégradation (photodissolution et photodissociation) est appuyée par les résultats de Wells et al. (1983) et par le fait que plusieurs complexes organiques et inorganiques peuvent être photodégradés (Balzani et Carassiti, 1970). La photodissolution réfère à la solubilisation photochimique de colloïdes et de particules, alors que l'expression photodissociation est utilisée pour la dissociation photochimique des complexes. Ces processus impliquent la réduction du Fe(III) et la libération subséquente du Fe(II) sous l'influence de la lumière.

La présence de la MOD accélère le processus de photodégradation, présumément à cause de certaines composantes de la MOD qui contiennent des groupements chromophores, lesquels peuvent absorber l'énergie lumineuse efficacement (Zafirioiu, 1983). La plupart des expériences de photodégradation ont été conduites à faible pH afin, premièrement, de reproduire les conditions qui prévalent dans certains lacs acides ou humiques où ce phénomène a été observé (par ex. Collienne, 1983) et, deuxièmement, parce que la vitesse de la réaction diminue avec un accroissement du pH (Trott et al., 1972). D'ailleurs Collienne (1983), en exposant une solution standard de Fe(III) à une lampe UV, a observé une photoréduction uniquement à des pH

inférieurs à 5.5. Selon Langford et al. (1973), une augmentation du pH entraînerait la formation de ponts oxo, lesquels agiraient comme des atténuateurs de photoréduction surtout à des concentrations élevées de complexes métalliques. Miles et Brezonik (1981) ont observé que le Fe(III) était réduit rapidement à pH acide (3.8) en présence de MOD naturelle; ils ont démontré que la lumière peut accélérer ce processus par le mécanisme suivant: le complexe Fe(III)-SH est réduit à la lumière (cette réduction est beaucoup plus lente à l'obscurité) par un transfert de charge du ligand au métal, comme suggéré par Langford et al. (1973), ce qui facilite la dissociation du complexe Fe(II)-SH.

Waite et Morel (1984b) ont examiné la photodissolution de la lépidocrocite (γ -FeOOH) colloïdale en conditions dulcicoles et marines. Ils ont observé que la vitesse de photodissolution initiale était significativement stimulée aux pH 4 et 6.5 par la présence d'acides citrique ou fulvique adsorbés à la surface du colloïde. Toutefois, une vitesse constante de photodissolution ne pouvait être observée qu'à pH 4 (durant une période expérimentale de 165 min). A un pH plus élevé (6.5), la vitesse de réaction diminuait progressivement avec le temps de photolyse. Waite et Morel n'ont observé aucune photodissolution à pH 8.2 malgré la présence d'acide fulvique ou citrique; ils ont expliqué l'influence du pH à la fois par la diminution de la photolabilité des groupements Fe-MOD de surface (suite à leur photodégradation continue) et par les rétro-réactions

(initiées par l'oxydation du Fe^{2+} , donc directement reliées au pH). Le résultat de ces deux processus serait de diminuer la concentration des espèces de Fe libres en solution à un pH plus élevé.

Par ailleurs, l'irradiation des acides fulviques conduit à la production de peroxyde d'hydrogène (Cooper et Zika, 1983) à un taux qui s'accroît avec le pH (Waite et Morel, 1984b). Cet agent oxydant puissant peut, en favorisant les rétro-réactions, augmenter le taux d'oxydation du Fe(II) et ainsi compétitionner efficacement avec les réactions de complexation Fe-SH.

Les substances organiques qui ont des structures similaires à celles des SH peuvent contrôler les rétro-réactions en réduisant la vitesse d'oxydation du Fe ferreux (Theis et Singer, 1974; Miles et Brezonik, 1981), ceci pouvant s'effectuer vraisemblablement par la formation de complexes Fe(II)-MOD. Par exemple, Waite et Morel (1984b) ont même observé que l'acide citrique offrait une meilleure protection contre les effets du pH sur la photodissolution que l'acide fulvique. Ils ont aussi noté l'importance de l'origine de l'acide fulvique en observant qu'à des sources d'acides fulviques de même concentration mais d'origine différente correspondaient des vitesses de photoréaction différentes.

Paradoxalement, certains chélateurs de Fe(III) peuvent accélérer le taux d'oxydation du Fe(II) (Stumm et Morgan, 1981).

Si les conditions chimiques (pH, concentration des réactifs) sont telles que le taux d'oxydation du Fe(II) est lent relativement au taux de réduction du Fe(III) par la MO, une concentration relativement élevée de Fe(II) peut être maintenue tant que la MO n'est pas complètement oxydée (Theis et Singer, 1974).

Contrairement à Waite et Morel (1984b), Finden et al. (1984) ont observé le phénomène de la photodissolution à un pH élevé (8.15). Ces derniers ont aussi montré que cette photodissociation était biologiquement significative; en effet, ils ont obtenu une meilleure réponse de croissance chez des cultures de *Monoraphidium* auxquelles on avait fourni du Fe sous la forme d'un co-précipité Fe-SH synthétique que chez une culture parallèle où le Fe était fourni sous forme de ferrihydrite ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) vieilli dans les mêmes conditions. Ils ont expliqué ces résultats par le fait que les SH maintenaient la susceptibilité du Fe(III) à la photoréduction et ainsi favoriserait la biodisponibilité du Fe. Les résultats contradictoires apportés par les travaux de Waite et Morel (1984) et Finden et al. (1984) sont discutés plus loin.

La présence de substances organiques ne semble toutefois pas toujours essentielle. Wells et al. (1983) ont relié la prise en charge du Fe par les algues à la photodissolution des colloïdes d'(oxy)hydroxydes de Fe en absence de MO à pH 8. Finden et al. (1984) ont observé une photoréduction

significative de ferrihydrite frais en absence de substances organiques à pH 8.15, mais une réduction négligeable à l'obscurité ou avec du ferrihydrite vieilli. Ces résultats sont cependant différents de ceux obtenus par Waite et Morel (1984b) toujours en absence de MO: ces chercheurs ont déterminé une vitesse de dissolution très lente pour des oxydes de Fe amorphes (FeOOH) à pH 4, une photodissolution négligeable à pH 6.5 et pratiquement nulle à pH 8.2. Pour sa part, Collienne (1983) a montré que si la lumière est nécessaire au processus de réduction qui se produit dans la particule elle-même, la MO, elle, stimule la photoréduction lorsque les conditions d'éclairement sont faibles.

La comparaison des résultats entre ces différentes expériences est compliquée par les conditions non standardisées utilisées dans chaque cas (tableau 2.2). Certains résultats, obtenus en absence de MO, apparaissent même contradictoires entre eux et peuvent vraisemblablement s'expliquer par l'état thermodynamique des colloïdes ferriques préparés lors de chaque expérience: Wells et al. (1983) ont d'ailleurs montré comment le degré de vieillissement du colloïde pouvait affecter sa photolabilité. Le choix des méthodes utilisées pour la préparation des colloïdes est critique, en regard de la concentration de Fe, du pH et du temps de vieillissement. Ces paramètres sont différents d'une expérience à l'autre et peuvent

TABLEAU 2.2. L'effet de la préparation et des conditions expérimentales sur la photolabilité et biodisponibilité du Fe.

A) sans MOD

Préparation et conditions expérimentales	Observations	Références
produit: γ -FeOOH (lepidocrocite)		
hv: 50 000 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
source: Fe(II)		
vieillessement non mentionné		
pH 4.0	photoréduction faible	Waite et Morel (1984b)
pH 6.5	pas de photoréduction	idem
pH 8.2	photoréduction négligeable	idem
produit: Fe(OH) ₃		
hv: 95 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
pH 8.0		
ajout frais	pas d'inhibition	Wells et al (1983)
vieilli 1 sem	pas d'inhibition	idem
vieilli 3 mois	inhibition de croissance	idem
produit: Fe ₂ O ₃ ·9H ₂ O (ferrihydrite)		
hv: 216 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
pH 8.15		
vieilli 4 mois	inhibition de croissance pas de photoréduction	Finden et al. (1984)
ajout frais	bonne croissance photoréduction élevée	idem

B) avec MOD

Préparation et conditions expérimentales	Observations	Références
produit: γ -FeOOH (lepidocrocite)		
hv: 50 000 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
source: Fe(II)		
+ acide fulvique pH 4.0	forte photoréduction	Waite et Morel (1984b)
pH 6.5	faible " "	idem
pH 8.2	photoréduction négligeable	idem
+ acide citrique pH 4.0	forte photoréduction	Waite et Morel (1984a)
pH 6.5	photoréduction modérée	idem
pH 8.2	" " négligeable	idem
produit: Fe-SH (co-précipité)		
hv: 216 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
pH 8.15		
vieilli 4 mois	bonne croissance	Finden et al. (1984)
	photoréduction modérée	

expliquer les différentes réponses obtenues. En effet, Crosby et al. (1983) ont observé que le temps de vieillissement affectait à la fois la porosité (taille des pores) et l'aire à la surface des colloïdes ferriques, deux propriétés contrôlant leur degré d'adsorption. Ils ont de plus mis en évidence des différences importantes dans la morphologie, la surface et la nature cristalline entre des colloïdes préparés à partir de Fe(II) et ceux obtenus à partir de Fe(III). Des différences de ce type peuvent certainement affecter la photodissolution.

D'autres désaccords sont évidents dans la littérature pour des expériences réalisées en présence de SH. A titre d'exemple, aucune photodissolution n'a été observée à pH 8.2 par Waite et Morel (1984b) alors qu'une photodissolution significative a été observée à pH 8.15 par Finden et al. (1984). Les rapports de masse MOD-Fe ne peuvent être responsables de cette contradiction puisque le rapport acide fulvique/Fe lors de l'expérience de Waite et Morel (1984b) était de l'ordre de 36 et le rapport SH/Fe lors du travail de Finden et al. (1984) était seulement de 2. Trois explications peuvent être apportées: 1) les SH utilisées par Finden et al. (1984) avaient une meilleure capacité de former des complexes protecteurs avec les groupements oxydables des colloïdes ferriques: rappelons que Waite et Morel (1984b) avaient obtenu différents taux de réduction d'oxydes ferriques qu'ils ont reliés aux différentes capacités réductrices des deux sources d'acides fulviques auxquelles le Fe était exposé; 2) la nature cristalline des

colloïdes ferriques est différente, tel que mentionné précédemment; 3) la force ionique (I) du milieu expérimental n'est pas la même. Les expériences de Waite et Morel (1984b) ont été menées à $I = 0.1$ M, soit des conditions de milieux marins, alors que les expériences de Finden et al. (1984) étaient réalisées à $I = 0.02$ M soit des conditions analogues à celles des eaux douces. Il est bien connu que la formation des complexes métaux-SH diminue avec un accroissement de I à cause de la compétition induite par les concentrations élevées des cations majeurs (Ca^{2+} et Mg^{2+}) et de l'effet de I sur les coefficients d'activité (γ).

En résumé, la MOD peut agir à trois niveaux: premièrement, elle peut participer à la photoréduction des oxyhydroxydes ou autres oxydes de Fe en fournissant un électron au Fe(III); deuxièmement, elle peut réduire les rétro-réactions d'oxydation en formant des complexes dissous avec le Fe(II) et, troisièmement, elle peut prévenir la coagulation en stabilisant les groupements hydrolysables à la surface des colloïdes.

2.3 AGENTS COMPLEXANTS ET BIODISPONIBILITÉ DU Fe

2.3.1 Chélateurs artificiels

L'effet positif des chélateurs artificiels sur la croissance des algues en milieux de culture a longtemps été attribué à leur effet sur la biodisponibilité du Fe. Johnston

(1964) a proposé que l'ajout d'EDTA pouvait stimuler la croissance d'algues marines en augmentant les vitesses de dissolution du Fe particulaire et des formes non ionisées. Il a aussi mentionné que la chélation du Fe pouvait augmenter la concentration du Fe dissous, favoriser l'apport en Fe échangeable à la membrane cellulaire et affecter l'équilibre d'oxydo-réduction du Fe et de certains autres métaux à l'état de traces.

Ces hypothèses ont été appuyées par les travaux de Lewin et Chen (1971), qui ont observé qu'un ajout d'EDTA était suffisant pour rendre disponible le Fe devenu non disponible après passage à l'autoclave. Ils ont aussi noté qu'il semblait y avoir une limite à cette propriété de l'EDTA: aucun effet n'a été signalé lorsque l'EDTA était ajouté à un milieu vieilli durant onze jours, ce qui pourrait être un résultat du changement de l'hydroxyde ferrique en un allotrope plus réfractaire. Ces mêmes auteurs (Lewin et Chen, 1973) ont testé l'effet de l'EDTA sur l'augmentation du compartiment de Fe particulaire dans des échantillons d'eaux marines cotières emmagasinés à plus ou moins long terme; ils ont rapporté qu'une addition initiale de chélateur a empêché la formation de particules à partir du Fe-filtrable ($<0.45 \mu\text{m}$).

De Haan et al. (1985) ont étudié l'effet de l'EDTA sur la biodisponibilité de deux sources de Fe pour une algue cultivée dans un milieu de culture synthétique. Les deux sources

étaient: (1) Fe frais fourni sous forme de $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ et (2) particules de Fe extraites d'un lac des Pays Bas. Ils ont attribué les différences observées dans les constantes de demi-saturation (Ks) obtenues en chémostat à la différence de taille des particules de Fe des deux milieux de culture: le Ks du premier milieu était de $36 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (colloïdes provenant du lac; tailles des particules entre 10-35 nm), soit approximativement trois fois plus élevé que le Ks observé dans le deuxième milieu, $12 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (Fe originant du $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; taille des particules non précisée, mais probablement <10 nm). Ces auteurs conclurent 1) que l'addition de l'EDTA n'était pas suffisante pour rendre le Fe colloïdal du lac aussi disponible que le Fe fraîchement ajouté, 2) que la vitesse de photodissolution (si elle a eu lieu) n'était pas suffisante pour éliminer l'effet de la taille des particules et 3) que la croissance serait limitée par la cinétique de dissolution des particules (qui serait inversement proportionnelle à leur taille). L'EDTA pourrait donc contrôler la taille des particules et la spéciation du Fe. Signalons que ce que ces auteurs interprètent comme étant un effet de la taille des particules peut aussi être interprété comme étant un effet de la stabilité thermodynamique ou du degré de vieillissement de ces particules.

Anderson et Morel (1982) ont étudié l'effet de différents chélateurs sur les vitesses de prise en charge du Fe. La prise en charge du Fe radio-actif à l'obscurité a montré une tendance marquée à augmenter avec la diminution des constantes de

stabilité des quatre agents chélateurs aminocarboxyliques étudiés (ordre de stabilité: NTA-Fe(III) < EDTA-Fe(III) < DPTA-Fe(III) < CDTA-Fe(III)); en général, la vitesse de prise en charge augmentait également en fonction de la concentration calculée du Fe^{3+} . La lumière a affecté les vitesses de prises en charge seulement dans le cas des chélates Fe-EDTA et Fe-CDTA; celles-ci augmentaient de deux à six fois en présence de lumière, probablement en raison de la photoréduction. Aucune stimulation de la vitesse de prise en charge à la lumière n'a été mesurée avec le NTA (acide nitrilotriacétique), lequel n'a pas montré de sensibilité à la photodégradation, et le DTPA (diéthylènetriaminepentaacétate) lequel en a montré. Ceci indique que 1) les chélateurs ne sont pas tous également photodégradables, 2) la photodissolution n'est pas toujours essentielle, puisque dans le cas du NTA, les vitesses de prise en charge maximales étaient déjà atteintes à l'obscurité et 3) les produits de la photodégradation peuvent former des complexes réfractaires avec le Fe: ceci expliquerait l'absence de stimulation à la lumière avec le DTPA. Ces conclusions pourraient aussi s'appliquer aux travaux réalisés avec des chélateurs naturels. Ces aspects seront élaborés à la section suivante (2.3.2).

Auparavant, Jackson et Morgan (1978) avaient présenté une discussion théorique contre l'idée que les chélateurs favorisent la croissance en rendant le Fe plus disponible en milieu marin. En s'appuyant sur des relations d'équilibre et sur les données

cinétiques disponibles, ils ont soutenu que les vitesses de dissolution calculées pour le Fe(III)-EDTA sont de plusieurs ordres de grandeur plus lentes que le flux diffusif de l'espèce non chélatée dominante, le $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, vers la cellule. Ils ont aussi rejeté la possibilité que la cinétique d'échange de ligands ($\text{Fe-EDTA} = \text{Fe-Ligand}$ à la surface de la cellule) limite l'approvisionnement en Fe(III) à la cellule. Ceci, parce que l'ordre dans lequel se rangeaient les flux calculés de Fe^{3+} vers les cellules à partir des complexes de Fe-NTA et de Fe-EDTA ne correspondait pas à l'efficacité relative du NTA et de l'EDTA à stimuler la croissance du phytoplancton. Ils ont donc proposé que les stimulations de croissance observées par de nombreux chercheurs étaient plutôt dues à la diminution de l'activité de l'ion Cu^{2+} présent dans leurs milieux suite à l'ajout d'un chélateur à de l'eau de mer. Toutefois, on a souvent rapporté une stimulation de croissance lorsque de l'EDTA était ajouté à des milieux de cultures synthétiques, ou encore lorsque le Fe-EDTA était ajouté à des échantillons de la mer des Sargasses (Subba Rao et Yeats, 1984) en présence de concentrations reconnues non toxiques de Cu^{2+} . De plus, Anderson et Morel (1982) ont observé les vitesses de prise en charge de Fe les plus élevées en présence d'agents chélateurs à la lumière, ce qui indique que la photolabilité des chélates de Fe peut significativement augmenter le flux diffusif des espèces de Fe biodisponibles. Jackson et Morgan (1978) n'ayant pas considéré la photodissolution, leurs calculs des flux sont donc des sous-estimations de la véritable disponibilité du Fe chélaté. Leur

conclusion sur l'importance dominante de la toxicité du Cu reste donc hypothétique.

En général, l'effet des chélateurs serait de créer un compartiment additionnel de Fe dans la colonne d'eau. Quoique ce compartiment ne soit vraisemblablement pas directement disponible (sous réserve du cas des sidérophores, section 3.2), il peut fournir des espèces de Fe ioniques au phytoplancton par dissociation, un processus qui pourrait être significativement accéléré par la photoréduction (section 2.2). Les chélateurs puissants comme l'EDTA sont particulièrement efficaces à cet égard. Ils peuvent former des complexes dissous aux dépens des (oxy)hydroxydes amorphes, lesquels seraient autrement non disponibles pour le phytoplancton, à moins de pouvoir se dissoudre directement. Une telle dissolution directe peut se produire, mais à des vitesses réduites et seulement avec des colloïdes relativement frais.

2.3.2 Chélateurs naturels et considérations écologiques

Les chélateurs synthétiques chimiquement bien définis ont apporté des informations sur les mécanismes impliqués dans la biodisponibilité du Fe. On peut se demander dans quelle mesure ces connaissances peuvent s'appliquer aux milieux naturels sachant que certains composés organiques naturels peuvent former des complexes et sont photo-actifs.

Puisque les substances organiques naturelles sont variées et se trouvent parmi un mélange hétérogène de composés, souvent et individuellement à des niveaux de traces, il est difficile de les caractériser. Ces composés ne possèdent évidemment pas tous des propriétés de complexation; les SH sont les plus susceptibles de montrer ces propriétés.

Les SH représentent entre 50 et 75% du carbone organique dissous dans la plupart des eaux naturelles (Reuter et Perdue, 1977; Thurman, 1985). Outre les réactions de complexation, la majorité des réactions d'oxydo-réduction de la MO dans l'eau sont également dues aux substances humiques (Miles et Brezonik, 1981; Skogerboe et Wilson, 1981; Cooper et Zika, 1983). En général, les acides fulviques, lesquels sont de 5 à 20 fois plus concentrés que les acides humiques dans les eaux naturelles, ont un plus grand potentiel réducteur que les acides humiques, lequel a tendance à augmenter à pH faible (Thurman, 1985).

Les propriétés chimiques et la taille moléculaire des SH dépendent surtout de leur origine (ex: eaux de lixiviation des sols; produits métaboliques; résidus de la dégradation de la matière végétale). Par exemple, elles possèdent différentes propriétés d'adsorption, un facteur partiellement relié à leur poids moléculaire (Malcolm et McCarthy, 1986) et différentes structures photo-actives. Les relations entre les caractéristiques structurelles des acides humiques (groupements fonctionnels, dispositions stériques, conformations) et leurs

propriétés chimiques spécifiques sont cependant encore obscures et pourraient contribuer à fournir des explications aux données apparemment contradictoires des expériences sur la photodissolution (section 2.2.4). De plus, à cause de l'hétérogénéité des propriétés des SH (Malcolm et MacCarthy, 1986) et jusqu'à ce qu'une meilleure caractérisation des structures moléculaires et des groupements fonctionnels des SH soit atteinte, les résultats obtenus avec une source de SH ne pourront être appliqués que de manière spécifique.

Les sidérophores, contrairement aux autres substances organiques naturelles, sont spécifiquement produits par des microorganismes pour faciliter l'assimilation du Fe. Ce sont des chélateurs organiques naturels ayant une forte spécificité pour le Fe(III) et capables de solubiliser le Fe à partir d'agrégats d'hydroxydes ferriques (Neilands, 1973). De plus, les sidérophores peuvent compétitionner efficacement avec des agents complexants plus faibles tels que les acides humiques (Murphy et al., 1976; Bailey et Taub, 1980; Neilands, 1981). Ils sont produits par des prokaryotes comme certaines bactéries et certains cyanophytes (Murphy et al., 1976) et par quelques eukaryotes (Trick et al., 1983a, b). Selon Murphy et al. (1976) la production de ces agents par les cyanophytes peut leur permettre de supplanter certaines algues eukaryotes en séquestrant le Fe disponible.

Des variations dans la structure des sidérophores pourraient expliquer l'incapacité pour certains clones ou espèces d'utiliser les sidérophores produits par d'autres (Leong, 1986). D'autres facteurs tels que les constantes d'équilibre de certains sidérophores pour le Fe, la quantité produite et l'efficacité que possède chaque espèce ou clone pour assimiler le complexe Fe-sidérophore pourraient déterminer quelles espèces seront dominantes dans les milieux pauvres en Fe (Leong, 1986). Il est généralement accepté que les microorganismes producteurs de sidérophores peuvent assimiler le complexe Fe-sidérophore en entier, lequel se dissocie à l'intérieur de la cellule (Neilands, 1974); cependant, il n'existe pas d'indications que ce mécanisme soit restreint à ces organismes.

La production de sidérophores n'est pas la seule adaptation à la limitation de Fe. Harrison et Morel (1986) ont observé un mécanisme par lequel la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii* augmente de quelques centaines de fois à court terme son taux de prise en charge, probablement par une augmentation du nombre de sites porteurs. La production de sidérophores, tout comme l'augmentation du nombre de sites porteurs, représente des coûts métaboliques importants. Dans cette perspective, on s'attendrait à ce que ces adaptations physiologiques deviennent importantes uniquement dans les cas où le flux de Fe biodisponible ne peut pas être assuré par la contribution des mécanismes chimiques comme la dissolution.

En résumé, mentionnons que le comportement biogéochimique du Fe est caractérisé par: 1) l'existence de deux états d'oxydation avec des propriétés chimiques très différentes; 2) l'affinité de l'état d'oxydation le plus élevé (Fe(III)) pour les ligands organiques et inorganiques (de sorte que plusieurs de ses complexes sont susceptibles de jouer un rôle écologique important, ce qui n'est pas le cas pour de nombreux autres métaux qui existent sous forme libre, non complexée); 3) la lenteur relative des réactions d'oxydation (Fe(II) \rightarrow Fe(III)) et des réactions de précipitation/dissolution, c'est-à-dire l'importance pour comprendre la biodisponibilité du Fe de prendre en compte des considérations d'ordre cinétique plutôt que thermodynamique; et 4) le rôle joué par les réactions photochimiques et microbiologiques dans les changements d'état d'oxydation.

2.4 MODÈLE CONCEPTUEL

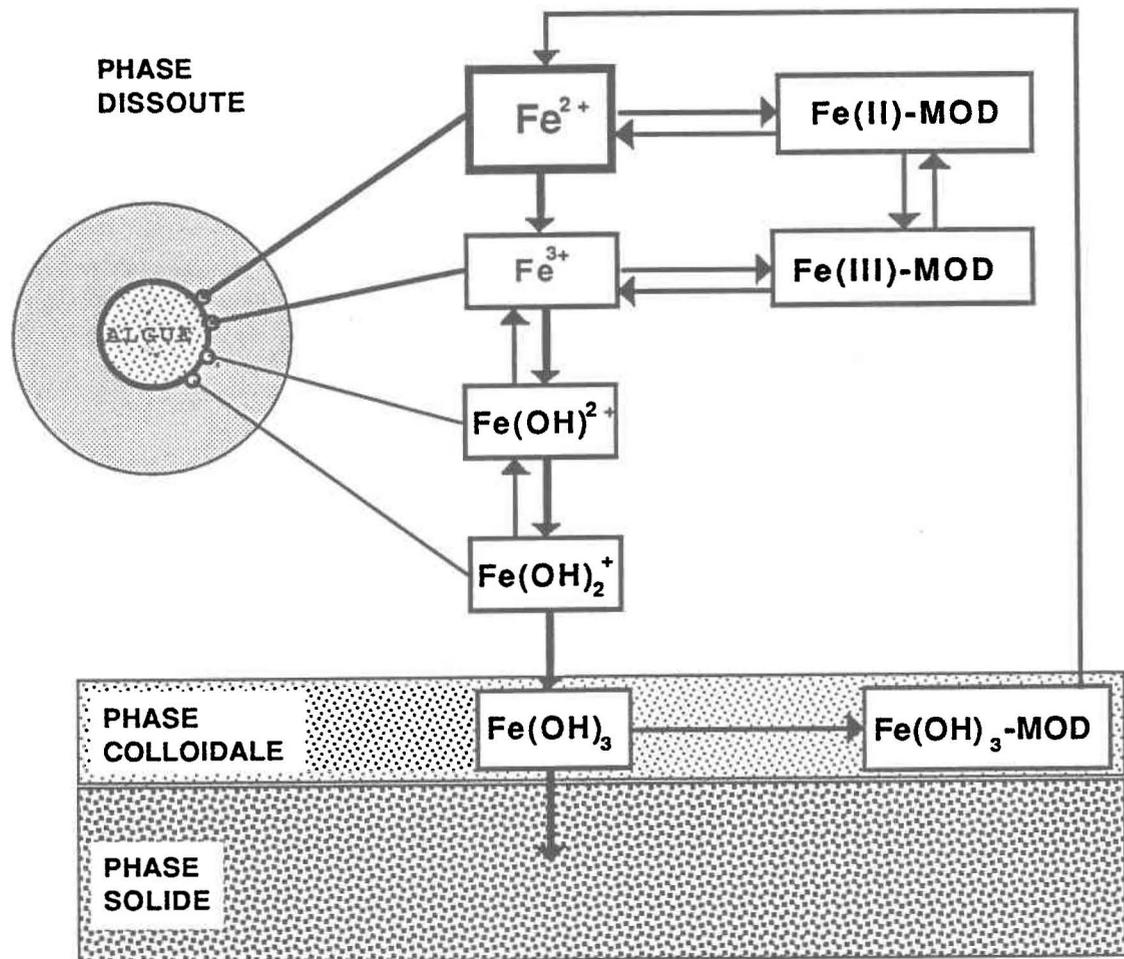
Afin de résumer et d'intégrer les différents concepts puisés dans la littérature, on peut proposer une représentation simplifiée du cycle géochimique du Fe dans les eaux naturelles oxygénées (fig. 2.1). Le modèle fournit des indications sur la complexité du système, quoiqu'il ne rende compte que des processus qui ont été discutés précédemment; il ne tient pas compte des stratégies d'adaptation développées par les cellules pour s'approprier le Fe nécessaire à leur métabolisme comme la

production de sidérophores. Le modèle considère une phase solide, une colloïdale et une dissoute.

La phase **solide** comprend les espèces de Fe qui sont normalement inaccessibles au phytoplancton: la plus grande partie du Fe est sous cette forme. Il s'agit de précipités et d'hydroxydes et oxydes de Fe polymérisés, thermodynamiquement très stables, considérés ici comme étant biologiquement inactifs et pouvant être isolés par filtration sur une membrane à porosité de 0.2 μm (tableau 2.1). La durée de présence de ces composés dans la colonne d'eau dépendra de leur taux de sédimentation. Une fois déposés sur le fond du plan d'eau, un faible potentiel rédox peut initier la remise en solution du Fe sous forme d'espèces de Fe(II) dissous. Par ailleurs, les co-précipités MOD-Fe sont sensibles à la photodissolution durant leur séjour dans la zone pélagique, sous certaines conditions physico-chimiques, tel que Finden et al. (1984) l'ont démontré.

La phase **colloïdale** est constituée surtout par des hydroxydes de Fe modérément polymérisés, stabilisés ou non par la MOD. Cette phase est biologiquement active à cause de sa susceptibilité à la photoréduction laquelle résulte en une production de Fe^{2+} . Le rôle de la MOD est d'augmenter le taux net de photodissolution (Waite et Morel, 1984a, b). L'importance de la MOD est accrue à des pH modérément alcalins (pH 7-9); en effet,

Figure 2.1. Modèle conceptuel du cycle du Fe dissous dans les eaux naturelles.



les rétro-réactions d'oxydation sont de plus en plus favorisées si leur vitesse n'est pas freinée par la MOD. Considérant qu'une grande partie du Fe disponible est sous forme colloïdale, ce mécanisme de production de Fe^{2+} pourrait être d'une grande importance écologique, particulièrement dans les lacs neutres ou légèrement alcalins.

La phase **dissoute** est essentiellement constituée par des formes ou des composés de nature transitoire, lesquels existent en concentration absolue très faible; le flux des formes biodisponibles transite principalement par cette phase. Schenck et al. (1988) ont observé des vitesses de prise en charge presque'identiques pour les deux états d'oxydation, II et III, à un pH de 5 et à une concentration totale en Fe de $0.1 \mu\text{M}$. Toutefois, on ignore toujours sous quel état d'oxydation le Fe est pris en charge. Anderson et Morel (1982) ont suggéré que seul le Fe^{3+} était assimilé; d'après leur hypothèse le transport du Fe s'effectuerait avec le concours d'un transporteur similaire à la transferrine et la transferrine complexerait spécifiquement le Fe^{3+} . Ils s'appuyaient sur leur observation que la présence d'agents séquestrateurs spécifiques au Fe(II) n'a pas réduit significativement la prise en charge du Fe chez *Thalassiosira weissflogii*. Cette question, qui n'est pas sans intérêt au niveau de la connaissance fondamentale, est ici d'importance secondaire, puisque si le Fe se présente sous la forme ferreuse il est prévisible qu'il soit oxydé après avoir

pénétré dans la micro-couche de diffusion où le pH et la pO_2 sont plus élevés. Par contre, selon les travaux de Jones et al. (1987) certaines espèces phytoplanctoniques seraient en mesure de produire les enzymes nécessaires pour réduire certains métaux, dont le Fe, au niveau de la membrane cytoplasmique. Il est donc moins important de savoir sous quel état d'oxydation le Fe se présente aux cellules que de savoir si le flux de Fe en solution est adéquat. De plus, il existe de bonnes indications à l'effet que les hydroxo-complexes du Fe contribuent au flux du Fe(III) en solution vers les cellules assimilatrices (Schenck et al. 1988).

Malgré toute cette complexité, l'espèce pivot demeure le Fe^{2+} ; son activité affectera la vitesse d'assimilation directement ou après son oxydation en Fe^{3+} ou son hydrolyse en hydroxo-complexe. Ici encore, la MOD joue un rôle important, car elle entre en compétition avec l'hydrolyse en formant des complexes avec le Fe(II) ou le Fe(III). Le complexe Fe(III)-MOD peut aussi apporter du Fe^{2+} au système par photodissociation.

En résumé, le système global n'atteint pas l'équilibre, mais se caractérise plutôt par une compétition entre plusieurs réactions concomitantes. Tel que suggéré par Jackson et Morgan (1978), si le Fe(III) est à l'origine sous forme complexée, en tant que complexes à la surface de colloïdes ou comme complexes dissous, sa conversion en un précipité sera lente et la cinétique de la réaction de dissociation des-dits complexes

contrôlera la vitesse de prise en charge par les algues. A cet égard, le rôle de la MOD sera d'importance capitale, spécialement par son effet sur l'équilibre chimique des réactions d'oxydation du Fe(II), de photo-réduction, de photo-dissolution et de polymérisation. Le degré avec lequel la MOD affectera ces réactions dépend des mêmes facteurs qui affectent la complexation du Fe: le pH, la force ionique, la nature de la MOD et les facteurs qui affectent la photo-dissolution. Le modèle proposé met l'accent sur l'importance des espèces transitoires en tant que source majeure de Fe pour le phytoplancton. Il est donc probable que la cinétique de dissolution contrôle le flux des espèces de Fe biodisponible et, par conséquent, la vitesse de prise en charge. Plus précisément, les réactions qui contrôlent la vitesse de prise en charge seraient celles que produisent le Fe^{2+} le plus efficacement. En se basant sur les découvertes de Waite et Morel (1984a, b, c) et sur le fait que le Fe se trouve surtout sous la forme colloïdale dans les eaux naturelles, on peut supposer que cette réaction sera la photodissolution des colloïdes de Fe stabilisés par la MOD.

MATÉRIEL ET MÉTHODES GÉNÉRALES

Ce chapitre décrit les techniques de base utilisées dans les expériences présentées aux chapitres 4, 5 et 6. Cependant, dans chacun de ces chapitres on détaillera à la section "matériel et méthodes" les techniques particulières employées.

3.1 Origine de la matière organique dissoute (MOD)

La MOD utilisée dans les expériences décrites ici provenait d'échantillons de l'effluent secondaire de la station d'épuration des eaux résiduaires domestiques de la base militaire de Valcartier, située à quelques kilomètres au nord de la ville de Québec. Cette station d'épuration utilise un traitement secondaire conventionnel avec des boues activées. Chaque échantillon était prélevé à la sortie du décanteur secondaire avant chloration.

3.2 Ultrafiltration et diafiltration

Des techniques d'ultrafiltration ont été utilisées pour séparer la MOD en différentes fractions sur la base de leur poids moléculaire. Les fractions de MOD ont été extraites dans une cellule à ultrafiltration d'une capacité de 2 L (Amicon) avec des membranes Diaflo_R (Amicon) XM100A, YM10 et YM2, soumises à une pression de N₂ et sous agitation continue. Les membranes Diaflo sont reconnues pour leur faible capacité d'adsorption des métaux et leur résistance au colmatage lorsqu'elles sont utilisées avec des solutions faiblement chargées en C organique (Buffle et al., 1978). Le tableau 3.1 donne les seuils d'exclusion et les conditions d'utilisation des membranes. Il est important de mentionner qu'aucune membrane d'ultrafiltration ne peut retenir un composé sur l'unique critère de son poids moléculaire, puisque la forme stérique de la molécule est un facteur déterminant de rétention pour ces membranes (Ogura, 1974).

Avant d'être utilisées les membranes étaient trempées pendant une nuit dans une solution de NaCl (1-2 M) et rincées avec 1 L d'eau ultrapure (Milli-Q, Millipore). En effet, Wilander (1972) a observé qu'un simple rinçage à l'eau distillée

TABLEAU 3.1. Caractéristiques des membranes d'ultrafiltration utilisées dans cette étude.

Filtre	XM100A	YM10	YM2
Seuil d'exclusion moléculaire (daltons)	100 000	10 000	1 000
Diamètre approximatif des pores (μm)	0.006	0.0014	0.0011
Pression de N_2 pour la filtration (atm)	1.02	3.74	3.74

durant une heure (recommandation du manufacturier) est insuffisant pour débarasser les membranes neuves de leur couche protectrice de phénolphthaléine. Schindler et Alberts (1974) ont trouvé que le traitement au NaCl permettait d'éliminer tout relargage de carbone.

La préparation des échantillons pour la réalisation de bioessais avec l'algue verte (Chlorophycée) *Selenastrum capricornutum* a nécessité une diminution importante de la concentration de tout élément et composé de taille inférieure au seuil d'exclusion des membranes. Ceci était nécessaire afin de pouvoir préparer des milieux de culture expérimentaux, lesquels (sauf pour la présence de MOD) étaient en tout point comparables aux milieux témoins (milieux AAP, section 3.6). Ceci fut réalisé par diafiltration à volume constant (ultrafiltration et dilution simultanées) (Blatt et al., 1968). Une solution tampon de NaHCO_3 (0.21 mM) était utilisée comme solution de dilution. En général, 5 L de cette solution étaient nécessaires pour enlever au minimum 95% des composés plus petits que le seuil d'exclusion de la membrane dans 1 L de volume à diafiltrer (c'est-à-dire, 5 fois le volume à diafiltrer).

De plus, il a été nécessaire d'ajuster le pH (8.4 avec du NaOH dilué) et la force ionique (0.01M avec du NaNO_3) avant l'ultrafiltration (S. Visser, Université Laval, 1984, communication personnelle) afin de minimiser les variations de taille et

de structure macromoléculaires de certains composés organiques naturels (Ghosh et Schnitzer, 1980; De Haan et al., 1983).

3.3 Dosage du Fe

Trois "catégories" de Fe ont été considérées pour cette recherche: le Fe total, le Fe(II)-réactif à la ferrozine et le Fe(II)+(III)-réactif à la ferrozine.

Le Fe total était obtenu par spectrométrie d'absorption atomique au four au graphite (Varian Techtron, modèle A). Les conditions d'analyse (volume de l'échantillon; longueur d'onde de lecture; type de gaz; temps et températures d'atomisation, etc) étaient celles préconisées par le manufacturier à l'exception des temps et températures de séchage (5 s à 75°C; 50 s à 120°C; 11.5 s à 800°C).

Le Fe(II)-réactif à la ferrozine (monohydrate monosodique d'acide 3-[2-pyridyl]-5,6-bis[4-phényl sulfonique]-1,2,4-triazine) était dosé par la méthode de Stookey (1970), telle que modifiée par Gibbs (1979). Un échantillon de 12 mL était acidifié à 0.1 N (avec du HCl 5N) et mis de côté pendant 30 min. Un volume de 0.5 mL de ferrozine (1.47 mM) était ensuite ajouté, suivi de 1.25 mL de tampon acétate (5.2 M; pH 4.5). L'échantillon était transféré dans une cellule à trajet optique de 5 cm et l'absorbance était mesuré (à 562 nm) après 3 min. Une attention particulière a été donnée aux temps de réaction à

cause des observations de Box (1984), selon lesquelles le HCl et la ferrozine peuvent induire une lente réduction d'une partie du Fe(III). Lorsqu'elle se produisait, cette lente réaction de réduction n'était visible qu'après 3 min. L'expression "Fe réactif à la ferrozine" a été choisie en vertu des observations de Box (1984). La limite de détection de la technique est de 10^{-8} M et la précision est de $\pm 2.5\%$ (Gibbs, 1979).

Le Fe(II)+(III) réactif à la ferrozine était obtenu de manière similaire, sauf qu'un agent réducteur (0.5 mL d'hydrochlorure d'hydroxyl-amine, 1.44 M) était ajouté 2 min avant la ferrozine, afin de réduire le Fe(III) en Fe(II) et ainsi permettre son dosage.

3.4 Dosage du carbone organique dissous

Les teneurs en MOD, exprimées en $\text{mg C}\cdot\text{L}^{-1}$, ont été obtenues à l'aide d'un auto-analyseur Technicon muni d'un dispositif "DIC-DOC" selon une technique mise au point au Ministère de l'Environnement du Québec (Ministère de l'Environnement du Québec, 1986). Après avoir acidifié l'échantillon (H_2SO_4 1N; pH < 2) et éliminé le C inorganique par un courant d'argon, on ajoute du persulfate de potassium (0.15 M) et on irradie à la lumière ultraviolette. La MO, ainsi transformée en acide carbonique, est alors absorbée dans une solution de NaOH (0.0017 N). Connaissant la conductivité équivalente limite à 25°C du NaOH et du Na_2CO_3 , il est possible de quantifier la concentra-

tion de carbone organique dissous par une mesure de la conductivité électrique. La conductivité diminue proportionnellement avec la quantité de gaz carbonique absorbé dans la solution. La sensibilité de la méthode est de $0.80 \mu\text{mhos}\cdot\text{cm}^{-1}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour une concentration de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de C et la limite de détection est de $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Une précision de $\pm 3\%$ a été obtenue lors de tests préliminaires.

3.5 Dosage des éléments nutritifs

Le phosphore réactif dissous a été dosé par la méthode du bleu de molybdate (Murphy et Riley 1962; Stainton et al. 1977), le $\text{NH}_4^+-\text{NH}_3$ par la méthode du phénol-hypochlorite (APHA 1985) et les $\text{NO}_2^- - \text{NO}_3^-$ par chromatographie ionique (appareil Dionex; colonne AS3; éluant $\text{NaCO}_3-\text{HCO}_3$).

3.6 Conditions de culture

Les milieux de cultures utilisés étaient adaptés du milieu "Algal Assay Procedure" (AAP) modifié par Chiaudani et Vighi (1978) dont la composition est résumée au tableau 3.2.

Tous les bioessais ont été réalisés à partir de la même souche de *Selenastrum capricornutum* Printz, laquelle provient de la collection des cultures de l'Université du Texas à Austin. Les cultures de *S. capricornutum* étaient maintenues à 20°C et sous un éclairage continu de $115 \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

TABLEAU 3.2. Composition du milieu AAP modifié (adapté de Chiaudani et Vighi, 1978).

Composés	Concentration finale (M)
Macro-éléments	
NaNO ₃	3.00 x 10 ⁻⁴
MgCl ₂	5.99 x 10 ⁻⁵
MgSO ₄	5.96 x 10 ⁻⁵
CaCl ₂	3.00 x 10 ⁻⁵
NaHCO ₃	1.79 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	6.00 x 10 ⁻⁶
Oligo-éléments	
H ₃ BO ₃	3.00 x 10 ⁻⁶
MnCl ₂	2.10 x 10 ⁻⁶
ZnCl ₂	2.50 x 10 ⁻⁹
CoCl ₂	1.20 x 10 ⁻⁹
CuCl ₂	5.00 x 10 ⁻¹¹
Na ₂ MoO ₄	3.00 x 10 ⁻⁸
FeCl ₃	1.00 x 10 ⁻⁶

Les cultures stocks étaient maintenues en conditions axéniques et vérifiées visuellement avant chaque expérience par microscopie à contraste de phase. L'absence de bactéries était vérifiée en inoculant une aliquote des cultures dans un bouillon de culture général contenant un mélange d'acétate, glucose, sucrose, extrait de malt, peptone, tryptone et extrait de levure (Difco). Un test positif était obtenu à l'apparition de turbidité dans le bouillon après 3 à 4 jours d'incubation à la température ambiante et à l'obscurité.

Afin de minimiser la contamination en métaux, toute la verrerie et tous les contenants utilisés ont été trempés au moins 24 h dans du HCl 2 N et rincés plusieurs fois à l'eau ultrapure (système Millipore Milli Q3 RO/Milli-Q2). De plus, toutes les solutions ont été préparées à partir de produits de qualité "Réactif" ou mieux et dans de l'eau ultrapure.

EFFET D'UNE FRACTION DE MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE SUR LA
BIODISPONIBILITÉ DE MÉTAUX A L'ÉTAT DE TRACES POUR
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM.

4.1 Introduction

Quelque soit le degré d'efficacité d'un système de traitement des eaux usées domestiques, une fraction non négligeable de la MOD peut échapper à la minéralisation. Les découvertes rapportées au chapitre 2 ont montré comment la MOD naturelle peut modifier la biodisponibilité du Fe, un micro-nutriment essentiel à la croissance du phytoplancton. On peut soupçonner que la MOD résiduaire des traitements d'eaux usées domestiques aura des propriétés similaires. Toutefois, les résultats rapportés par les deux seules études trouvées dans la littérature scientifique restent non concluants. En effet, Sachdev et Clesceri (1978), n'ayant pu identifier de facteur responsable de l'effet stimula-

teur de fractions de MOD extraite d'un effluent secondaire sur la croissance de l'algue verte *Selenastrum capricornutum*, l'ont attribué à la présence probable de substances de croissance (vitamines, hormones végétales, apport nutritif) et à un effet possible sur la perméabilité des membranes plutôt qu'à un effet sur la biodisponibilité des métaux à l'état de traces. Par contre, les résultats d'expériences préliminaires réalisées par Bender et al. (1970) semblaient indiquer que la stimulation du taux de photosynthèse de populations phytoplanctoniques naturelles, en présence d'une fraction de poids moléculaire de 500 à 1000 daltons, était le résultat de ses qualités de ligand pour les cations métalliques, tel que le Fe.

Il est connu que des substances organiques d'origine naturelle comme les substances humiques affectent la biodisponibilité des métaux à l'état de traces (Ortner et al., 1983). Il est probable que ce facteur explique les stimulations de croissance observées surtout en présence de substances à faible poids moléculaire chez plusieurs dinoflagellées (Prakash et Rashid, 1968) et diatomées d'eaux marines (Prakash et al., 1973). Bien que l'on n'ait pas réussi à éliminer la possibilité d'un apport direct de substances nutritives organiques comme telles, il est généralement accepté que certains effets stimulateurs de la MOD soient reliés à ses effets sur la biodisponibilité des métaux à l'état de traces (Sunda et Ferguson, 1983). Par exemple, Ortner et al. (1983) ont observé que la seule présence d'acides ful-

viques ne stimule pas la photosynthèse significativement alors qu'elle affecte la toxicité des métaux à l'état de traces.

Une de nos expériences précédentes (Langis et al., 1986) a permis d'observer que des fractions de MOD de différents poids moléculaires, extraites d'un effluent secondaire, avaient inhibé la croissance de *S. capricornutum*. Puisque l'ajout des oligo-éléments a eu pour effet de faire disparaître ou d'amoindrir cette inhibition, les auteurs ont suggéré que l'effet dominant de cette MOD était de séquestrer un ou plusieurs de ces oligo-éléments et ainsi limiter leur biodisponibilité. Jackson et Hecky (1980) avaient d'ailleurs corrélé la limitation de productivité primaire de certains lacs et réservoirs humiques à leur concentration élevée en MOD; ils ont expliqué la faible productivité primaire par la séquestration du Fe.

Alors que l'assainissement des eaux est devenu une priorité pour notre société, il devient important d'évaluer les effets des effluents domestiques traités sur le milieu récepteur. En plus des composés azotés et phosphorés inorganiques, ces effluents contiennent des substances organiques dont les effets sur la productivité phytoplanctonique sont encore obscurs. L'objectif du présent chapitre est donc de vérifier l'hypothèse selon laquelle la biodisponibilité des micro-nutriments est affectée par la MOD résiduaire d'un effluent secondaire. Cet objectif est atteint par une série de bioessais avec *S. capricornutum* dans un milieu de culture synthétique enrichi avec une

fraction de MOD de faible poids moléculaire (1000 à 10 000 daltons). A partir de ce milieu, initialement complet, les oligo-éléments nécessaires en concentration relativement élevée comme le Fe et le Mn, considérés ici comme oligo-éléments primaires, ainsi que les oligo-éléments de moindre importance, oligo-éléments secondaires, ont sélectivement été omis. La fraction de MOD provenait de la même source que celle utilisée par Langis et al. (1986) et a été extraite par une méthode similaire (chapitre 3). La fraction de faible poids moléculaire (1000 à 10 000 daltons) est utilisée ici, puisque cette fraction de MOD s'était révélée la plus fortement inhibitrice sur la croissance de *S. capricornutum* (Langis et al., 1986).

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Préparation des milieux de culture

Un échantillon de 20 L d'effluent secondaire a été prélevé à la sortie du décanteur secondaire (avant chloration) à l'usine d'épuration de la base de Valcartier. L'échantillon a été filtré (0.2 μm) quelques heures après le prélèvement et conservé à l'obscurité et à 4°C dans une bouteille de Pyrex stérilisée.

La fraction de MOD à poids moléculaire de 1000 à 10 000 daltons a été obtenue par une technique qui allie l'ultrafiltration à la diafiltration au moyen de membranes

Diaflo (voir chapitre 3). L'étape subséquente de diafiltration était nécessaire pour libérer les solutions de substances de poids moléculaire inférieur au seuil d'exclusion des membranes et, surtout, pour obtenir des milieux de culture dont la composition inorganique était comparable au milieu AAP (lequel est limité en phosphore). Cette façon de procéder a permis d'éliminer 99% du P-réactif.

Quatre milieux expérimentaux ont été préparés à partir de la solution de matière organique, immédiatement avant d'être inoculés. La concentration de MOD était égale à $7.7 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$, ce qui est de beaucoup inférieur aux concentrations auxquelles Buffle et al. (1978) ont observé le colmatage des membranes et de l'inconsistance dans les propriétés de rétention de la membrane. De plus, un témoin (A) composé du milieu AAP modifié, sans MOD, a été inclus afin de pouvoir évaluer un effet de la MOD qui serait indépendant des omissions de métaux à l'état de traces. La concentration de phosphore a été ajustée à la concentration du témoin ($6.00 \times 10^{-6} \text{ M}$) dans tous les milieux contenant de la MOD (à partir des concentrations de P-réactif au bleu de molybdate) afin que toutes les cultures soient également limitées en phosphore. Le pH des milieux de cultures était de 7.2 à 7.5 avant l'inoculation. Dans le premier milieu (MA) aucun élément du milieu AAP n'a été omis alors que dans le deuxième milieu (MA-Fe), le Fe a été omis et dans le troisième (MA-Mn), le Mn. Finalement, dans le quatrième (MA-MT), les autres oligo-éléments (B, Mo, Zn, Co et le Cu) étaient absents. Les

cultures (volume de 25 mL) étaient maintenues dans des éprouvettes en Pyrex de 50 mL inclinées à 30° afin de maximiser la surface d'aération. Les cultures étaient brassées avec un agitateur de type vortex deux fois par jour et maintenues à 20°C $\pm 1^\circ\text{C}$ sous éclairage continu avec une intensité lumineuse de 110 à 115 $\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, le taux de photosynthèse maximum de *S. capricornutum* étant observé près de cette intensité (J.C. Auclair, INRS-Eau 1985, communication personnelle). Tous les bioessais ont été réalisés avec cinq répétitions.

La croissance des cultures a été suivie par fluorescence in vivo avec un fluorimètre Turner Design. Pour cette expérience, au cours de laquelle plusieurs cultures (5 x 5) devaient être suivies simultanément, ce paramètre offrait l'avantage de permettre des mesures rapides et fiables sans avoir à sous-échantillonner chaque culture, puisque le tube de culture lui-même pouvait être introduit dans le fluorimètre. Bien que la fluorescence par unité cellulaire puisse varier avec les conditions de l'environnement, Brand et al. (1981) ont démontré que l'accroissement exponentiel de la fluorescence in vivo est un juste reflet de celui de l'abondance cellulaire, en autant que le clone puisse être acclimaté au préalable. L'inoculum utilisé provenait d'un clone de *S. capricornutum* acclimaté à la culture en tubes par un mode de culture semi-continu (50% du milieu était remplacé quotidiennement avec du milieu frais), l'acclimatation étant considérée complète lorsque la mesure de

fluorescence in vivo était devenue approximativement constante (moins de 10% de variation) pour trois jours consécutifs.

Afin de comparer les croissances globalement, les valeurs de l'aire sous les courbes de croissance (Wong et Couture, 1986), basées sur les mesures de fluorescence in vivo, ont été utilisées comme critère de différenciation des différents traitements.

Statistiques

A cause du faible nombre d'observations pour chaque traitement et de l'impossibilité de s'assurer de la normalité des distributions de fréquence, des tests de comparaison non paramétrique ont été utilisés. Le test de Kruskal-Wallis (Sokal et Rohlf, 1969) a permis d'établir l'existence de différences entre les traitements et le test de Wilcoxon-Mann-Whitney (Sherrer, 1984) d'identifier les traitements significativement différents.

4.3 Résultats et discussion

Le tableau 4.1 permet de comparer les croissances obtenues lors de chaque traitement avec la croissance du témoin (A) et celle du milieu complet avec MOD (MA). Les significations statistiques des différences observées sont données au tableau 4.2. On observe au tableau 4.1 des valeurs

TABLEAU 4.1. Valeurs des aires sous la courbe calculées à partir des mesures de fluorescence in vivo.

	A ^a	MA ^b	MA-Fe ^c	MA-Mn ^d	MA-MT ^e
MOY (N = 5)	668.7	744.5	709.2	737.8	803.3
ECART					
TYPE	19.3	61.2	41.9	49.9	22.4
COEFF. VARIATION (%)	3.0	8.0	6.0	7.0	3.0

^a Milieu AAP

^b Milieu AAP + MOD

^c Milieu AAP + MOD sans Fe

^d Milieu AAP + MOD sans Mn

^e Milieu AAP + MOD sans oligo-éléments secondaires mais avec du Fe

TABLEAU 4.2. Signification des différences entre les traitements pris deux à deux, obtenus par le test Wilcoxon-Mann-Whitney. Les chiffres sont les probabilités d'effectuer l'erreur de type I (Sherrer 1984). Pour la signification des symboles, voir tableau 4.1.

	A	MA-Fe	MA-Mn	MA
MA-Fe	0.075			
MA-Mn	0.075	0.111		
MA	0.075	0.111	0.421	
MA-MT	0.004	0.004	0.008	0.028

plus élevées pour toutes les cultures réalisées en présence de la fraction de MOD. Il apparaît, toutefois, que l'ajout de MOD n'a stimulé la croissance de manière significative ($\alpha < 0.01$) que dans le cas du traitement MA-MT (tableau 4.2).

Afin de pouvoir obtenir une indication plus sensible des différences entre les traitements, ceux-ci sont comparés deux à deux et les probabilités a d'effectuer l'erreur statistique du type I (rejeter l'hypothèse d'égalité H_0 alors que H_0 est vraie, calculées par la méthode de Wilcoxon-Mann-Whitney), sont fournies au tableau 4.2. Les seuils de signification observés indiquent que la croissance est stimulée ($\alpha \leq 0.075$) dans tous les milieux enrichis de MOD par rapport à la croissance dans le milieu A et particulièrement dans le milieu MA-MT ($\alpha \leq 0.004$). La stimulation observée pourrait s'expliquer par l'apport de substances nutritives organiques, quoique des capacités hétérotrophes n'ont jamais été démontrées chez *S. capricornutum*, ou encore par un effet sur la perméabilité des membranes, deux hypothèses proposées par Prakash et Rashid (1968), mais peu étudiées par la suite. Plus probable serait un effet lié à la complexation des métaux à l'état de traces, soit par une diminution de la concentration d'ions métalliques libres (Sunda and Lewis, 1978), ou par un effet positif sur la biodisponibilité du Fe.

En effet, cette tendance à la stimulation en présence de matière organique diminue lorsque le Fe est omis du milieu de

culture (tableau 4.1). Il apparaît donc que, dans toutes les cultures où le Fe est présent avec la MOD, on observe une meilleure croissance par rapport à la culture où le Fe est absent (MA-Fe). Ainsi, on constate que la croissance obtenue dans le milieu MA-Fe est inférieure aux croissances obtenues dans les milieux MA, MA-Mn et MA-MT (tableau 4.1). La solubilité du Fe étant très faible, l'effet stimulateur de la MOD sur le Fe serait de maintenir cet élément en solution sous forme de complexes dissous, ou encore de stabiliser les colloïdes de Fe par la formation de complexes avec les atomes de Fe à la surface du colloïde (Davis et Leckie, 1978). Sans matière organique (ou autre agent complexant) et en milieu oxygéné, le Fe deviendra de moins en moins biodisponible au fur et à mesure que les espèces de Fe(II) labiles s'oxyderont en oxyhydroxides ferriques réfractaires (voir figure 2.1). Le rôle de la MOD serait de modifier le processus de vieillissement des colloïdes ferriques (De Haan et al., 1985). Ainsi, on peut supposer que les différences observées entre les milieux MA, MA-Mn et le milieu A auraient été plus importantes si ces milieux avaient vieilli quelque temps au lieu d'avoir été inoculés avec *S. capricornutum* immédiatement après leur préparation.

Parmi les chercheurs qui se sont intéressés à ce phénomène, tous n'ont pas conclu que les substances organiques favorisent la biodisponibilité du Fe. Giesy (1976) a observé que des acides humiques de poids moléculaire élevé (30 000 daltons) stimulaient la croissance de *Scenedesmus obliquus*. Cependant, il n'a pas

associé cet effet à la création d'un compartiment de Fe biodisponible, puisque la stimulation était observée en absence aussi bien qu'en présence du chélateur EDTA. Ce raisonnement n'est cependant pas concluant, car cette expérience n'élimine pas la possibilité que les acides humiques puissent solubiliser le Fe en absence d'EDTA et que ce dernier chélateur, étant donné sa grande affinité pour le Fe(III), puisse le solubiliser avec autant d'efficacité en présence de substances humiques. Giesy (1976) a également observé que la "biodisponibilité du Fe" diminuait avec une augmentation des teneurs en acides humiques lors d'une étude de la prise en charge de Fe radio-actif. Il a distingué le Fe pris en charge, du Fe, d'une part adsorbé sur les cellules et, d'autre part, sur les filtres en lavant les filtres avec une solution de HCl (0.01 N) après y avoir filtré ses cultures. Ce traitement, qui peut avoir eu un effet sur l'intégrité des membranes cellulaires, lui a permis de retirer 98.5% du Fe adsorbé sur les filtres. Par contre, il a estimé que le Fe adsorbé sur des cellules fixées avec de la formaldéhyde était inférieur à 2%.

Ces conclusions peuvent être mises en doute, car il est probable que ces deux traitements (HCl et formaldéhyde) aient modifié les propriétés d'adsorption des membranes cellulaires, ce qui biaiserait les valeurs de Fe disponible. De plus, l'emploi de filtres qui adsorbent apparemment beaucoup de Fe apparaît risqué et peut introduire des erreurs importantes. Les plus grandes quantités de Fe retenues par les filtres aux plus

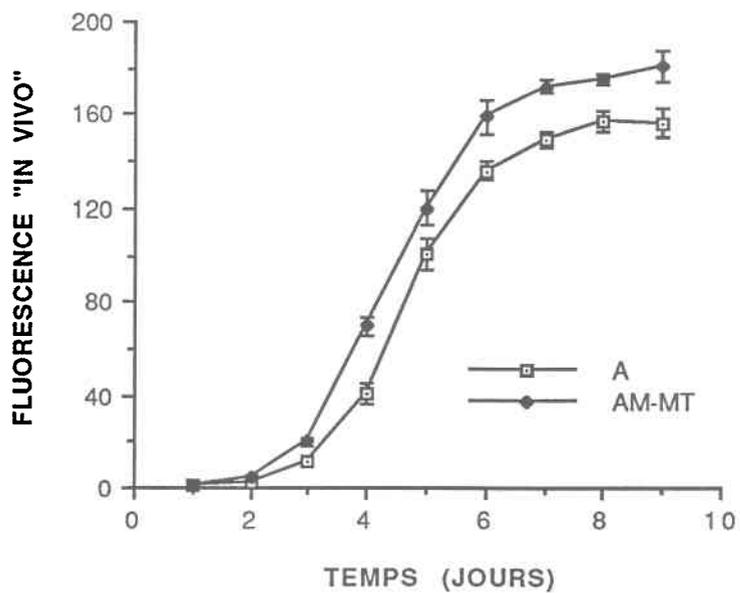
faibles concentrations d'acides humiques pourraient bien résulter de la plus faible solubilité du Fe (donc de la quantité accrue de Fe non filtrable) que Geisy (1976) a lui-même noté en absence d'acides humiques.

On ne peut cependant pas admettre qu'en augmentant les concentrations en acide humique on augmente forcément la production primaire. Jackson et Heckey (1980) ont établi des corrélations statistiques entre les faibles productivités primaires, les concentrations élevées de substances humiques et les teneurs de Fe dans des lacs et réservoirs; ils ont attribué cette situation à la séquestration du Fe par les substances humiques. Quoiqu'ils n'aient pas établi de relation de cause à effet, il reste possible que des concentrations élevées de substances humiques limitent la biodisponibilité du Fe (ou d'un autre métal trace essentiel comme le Mn) par sur-chélation, tel que suggéré par Jackson et Morgan (1978) et selon les indications obtenues de De Haan et al. (1985) et de Dufkova (1984) avec le EDTA.

Aucun effet n'a été détecté avec l'omission du Mn, les différences de croissance par rapport au milieu MA étant très faibles (tableaux 4.1 et 4.2). Ceci suggère que, dans ce cas-ci, la culture MA-Mn n'était pas limitée en Mn et, par conséquent, que l'influence possible de la MOD sur la biodisponibilité du Mn ne s'est pas manifestée. On peut donc supposer que la diafiltration n'a pas diminué la concentration de Mn jusqu'à un niveau limitatif.

Le traitement qui a le plus stimulé la croissance est MA-MT (fig 4.1); les valeurs de fluorescence in vivo de cette culture sont très significativement différentes des valeurs de fluorescence in vivo observées avec les autres traitements (tableau 4.2). L'ajout de Fe en présence de MOD, comme dans les cultures MA et MA-Mn, ne peut expliquer qu'une partie de cette stimulation. La stimulation additionnelle pourrait être imputée à l'élimination dans MA-MT d'une légère toxicité due aux métaux secondaires. Il est possible en effet que l'ajout de métaux à l'état de traces tels que le Cu ait induit un effet toxique en s'additionnant à la concentration de Cu déjà présente dans la solution de MOD. Alors que ce métal est essentiel à la croissance et au maintien des populations de phytoplancton, il peut devenir toxique si sa concentration dépasse un certain seuil. Sunda et Lewis (1978) ont démontré que la division cellulaire chez *Monochrysis lutheri* était inhibée à des concentrations d'ions Cu^{+2} libres supérieures à 10^{-9} M. Chiaudani et Vighi (1978) ont relevé une inhibition de croissance chez *S. capricornutum* à des concentrations de Cu total aussi faibles que 1.6×10^{-8} M en absence de chélateurs. La concentration de Cu de l'échantillon de MOD utilisé ici n'est pas disponible, mais des mesures de la concentration en Cu, obtenues par spectrométrie atomique par émission de plasma, d'autres échantillons de MOD (N = 5) de même provenance et extraits de manière similaire, ont varié de 1.8 à 3.9×10^{-7} M Cu. Par ailleurs, il est possible d'observer un effet toxique à des concentrations encore plus

Figure 4.1. Courbes de croissance de *S. capricornutum* dans le milieu témoin (A) et le milieu AAP enrichi de MOD sans oligo-éléments secondaires (AM-MT) (voir texte). Chaque point correspond à la moyenne de cinq mesures avec l'écart-type.



faibles suite à des interactions synergiques avec d'autres métaux (Wong et al., 1978; 1982).

L'effet de la MOD ne se limiterait donc pas uniquement à un effet sur la biodisponibilité du Fe, mais serait aussi possiblement relié à la présence des oligo-éléments, même à des concentrations très faibles.

Par ailleurs, les résultats obtenus lors de cette expérience semblent contredire les résultats obtenus par Langis et al. (1986), qui avaient observé, non pas une stimulation de croissance de *S. capricornutum* en présence de matière organique, mais une inhibition. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer en partie par la présence possible de composés toxiques résiduels dans l'échantillon utilisé par Langis et al. (1986). En effet, la présence occasionnelle de composés toxiques tels que certains phénols dans les effluents municipaux ne peut être écartée, puisque Stephanou et Giger (1982) ont trouvé des nonylphénols à des concentrations relativement élevées (36 à 202 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dans des effluents secondaires municipaux après traitement biologique.

4.4 Conclusions

Les résultats obtenus à partir des bioessais permettent de conclure que la MOD d'une même fraction moléculaire peut stimuler la biodisponibilité du Fe, alors qu'elle ne semble exercer

aucune influence notable sur la biodisponibilité du Mn. De plus, ces résultats suggèrent que la MOD pourrait diminuer la toxicité de métaux secondaires tel que le Cu.

L'effet de la MOD sur la détoxification de métaux à l'état de traces a été et continue d'être bien étudié (Sunda et Lewis, 1978; Sedlacek et al., 1981; Ortner et al., 1983). Par contre la question de son effet sur la biodisponibilité du Fe reste problématique et des expériences où la chimie des milieux de culture est mieux contrôlée sont encore nécessaires (voir chapitres 5 et 6).

EFFET DE DEUX FRACTIONS DE MATIÈRE ORGANIQUE DE POIDS
MOLÉCULAIRE DIFFÉRENT SUR LA BIODISPONIBILITÉ DU FER POUR
SELENASTRUM CAPRICORNUTUM.

5.1 Introduction

La problématique développée au chapitre 2 a mis en évidence l'influence de la MOD sur la biodisponibilité du Fe. Par ailleurs, les résultats présentés au chapitre 4 ont démontré que la MOD extraite d'un effluent secondaire est capable d'influencer la biodisponibilité des métaux à l'état de traces et, fort possiblement, de favoriser la biodisponibilité du Fe. Mentionnons que, ces résultats n'ont été obtenus qu'à partir d'une seule fraction moléculaire (1000 à 10 000 daltons). Ce dernier aspect doit donc être appuyé par des données additionnelles plus concluantes avant de pouvoir être généralisé à d'autres types de MOD.

Les résultats contradictoires sur l'influence de la MOD vis-à-vis la biodisponibilité du Fe (section 2.2.4) peuvent être, en partie, expliqués par le mode de préparation et la nature des colloïdes de Fe (tableau 2.2). De plus, les différents types ou sources de MOD utilisés lors de ces expériences peuvent aussi avoir influencé les résultats. En effet, comme ces types de MOD possèdent différentes propriétés d'adsorption, un facteur partiellement relié à leur poids moléculaire (Malcolm et MacCarthy, 1986), il est probable que la biodisponibilité du Fe soit aussi affectée de diverses manières.

Une façon commode de distinguer les substances provenant d'un assemblage hétérogène de MOD est de les séparer sur la base de leur poids moléculaire par ultrafiltration. Cette technique permet de discriminer entre elles différentes substances organiques selon un critère purement physique et d'obtenir des fractions de MOD distinctes en minimisant le risque d'altérer leur propriétés chimiques (donc biologiques) (chapitre 3). De cette façon, Sachdev et Clesceri (1978) ont observé que des fractions organiques de poids moléculaires différents, extraites d'un effluent secondaire municipal, avaient aussi un effet différent sur la croissance de *S. capricornutum*. Cet effet a de même été noté chez des dinoflagellés marins en présence de substances humiques par Prakash et Rashid (1968), qui à l'instar de Sachdev et Clesceri (1978) ont obtenu de meilleure croissance en

présence d'une fraction de faible poids moléculaire (500- 1500 daltons).

L'objectif de ce chapitre est de vérifier l'hypothèse selon laquelle la biodisponibilité du Fe est affectée différemment par des fractions moléculaires extraites d'un échantillon de MOD résiduaire d'un traitement d'eaux usées domestiques. La vérification de cette hypothèse permettra de préciser si l'influence de la MOD sur la biodisponibilité du Fe est le résultat de propriétés spécifiques à certaines substances organiques ou catégories de substances organiques, ou si elle est le résultat de caractéristiques communes à plusieurs substances et surtout indépendantes de leur poids moléculaire. De plus, cette expérience permettra d'appuyer une des observations du chapitre 4 selon laquelle la MOD résiduaire d'un effluent secondaire est capable d'influencer la biodisponibilité du Fe. Ceci sera vérifié en comparant les réponses de bioessais (*S. capricornutum*) à l'ajout de Fe en présence de deux fractions de MOD de poids moléculaire différent, ces dernières étant extraites d'un effluent d'eaux usées domestiques après traitement secondaire.

5.2 Matériel et méthodes

5.2.1 Préparation des fractions de MOD

La matière organique a été échantillonnée tel que décrit au chapitre 4 et fractionnée selon la technique

d'ultrafiltration et de diafiltration précisée au chapitre 3. Cette technique a permis d'obtenir deux fractions de MOD: une fraction à poids moléculaire élevé de 10 000 à 100 000 daltons, désignée par la suite comme la fraction 10-100K et une fraction à poids moléculaire faible de 1000 à 10 000 daltons, la fraction 1-10K.

5.2.2 Bioessais

Les cultures stocks de *S. capricornutum* ainsi que les cultures témoin furent maintenues dans le milieu AAP modifié par Chiaudani et Vighi (1978) (voir chapitre 3); la concentration en Fe utilisée ici était de 1 μM au lieu de 0.592 μM . Toutes les expériences furent réalisées dans des fioles coniques de 125 mL en polycarbonate. Les cultures ont été maintenues en condition axénique jusqu'au lancement de l'expérience où elles ont toutes été contaminées accidentellement par une espèce bactérienne, *Pseudomonas fluorescens*, identifiée avec le test rapide API (systèmes de microtubes NFT). Il est peu probable que la présence de cette bactérie ait affecté les conclusions de ce travail puisque la contamination était généralisée à toutes les cultures y compris les témoins et que selon Diekmann (1984) aucune bactérie du genre *Pseudomonas* ne produit de sidérophores et n'aurait pas pu compétitionner efficacement avec *S. capricornutum* pour le Fe. Les cultures furent maintenues à $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sous éclairage continu avec une intensité lumineuse de 115 ± 5

$\mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Chaque traitement était répété trois fois dans des volumes de 50 mL chacun.

Le nombre de cellules par mL ainsi que le volume cellulaire total par mL (VCT) ont été déterminés quotidiennement. Les valeurs de VCT ($\text{nL}\cdot\text{mL}^{-1}$) correspondaient à la moyenne géométrique des produits pour chaque classe de taille du nombre de cellules $\cdot\text{mL}^{-1}$ et du volume cellulaire moyen ($\text{nL}\cdot\text{cellule}^{-1}$), ces valeurs étant obtenues à l'aide d'un compteur de particules Coulter Counter (modèle TA-II). Ces mesures ont été prises jusqu'au début de la phase stationnaire, c'est-à-dire lorsque l'accroissement journalier du nombre de cellules était inférieur à 10%, y compris pour le témoin.

En plus des dénombrements, les mesures de VCT furent utilisées parce qu'il a déjà été démontré que le volume cellulaire peut varier sous l'effet de carences nutritives (Burmester, 1979; Entsch et al., 1983; Harrison et Morel, 1986). Afin de tenir compte de l'ensemble des résultats au cours de la période de croissance, les tests de comparaisons furent réalisés sur les surfaces sous les courbes de croissance (Wong et Couture, 1986).

Deux solutions synthétiques (1 L) furent préparées, l'une contenant la fraction 10-100K de la MOD (concentration finale $1.0\text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) et la seconde, la fraction 1-10K ($1.6\text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$). Une concentration minimale de P-réactif soluble égale dans tous les traitements a été obtenue en ajustant les milieux à $3.9\ \mu\text{M}$

avec une quantité appropriée de K_2HPO_4 . Le pH a aussi été ajusté à 7.4 avec le tampon PIPES (acide pipérazine-N,N'-bis(2-éthanesulfonique; concentration finale 0.4 mM), reconnu pour sa capacité de complexation négligeable (Good et al., 1966). Après avoir ajouté les autres éléments du milieu AAP modifié (voir tableau 3.2, tous sauf le Fe), de manière à atteindre des concentrations finales normalement retrouvées ("1 AAP"), les deux solutions furent séparées en deux sous-échantillons. Un seul des sous-échantillons de chaque fraction moléculaire a été enrichi avec du Fe (concentration finale 1 μM), ajouté sous la forme $FeCl_2$. La forme ferreuse a été choisie afin de profiter de la plus grande solubilité du Fe(II) et afin que le Fe^{3+} puisse être formé lentement dans le milieu en suivant la cinétique d'oxydation du Fe^{2+} , ce qui devait maximiser la formation de complexes MOD-Fe(III). Des tests préliminaires ont démontré que le Fe(II) dans ces échantillons avait une demi-vie d'environ 30 min. Après avoir laissé les solutions s'équilibrer durant 48 h à température ambiante ($20^\circ \pm 2^\circ C$) et dans l'obscurité, elles ont été filtrées sur un filtre Nuclepore (0.2 μm). Une aliquote de chaque milieu de culture ainsi filtré fut ensuite prélevée pour doser les concentrations de fer réactif total et de fer ferreux (voir chapitre 3). Les valeurs de Fe dans chaque milieu de culture sont données au tableau 5.1. Des cellules algales (en phase de croissance exponentielle) ont ensuite été inoculées dans 50 mL de chaque milieu de culture (concentration finale de $10^4 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$). Les cellules servant d'inoculum étaient

TABLEAU 5.1: Concentrations de Fe (μM Fe) mesurées 48 h après la préparation des milieux de culture et après filtration sur filtre Nuclepore de $0.2 \mu\text{m}$

MILIEUX DE CULTURE	Fe ajouté	Fe(II)+ Fe(III) ¹	Fe(II) ²	Fe dissous ³
AAP	1.0	0.56	n.d. ⁴	0.98
(1-10K)-Fe	-	0.11	n.d.	0.29
(1-10K)+Fe	1.0	0.89	n.d.	1.22
(10-100K)-Fe	-	0.06	n.d.	0.06
(10-100K)+Fe	1.0	0.60	n.d.	0.88

1. Fe réactif à la ferrozine (plus réducteur)

2. Fe réactif à la ferrozine (sans réducteur)

3. Fe déterminé par absorption atomique

4. Non détecté ($< 0.05 \times 10^{-2} \mu\text{M}$)

maintenues en phase exponentielle selon la technique décrite au chapitre 4.

Le témoin était constitué d'une culture de *S. capricornutum* inoculée dans du milieu AAP modifié complet (chapitre 3), mais sans MOD, incubé de la même manière que pour les autres milieux.

5.2.3 Statistiques

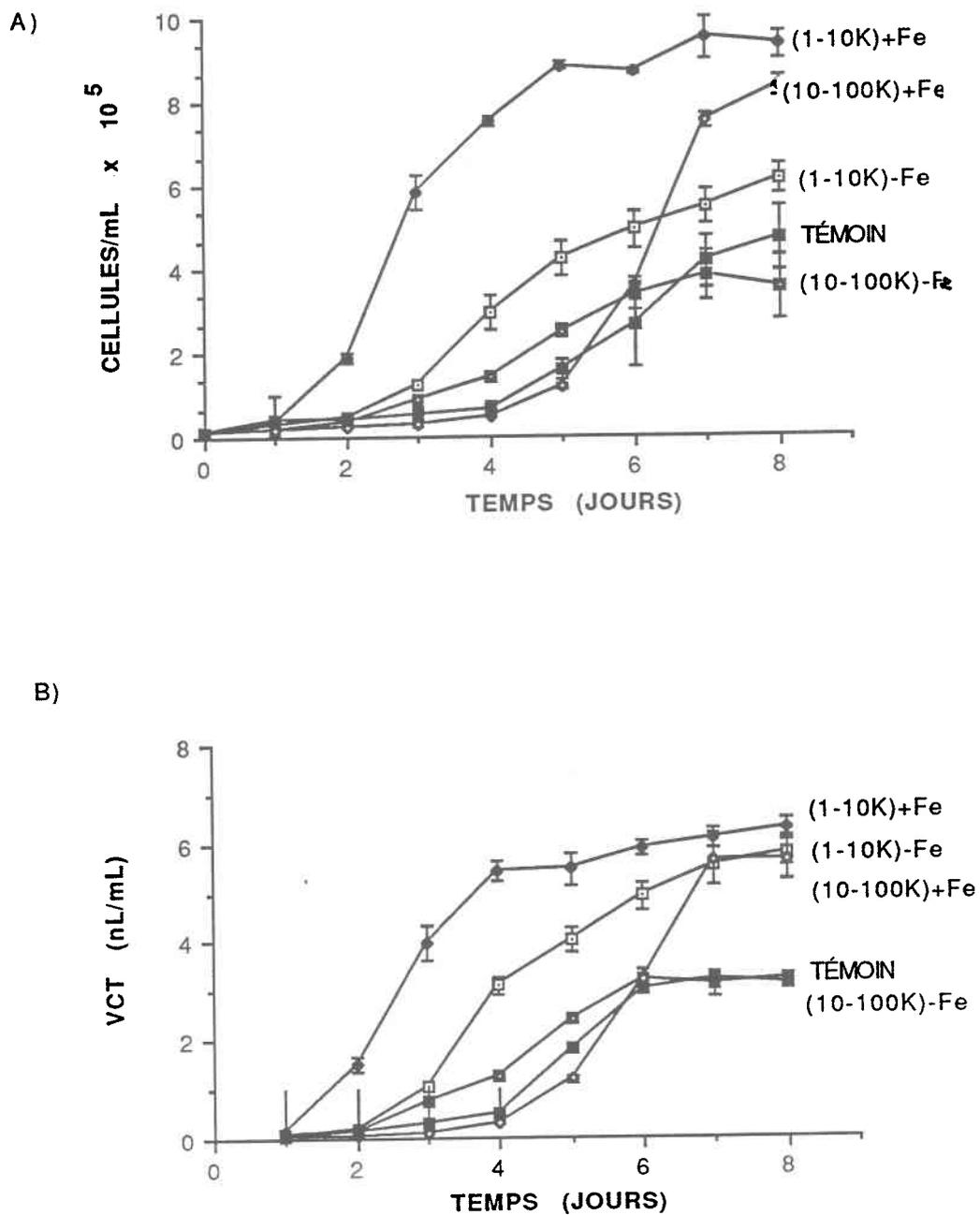
Vu le faible effectif par traitement et l'impossibilité de s'assurer de la normalité des distributions des données pour les expériences de croissance et de prise en charge, tous les tests de signification des différences entre les traitements ont été réalisés à l'aide de tests non paramétriques. Le test de Kruskal-Wallis (Sokal et Rohlf, 1969) a servi à vérifier s'il y avait des différences entre les traitements et, le cas échéant, le test de Wilcoxon-Mann-Whitney (Sherrer, 1984) a permis d'identifier les traitements significativement différents.

5.3 Résultats

5.3.1 Effet de la MOD

La présence de MOD a stimulé la croissance par rapport au témoin (milieu AAP modifié) dans tous les milieux, en particulier dans ceux renfermant la fraction 1-10K (fig. 5.1). En effet, les valeurs des aires sous la courbe de croissance,

Figure 5.1 Courbes de croissance obtenues à l'aide (a) des dénombrements cellulaires et (b) des volumes cellulaires totaux (VCT) pour les milieux expérimentaux et le témoin. Chaque point représente la moyenne de trois valeurs avec l'écart-type.



calculées à partir des VCT, sont significativement différentes ($\alpha < 0.05$) de l'aire sous la courbe de croissance dans le milieu AAP sans MOD ajoutée (tableau 5.2). Par ailleurs, les différences de croissance entre le milieu AAP et le milieu 10-100K (avec et sans Fe ajouté) sont plutôt faibles (voir figures 5.1a,b). L'ensemble des résultats met donc en évidence l'effet stimulateur de la matière organique sur la croissance de *S. capricornutum* et, en particulier, les propriétés stimulatrices supérieures de la fraction 1-10K.

5.3.2 Effet des ajouts de Fe

Les ajouts de Fe aux deux fractions de MOD ont stimulé la croissance de *S. capricornutum* en nombre de cellules (figure 5.1a) et en mesure de VCT (figure 5.1b). Ceci par ailleurs, a mis en évidence le caractère limitatif du Fe.

Si on considère les rendements obtenus au jour 8 (tableau 5.3) c'est en présence de la fraction 10-100K que l'ajout de fer a le plus stimulé la croissance. En effet, l'ajout de Fe a stimulé la croissance en dénombrement cellulaire par un facteur de 2.4 (1.8 lorsque calculé à partir des VCT) en présence de la fraction 10-100K et de 1.5 (1.1 avec les VCT) en présence de la fraction 1-10K.

L'évolution de la variation de la stimulation est plus complexe en ce qui regarde la fraction (10-100K)+Fe (figures

TABLEAU 5.2. Croissance dans chaque milieu de culture. Valeurs calculées selon l'aire sous la courbe de croissance à partir des mesures du nombre de cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$ (méthode 1) et des volumes cellulaires totaux (VCT) (méthode 2).

MILIEUX DE CULTURE	AIRES SOUS LES COURBES ¹	
	Méthode 1 ¹	Méthode 2 ²
AAP	1.25 ± 0.07	11.2 ± 0.40
(1-10K) -Fe	2.19 ^{a, c} ± 0.08	24.3 ^{a, c} ± 1.26
(1-10K) +Fe	4.65 ^{a, b, c} ± 0.04	33.5 ^{a, b, c} ± 1.27
(10-100K) -Fe	1.35 ± 0.06	13.9 ^a ± 0.26
(10-100K) +Fe	1.68 ^{a, b} ± 0.03	16.0 ^{a, b} ± 0.84

¹ Valeurs moyennes ($\text{cell} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1} \times 10^6$) \pm écart-type

² Valeurs moyennes ($\text{nL} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) \pm écart-type

^a significativement différent ($\alpha < 0.05$) de la culture AAP

^b significativement différent ($\alpha < 0.05$) de la culture

sans Fe

^c significativement différent ($\alpha < 0.05$) des cultures (10-100K)

avec et sans ajout de Fe

TABLEAU 5.3. Dénombrement ($\text{cell}\cdot\text{mL}^{-1} \times 10^5$) et VCT ($\text{nL}\cdot\text{mL}^{-1}$) mesurés dans chaque milieu de culture au jour 8.

MILIEUX DE CULTURE	DÉNOMBREMENT ¹	VCT ¹
AAP	4.70 ±0.75	3.1 ±0.01
(1-10K) -Fe	6.11 ^a ±0.37	5.79 ^a ±0.26
(1-10K) +Fe	9.35 ^{a,b} ±0.33	6.31 ^{a,b} ±0.16
(10-100K) -Fe	3.51 ±0.77	3.21 ±0.11
(10-100K) +Fe	8.34 ^{a,b} ±0.24	5.66 ^{ab} ±0.43

¹ Valeurs moyennes ± écart-type

^a différence significative ($\alpha = 0.05$) avec AAP

^b différence significative ($\alpha = 0.05$) avec culture du milieu sans Fe.

5.1a, b), où durant les trois premiers jours, la croissance semble avoir été ralentie par les ajouts de Fe. Par contre après ces trois jours, le taux de croissance s'est accéléré, si bien que la croissance (nombre de cellules $\cdot \text{mL}^{-1}$ et VCT) a dépassé la croissance du témoin et de la fraction (10-100K)-Fe de manière significative après sept jours d'incubation. Lorsqu'on analyse les courbes de croissance par le calcul des aires (tableau 5.2), on observe que les ajouts de Fe ont stimulé la croissance malgré le retard des premiers jours.

5.4 Discussion

Les résultats de croissance du témoin indiquent que les colloïdes ou précipités ferriques non stabilisés, présents dans ce milieu, ne sont pas aussi biodisponibles après une période de 48 h que les formes de Fe du milieu (1-10K)+Fe et, dans une moindre mesure, du milieu (10-100K)+Fe (figures 5.1 et 5.2). Il semble que le Fe y soit peu limitant pendant les deux premiers jours de croissance (moins que dans la fraction (10-100K)), mais qu'il le devienne de plus en plus avec le temps d'incubation. On pose l'hypothèse qu'une période de pré-vieillessement plus longue des milieux de culture aurait accentué davantage les différences observées. En effet, le temps de vieillissement des oxydes ferriques est un facteur significatif pour la biodisponibilité du Fe (Lewin et Chen, 1971; Wells et al., 1983). De plus, Finden et al. (1984) ont obtenu des taux de croissance équivalents chez une algue dulcicole selon que le Fe

proviennent d'un ajout de Fe ferrique frais sans substance humique ou de l'ajout d'un co-précipité Fe-substances humiques. Par contre, les taux de croissance furent sévèrement inhibés lorsque le Fe était vieilli pendant 120 jours sans substance organique.

Les deux fractions de MOD étaient présentes à des concentrations relativement faibles en C organique dissous (COD): $1.6 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la fraction 1-10K et $1.0 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$ pour la fraction 10-100K. Il est possible que les différences observées soient en partie imputables à l'écart entre les deux concentrations en carbone organique. Etant donné que le pouvoir stimulateur de la MOD repose sur sa capacité à former des complexes avec le fer, il est plus pertinent de considérer les rapports MOD/Fe (COD, $\mu\text{g C}\cdot\text{L}^{-1}$ /Fe(II)-(III) réactif à la ferrozine, $\mu\text{g Fe}\cdot\text{L}^{-1}$) de chacune des fractions plutôt qu'uniquement leur concentration respective en COD. Ainsi, on obtient des rapports de masse de 100 pour la fraction (1-10K)-Fe et de 274 pour la fraction (10-100K)-Fe. Si la concentration en COD avait été importante, on aurait eu une plus grande stimulation de la croissance avec la fraction 10-100K étant donné la plus grande concentration en COD par unité de Fe dans ce milieu. Or il en est autrement. Les différences observées ne peuvent donc être imputées aux concentrations différentes de MOD, mais bien aux propriétés distinctes de chaque fraction. Il serait donc possible que la fraction 1-10K possède des qualités de solubilisation du Fe (capacité de complexation) et de dissociation supérieures à la fraction 10-100K. D'ailleurs les coefficients de stimulation aux ajouts de

Fe dans chacune des fractions respectives (dénombrement au jour 8; voir tableau 5.3) mettent en évidence que le caractère limitatif du Fe était plus accentué en présence de la fraction 10-100K qu'en présence de la fraction 1-10K. Ces qualités pourraient être des facteurs favorisant la plus grande biodisponibilité du Fe dans la fraction 1-10K.

Le retard de croissance observé avec la fraction (10-100K)+Fe (figure 5.1a, b) ne peut être le résultat d'une carence globale d'un ou de plusieurs élément(s) nutritif(s), puisque tous les milieux étaient enrichis avec du milieu AAP. D'ailleurs, les valeurs des dénombrements et des VCT mesurées au début de la phase de croissance stationnaire (au jour 8) ne sont pas significativement différentes de celles mesurées dans la fraction (1-10K)+Fe (tableau 5.3). On peut alors supposer que la culture du milieu (10-100K)+Fe (dont l'inoculum était carencé en Fe) ne réussit à obtenir du Fe biodisponible qu'au fur et à mesure que les particules colloïdales de Fe-MOD sont dégradées, probablement par photodissolution. Cette combinaison Fe-MOD correspondrait vraisemblablement à de fines particules ferriques colloïdales filtrables stabilisées par la MOD. L'existence de ces colloïdes est appuyée par le fait que les quantités de fer mesurées dans le milieu 1-10K après filtration (donc séparé des précipités) sont supérieures à celles mesurées dans les milieux AAP et 10-100K (tableau 5.1). D'ailleurs, plusieurs auteurs (Koenings et Hooper, 1976; Davis et Leckie, 1978; Cameron et Liss, 1984; De Haan et De Boer, 1986) ont trouvé à l'instar de

Shapiro (1964) que la plus grande partie du fer filtrable était formée de colloïdes stabilisés par des substances organiques. Dans la présente expérience des colloïdes ont pu se former durant la période de 48 h précédant l'inoculation des algues; rappelons qu'à cette étape le Fe particulaire a été éliminé par filtration (0.2 μm). En bref, l'efficacité de la fraction 1-10K résiderait dans sa plus grande capacité de stabiliser les colloïdes de Fe et, possiblement, de former un colloïde plus labile que la fraction 10-100K.

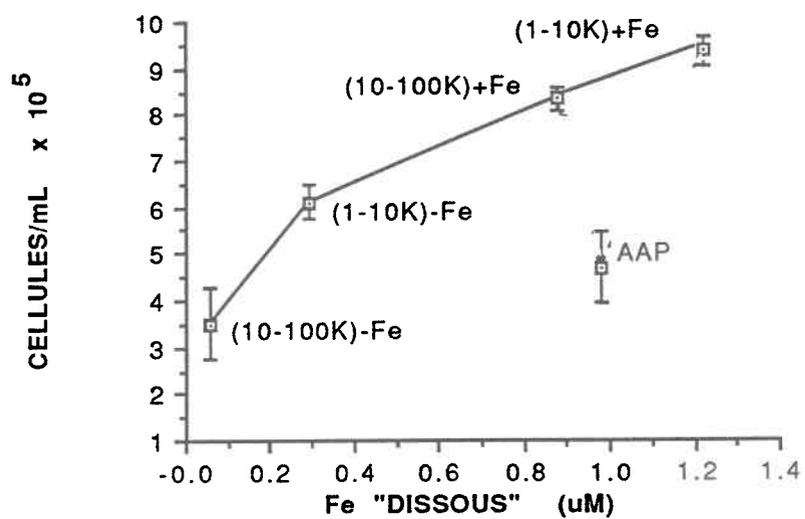
La présence potentielle d'acides fulviques dans la fraction 1-10K pourrait expliquer les effets observés en présence de matière organique. Thurman (1985) a associé des propriétés de solubilisation et de complexation des métaux à l'état de traces plus importantes à la fraction fulvique qu'à la fraction humique. De plus, les acides fulviques ont un potentiel réducteur plus élevé (Thurman 1985), ce qui pourrait entraîner une réduction plus efficace du Fe(III) lié. Thurman (1985) situe le poids moléculaire des acides fulviques entre 800 et 2000 daltons alors que le poids moléculaire des acides humiques serait de 2000 daltons et plus. Il devient alors possible de postuler que la plus grande stimulation de croissance relevée en présence de la fraction 1-10K serait due au fait qu'il y a une concentration adéquate d'acides fulviques dans cette fraction alors que ces-derniers sont absents dans la fraction 10-100K. D'ailleurs les concentrations en Fe filtrable sont plus élevées dans la

fraction (1-10K)-Fe que dans la fraction (10-100K)-Fe (tableau 5.1).

Certains auteurs ont rapporté que l'effet stimulateur d'agents chélateurs artificiels ou naturels serait surtout dû à leur effet indirect sur la biodisponibilité du phosphore (Storch et Dunham, 1986; Koenings et Hooper, 1976). Les chélateurs qui retardent la formation de précipités Fe-P préviendraient la diminution de la concentration de PO_4^{3-} de la phase dissoute. Il est cependant peu probable qu'un tel effet soit à l'origine des différences de croissance observée dans cette expérience, puisque Storch et Dunham (1986) n'ont relevé cet effet (dans des bioessais avec le milieu AAP) qu'à des concentrations de Fe de $3.6 \mu\text{M}$ et plus, ce qui est trois fois supérieur à la concentration maximale de Fe utilisé dans cette expérience ($1.2 \mu\text{M}$). Par ailleurs, la relation entre les concentrations de Fe dissous et les dénombrements cellulaires montrent bien toute l'importance de tenir compte des concentrations en Fe dissous pour expliquer les effets des deux fractions de MOD (fig. 5.2). Notons que cette relation ne s'applique qu'en présence de MOD. En absence de MOD (milieu AAP), le Fe filtrable n'est plus un bon indicateur de la quantité de Fe biodisponible (fig. 5.2) ce qui met en évidence la nature chimique différente du Fe en milieu inorganique.

La MOD utilisée dans cette expérience provenait d'un effluent d'eaux usées domestiques. Cette MOD était forcément

Figure 5.2 Relation entre les concentrations de Fe dissous (mesurées avant inoculation des algues) et les dénombrements au jour 8 dans chacun des milieux de culture



réfractaire puisqu'elle avait subi un traitement secondaire efficace par boues activées, comme les faibles concentrations de carbone organique dissous ($6.1 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) dans les eaux résiduaires l'indiquent. Les substances humiques aquatiques sont aussi reconnues comme étant de nature très réfractaire. Il serait donc plausible que la MOD de cette étude soit en grande partie composée de substances humiques. Plusieurs composés organiques réfractaires ayant des propriétés analogues aux acides fulviques et humiques ont été trouvés dans des effluents secondaires. Par exemple Ahel et al. (1987) y ont trouvé des concentrations élevées ($71 \text{ à } 330 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) d'acides alkylphénoxy carboxyliques, des produits du métabolisme de surfactants non ioniques, dont les groupements carboxyliques ont des propriétés complexantes pour les métaux à l'état de traces.

Outre les composés organiques ajoutés avec la MOD, les milieux de culture se sont aussi progressivement enrichis de produits extracellulaires résultant du métabolisme des algues et des bactéries. Il est possible que ces produits organiques aient atteint une concentration suffisante après quelques jours, pour jouer un rôle stimulateur dans la culture (10-100K)+Fe dont le développement s'est accru sensiblement lors des jours 4, 5 et 6 (figures 5.1 et 5.2). Cependant, si tel avait été le cas, en faisant l'hypothèse que les teneurs en Fe dissous dans le milieu AAP sont en excès par rapport au dénombrement cellulaire mesuré (voir tableaux 5.1 et 5.3), un accroissement aussi notable aurait été observé dans la culture témoin (AAP sans ajout) après

la phase de croissance exponentielle, celle-ci étant la seule culture où ces substances autochtones formaient l'unique réserve de matière organique. Etant donné que les valeurs de dénombrement et de VCT à la phase stationnaire de la culture (10-100K)+Fe sont significativement supérieures à celles de la culture témoin, on en déduit que ces métabolites ont eu un effet négligeable par rapport à la MOD ajoutée.

Le Fe complexé à la matière organique ne peut être pris en charge directement par les algues (sauf dans le cas d'agents de complexation spécifiques tels que les sidérophores). La dissociation des complexes Fe(III)-MOD étant donc nécessaire pour permettre la prise en charge du Fe, un second rôle de la MOD serait de favoriser cette dissociation par photoréduction. Ce processus a été décrit par Miles et Brezonik (1981): le complexe Fe(III)-MOD est réduit à la lumière (la réduction est beaucoup plus lente à l'obscurité) par transfert d'électrons du ligand au métal et le complexe Fe(II)-MOD, beaucoup moins stable, peut alors se dissocier. Cette question sera traitée au chapitre suivant.

5.5 Conclusions

Les expériences de croissance en présence et en absence de deux fractions moléculaires de MOD ont montré l'influence déterminante de la MOD sur la biodisponibilité du Fe et, en particulier, celle de la fraction de MOD de faible poids moléculaire

(1-10K), laquelle favorise davantage la biodisponibilité du Fe. Les résultats semblent aussi s'accorder avec les conclusions de Lewin et Chen (1971) et de Wells et al. (1983) selon lesquelles la biodisponibilité du Fe diminue avec le degré de vieillissement du colloïde ferrique, de même qu'avec les résultats de Finden et al. (1984) qui ont observé que la présence de substances humiques réduisait les effets négatifs du vieillissement des oxydes ferriques. Le rôle de la MOD serait de 1) stabiliser le colloïde ferrique et ainsi prévenir sa coagulation, ce qui l'empêche de devenir progressivement plus réfractaire et 2) de favoriser le flux de Fe biodisponible par dissociation (photochimique ou non). Les résultats indiquent que les concentrations initiales de Fe filtrable, dosées chimiquement, sont un indicateur des concentrations de Fe biodisponible (fig. 5.2).

En général, les résultats montrent que la MOD réfractaire à un traitement d'eaux usées conventionnel, présente à des concentrations de MOD typique des concentrations relevées dans les eaux réceptrices, a un potentiel pour améliorer la disponibilité du Fe.

EFFET D'UNE FRACTION DE MATIÈRE ORGANIQUE DISSOUE SUR LA BIODISPONIBILITÉ DE L'OXYHYDROXYDE DE FER POUR LE PHYTOPLANCTON

6.1 Introduction

Tel que mentionné au chapitre 2, les agents chélateurs organiques sont soupçonnés de favoriser la biodisponibilité du Fe en permettant le maintien de quantités appréciable de Fe non sédimentable dans la colonne d'eau et en contribuant à la dissociation du Fe colloïdal (Anderson et Morel, 1982; Finden et al., 1984). Les résultats obtenus par Finden et al. (1984) sur la croissance d'une algue d'eau douce soumise à diverses sources de Fe ont appuyé cette hypothèse. En effet, ces auteurs ont établi une corrélation entre la photoréduction des colloïdes de Fe induite par des substances humiques et la stimulation de croissance d'une algue d'eau douce (chapitre 2). Ils ont conclu que la dissolution photoréductive des colloïdes ferriques était

un processus en relation directe avec la biodisponibilité du Fe. Le mode d'action des substances humiques serait d'absorber l'énergie lumineuse, laquelle activerait un transfert de charge dans le complexe Fe(III)-MO; le Fe réduit peut alors se dissocier du complexe plus facilement (Miles et Brezonik, 1981). Des substances organiques ayant des propriétés analogues à celles des substances humiques (groupements chromophores, groupes fonctionnels) seraient ainsi susceptibles de catalyser les réactions de photodissolution. Jusqu'à présent la stimulation de la photodissolution n'a été observée qu'avec le citrate (Waite et Morel, 1984a), des acides fulviques (Waite et Morel, 1984b) et des substances humiques non caractérisées (Finden et al., 1984).

Par ailleurs, lors d'expériences préliminaires, Bender et al. (1970) ont observé que l'activité photosynthétique in situ de populations algales naturelles était stimulée en présence d'une fraction de MOD de faible poids moléculaire (500-1000 daltons) extraite de l'effluent d'un traitement secondaire d'eaux usées. De plus, ils ont noté, lors de 4 essais (non répétés) sur 6, une stimulation additionnelle suite à un ajout de Fe. Cependant, le faible nombre d'échantillons et l'absence d'une relation claire entre l'activité photosynthétique et la croissance du phytoplancton ne leur ont pas permis d'établir que l'effet de la MOD était en relation avec la biodisponibilité du Fe.

Une expérience précédente (voir chapitre 4) a démontré qu'une fraction de MOD de faible poids moléculaire (1000 à 10 000 daltons), extraite d'un effluent secondaire, stimulait la croissance de l'algue verte *S. capricornutum*. Cette stimulation, qui semblait être reliée à la biodisponibilité des métaux à l'état de traces, indiquait que cette fraction de MOD pouvait accroître la biodisponibilité du Fe. Une expérience subséquente (chapitre 5) a confirmé que la MOD, provenant de la même usine d'épuration, pouvait aussi favoriser la croissance de *S. capricornutum* après que les milieux de culture aient vieilli pendant 48 h. Ceci laissait supposer que la MOD pouvait prévenir les effets du vieillissement des colloïdes ferriques, similairement à ce qui avait été observé par Lewin et Chen (1971, 1973) avec l'EDTA et, par Finden et al. (1984) avec des substances humiques lacustres. Cette dernière expérience avait aussi démontré que la croissance était stimulée davantage (significatif à $\alpha = 0.05$) en présence de la fraction de faible poids moléculaire (1000-10 000 daltons) qu'en présence de l'autre fraction (10 000-100 000 daltons).

Comme le Fe des milieux d'eaux douces naturels de pH 6.5 à 8 est surtout sous forme de particules ou de colloïdes d'oxydes ferriques, il est prévisible que la présence de substances complexantes organiques déterminera dans quelle mesure ces formes ferriques peuvent former une réserve de fer biodisponible. L'objectif du présent chapitre est de vérifier si la fraction de MOD (poids moléculaire de 1000 à 10 000

daltons) identifiée comme étant la plus active au chapitre 5, ainsi que par Langis et al. (1986), favorise la biodisponibilité des oxyhydroxydes de Fe pour *S. capricornutum*.

Cet objectif est atteint en comparant la croissance de l'algue verte *S. capricornutum* dans des milieux de culture en présence et en absence de MOD, alors que le Fe est ajouté sous forme de précipités et de colloïdes. De plus, afin d'obtenir une appréciation plus directe de la biodisponibilité du Fe, une expérience de prise en charge a été réalisée à partir de colloïdes et précipités marqués avec le traceur ^{59}Fe . L'effet de la MOD lors de la formation des colloïdes ou des précipités ferriques (situation plus commune en milieu naturel) est distingué de l'effet de la MOD sur des colloïdes ou précipités pré-formés sans MOD.

Parallèlement aux bioessais, les processus de dissolution des colloïdes et précipités de Fe ainsi que de photoréduction du Fe(III), sont suivis dans les mêmes milieux de culture non inoculés. Ceci a été réalisé pour tenter de relier l'augmentation du flux de Fe, conséquente au phénomène de photodissolution en présence de substances organiques, à la biodisponibilité du Fe.

L'absence de méthodes standardisées pour préparer des précipités d'oxyhydroxydes ferriques rend difficile la comparaison des résultats expérimentaux présentés dans la lit-

térature. C'est pourquoi les oxyhydroxydes de Fe utilisés pour cette expérience ont été préparés selon une méthode qui a été bien définie par Crosby et al. (1983). De plus, comme le Fe dans les eaux oxygénées des lacs naturels provient en grande partie de la diffusion verticale du Fe réduit dans les sédiments ou encore dans les eaux anoxiques de l'hypolimnion (Davison, 1985), les oxyhydroxydes sont préparés à partir du Fe^{2+} . Cette distinction est importante, puisque Crosby et al. (1983) ont observé que la taille, la morphologie et les capacités d'adsorption des précipités diffèrent selon qu'ils sont préparés à partir du Fe^{2+} ou du Fe^{3+} .

6.2 Matériel et méthodes

Comme pour les expériences précédentes (chapitres 4 et 5), la MOD provenait de l'effluent secondaire de l'usine d'épuration de Valcartier; la même technique d'extraction de la MOD a été employée pour l'extraction de la fraction 1-10K.

Afin de débarrasser la fraction de MOD de la plus grande partie de Fe résiduel, celle-ci a été traitée en vrac avec une résine Chelex 100 (Laboratoires Bio-Rad, 100-200 "mesh"). La résine a été préparée selon la méthode de Figura et McDuffie (1977), telle que modifiée par Campbell et al. (1983); elle a été employée à raison de 2.5 g (poids humide) par L de solution à traiter. Après une période de contact de 24 h avec agitation continue, aucune trace de Fe réactif à la ferrozine (Stookey,

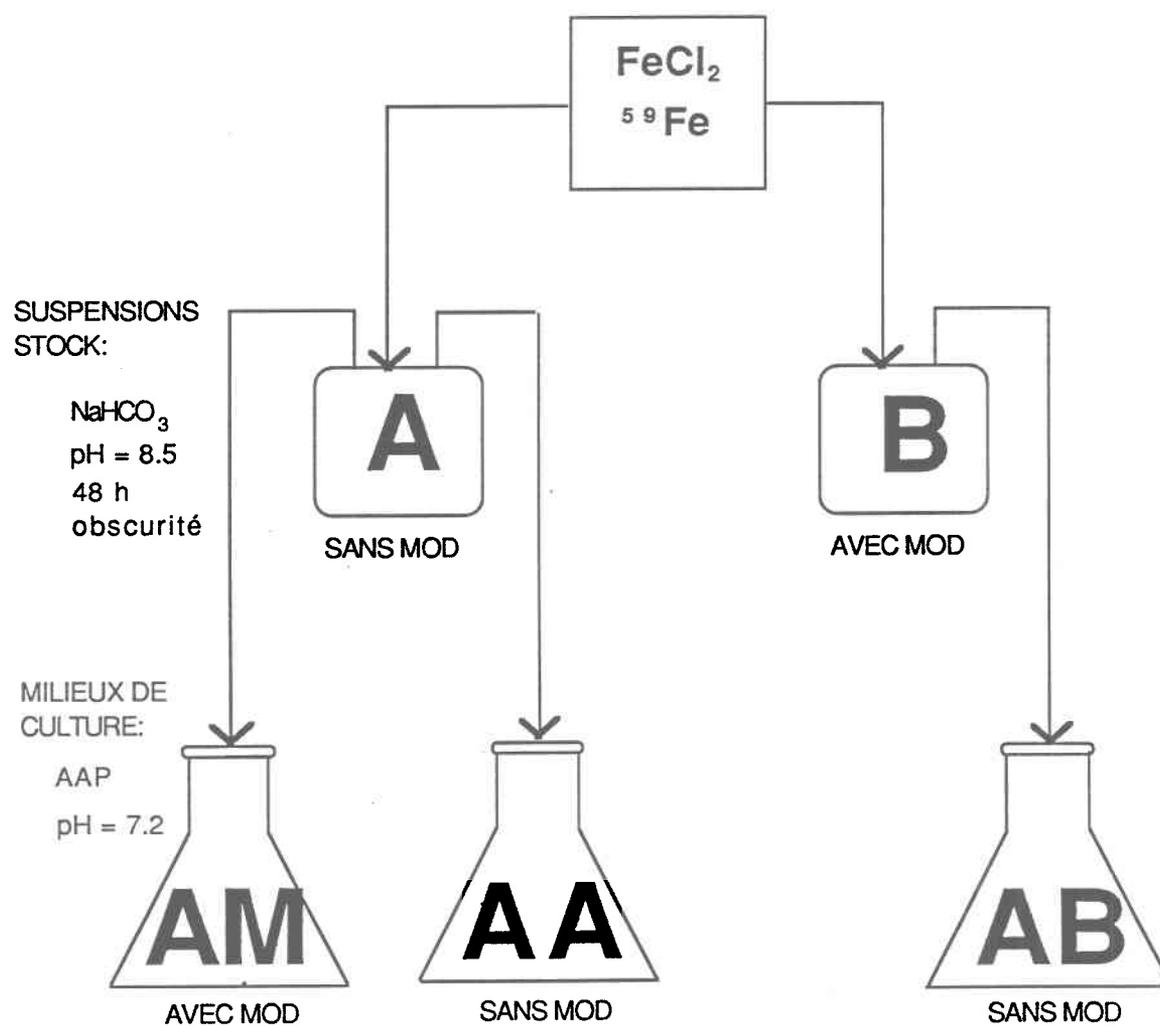
1970) n'a été décelée dans le filtrat. Plusieurs filtrations sur filtres Nuclepore (0.2 μm) furent nécessaires pour débarrasser la solution de toutes les particules de résine.

6.2.1 Expérience de croissance

Les deux suspensions d'oxyhydroxydes de Fe ont été préparées par la méthode de Crosby et al. (1983): 1) dans une solution de NaHCO_3 (2 mM) à pH 8.5 (suspension "A"), 2) dans la solution de MOD (suspension "B"), dont le pH était également ajusté à 8.5 avec du NaHCO_3 . Du FeCl_2 (0.05 M) a été ajouté à chaque solution (concentration finale 10^{-4} M); les solutions ont été conservées à $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$, à l'obscurité pendant 48 h sur une plaque oscillante réglée à environ 60 oscillations par min. En plus des raisons évoquées dans l'introduction, le Fe est ajouté à la suspension "B" sous la forme Fe(II) afin de maximiser la formation de complexes MOD-Fe(III) (voir chapitre 5). Aucune trace de Fe(II) n'a été décelée par le complexe ferrozine dans la suspension "A" après 48 h, alors que $0.54 \mu\text{M}$ de Fe(II) (0.5 % du Fe ajouté) a été décelée dans la suspension "B".

Trois milieux de culture ont été préparés (figure 6.1): 1) le milieu AM, lequel était préparé à partir de la solution de MOD, à laquelle tous les éléments du milieu AAP modifié (voir chapitre 3) étaient ajoutés, sauf le Fe qui provenait de la suspension "A" (concentration finale et totale de $1 \mu\text{M}$ Fe); celui-ci était ajouté après la remise en suspension des

Figure 6.1. Préparation des milieux AM, AA et AB.



précipités par une vigoureuse agitation; 2) le milieu contrôle AA, préparé dans le milieu AAP, où le Fe était également ajouté à partir de la suspension "A" (même concentration finale); 3) le milieu AB, aussi préparé dans le milieu de culture AAP modifié, mais dont le Fe provenait de la suspension "B" (même concentration finale que AA et AM). La distinction entre les milieux AB et AM devait permettre de voir si la présence de MOD lors de la formation des particules de Fe pouvait influencer leur photoréactivité et, par conséquent, la biodisponibilité du Fe. Afin de limiter les interactions Fe-phosphore, les concentrations de P réactif ont été ajustées dans tous les milieux à la valeur minimale de $3.3 \mu\text{M}$, ce qui est inférieur à la concentration habituelle de P du milieu AAP ($6 \mu\text{M}$). La distribution des espèces et des complexes, calculée à l'aide du modèle d'équilibre chimique MINEQL (Westall et al., 1976) pour un pH fixe de 7.2, a montré qu'il ne devrait pas y avoir formation de complexes ou de précipités Fe-P dans le milieu AAP modifié: 99.9 à 100% du Fe est sous forme de $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{s})$. Le pH de chaque milieu a été ajusté avec du NaOH dilué et tamponné à 7.2 par un ajout initial de HEPES (acide N-2-hydroxy-éthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique; concentration finale de 0.4 mM), reconnu pour avoir une capacité de complexation négligeable (Good et al., 1966). Cette concentration de tampon s'était révélée suffisante pour stabiliser le pH des cultures pendant 3 jours de croissance lors d'expériences préliminaires, ce qui correspond à la période durant laquelle les cellules sont

en début de croissance exponentielle et assimilent la plus grande partie des substances nutritives.

Chaque milieu (50 mL x 3) a ensuite été inoculé avec *S. capricornutum* pour obtenir une concentration initiale de 4.8×10^3 cellules \cdot mL⁻¹ dans des fioles coniques de 250 mL en polycarbonate. Afin de minimiser les apports de Fe additionnels provenant du milieu de culture, l'inoculum a, au préalable, été lavé et centrifugé (800 x g) à deux reprises avec du milieu AAP (sans oligo élément) par centrifugation (800 x g). De plus, les cellules provenaient d'une culture stock de *S. capricornutum* carencée en Fe en ayant été maintenue dans du milieu AAP sans Fe et sans EDTA. L'inoculum était maintenu en phase exponentielle en remplaçant quotidiennement 50% du volume de la culture par du milieu AAP frais (sans Fe et EDTA) pendant les 2 à 3 jours précédant l'expérience. Les cultures (en triple) ont été maintenues sous lumière continue de 112 ± 3 μ Einstein \cdot m⁻² \cdot s⁻¹ à une température de 20°C \pm 0.1°C et sous agitation constante modérée (60 oscillations par min).

La croissance dans chaque milieu a été suivie quotidiennement par mesure des comptes cellulaires et des volumes cellulaires totaux (VCT) (voir chapitre 5). Les comparaisons des croissances de chaque traitement sont faites à partir des surfaces sous les courbes de croissance (Wong et Couture, 1986) afin de tenir compte de la période de croissance globale. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de tests non

paramétriques, à savoir le test de Kruskall-Wallis pour l'ensemble des données et le test de Mann-Whitney-Wilcoxon (Sherrer, 1984) pour obtenir les seuils de signification des différences entre les traitements.

6.2.3 Expérience de prise en charge du Fe

Pour l'expérience de prise en charge, les divers milieux de culture étaient préparés de la même manière que pour l'expérience de croissance sauf qu'ici, du $^{59}\text{FeCl}_3$ (activité finale de $1 \text{ mCi}\cdot\text{L}^{-1}$, ou concentration de $0.84 \mu\text{M}$) a été ajouté en même temps que le FeCl_2 dans les suspensions "A" et "B". Quoique le radioisotope de Fe ait été ajouté à l'état d'oxydation +3, celui-ci était vraisemblablement isotopiquement échangé avec l'excès de FeCl_2 (100 fois plus concentré) avant que ce-dernier soit complètement oxydé ou, encore, était incorporé (ou adsorbé) aux colloïdes et précipités ferriques lors de leur formation. Les milieux de culture AA, AM et AB étaient ensuite préparés tels que décrits plus haut et immédiatement placés sur une plaque oscillante à température ($20 \pm 0.1^\circ\text{C}$) et lumière ($280 \pm 3 \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) contrôlées.

Les expériences de prise en charge ont été répétées à deux reprises, soit 21 h après la préparation des milieux de culture et 42 h après afin de tenir compte d'une possible évolution de la dynamique de la dissolution des précipités et colloïdes. Chaque expérience se déroulait de la façon suivante: au temps

zéro (c'est-à-dire, $t=21$ ou $t=42$ h), un inoculum de 5×10^5 cellules \cdot mL $^{-1}$ (concentration finale) était ajouté à un volume de 26 mL prélevé dans chaque milieu expérimental et préalablement transvidé dans des fioles coniques en polycarbonate de 250 mL. Un inoculum 100 fois plus concentré que celui utilisé pour l'expérience de croissance était nécessaire afin de faciliter la détection du Fe radioactif dans les algues à la fin de la période de prise en charge (20 min). Avant d'être ajouté aux milieux expérimentaux, l'inoculum carencé en Fe était préparé tel que décrit précédemment.

Afin de distinguer entre l'activité du Fe dans les cellules et celle du Fe associé aux précipités, à $t=20$ min, quatre échantillons de 4 mL étaient prélevés dans chaque milieu et déposés avec précaution dans une éprouvette à centrifugation contenant 2 mL de Percoll (la justification de l'emploi de Percoll est décrite au paragraphe suivant), puis centrifugé à $800 \times g$ pendant 15 min. Après centrifugation, le surnageant (4 mL) était prélevé avec une pipette graduée en s'assurant de bien capter toutes les cellules (les cellules étaient suffisamment denses pour être facilement distinguées à la surface du Percoll). Les deux premiers mL du surnageant étaient immédiatement filtrés sur des filtres Nuclepore à porosité de 1 μ m; l'activité isotopique du filtre était déterminée sur un compteur γ (LKB Wallac, modèle 1282) et était considérée comme étant la fraction totale de Fe associé aux algues. De l'EDTA en excès (10^{-3} M) était ajouté aux deux mL résiduels; après 20 min

ceux-ci étaient filtrés à leur tour. L'activité isotopique de ces derniers filtres est associée au Fe non extractible à l'EDTA, ce qui est une estimation du Fe pris en charge par les cellules (Bates et al., 1982; Schenck et al., 1988).

L'utilisation du Percoll s'est révélée nécessaire afin de séparer les cellules des précipités de Fe avant la filtration; en effet, une expérience préliminaire avait démontré que la majeure partie des précipités était arrêtée par un filtre de 1 μm (premier de 2 filtres superposés), ce qui empêchait de distinguer la part de l'activité isotopique associée aux cellules de celle associée aux particules de Fe (tableau 6.1). Cet essai a aussi permis de constater que la part de Fe en solution qui adhérerait aux filtres était négligeable. En effet, une activité moyenne de 90 comptes par min (écart-type de 40) a été relevée sur les filtres du dessous des 2 filtres superposés. Les gradients de Percoll ont été utilisés avec succès pour distinguer les diverses densités cellulaires de l'algue *Scenedesmus obliquus* sans pour autant causer de choc osmotique (Lavoie et al., 1986). A la suite d'une série d'essais sur des gradients de Percoll étagés, une densité de Percoll de $1.07 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a été sélectionnée; celle-ci permettait de conserver les cellules de *S. capricornutum* (échantillonnées en phase de croissance exponentielle) dans le surnageant et permettait aux précipités de Fe de rejoindre le culot suite à une centrifugation très modérée (800 x g). Les résultats résumés au tableau 6.2 montrent que cette technique parvient

TABLEAU 6.1. Activité (^{59}Fe , comptes par minute) recueillie sur des filtres Nuclepore à partir du milieu AA marqué au ^{59}Fe ($10^{-2} \text{ mCi}\cdot\text{L}^{-1}$), inoculé avec $10^5 \text{ cellules}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou non inoculé (valeurs moyennes pour quatre filtrations en parallèle, \pm écart-type)

	Temps d'incubation (min)			
	0	30	60	120
AVEC ALGUES totale ¹	1994	1666	1956	1890
	(± 125)	(± 200)	(± 110)	(± 93)
non extractible ²	1749	1736	2005	1897
	(± 210)	(± 130)	(± 60)	(± 178)
SANS ALGUES totale ¹	—	—	—	1813
				(± 213)
non extractible ²	—	—	—	1848
				(± 89)

¹ Activité totale= suspensions filtrées sans pré-traitement

² Activité non extractible= suspensions traitées avec l'EDTA (10^{-3} M , 20 min), puis filtrées.

TABLEAU 6.2 Distribution des pourcentages de l'activité isotopique totale mesurés dans des gradients étagés de Percoll à partir des suspensions "A" et "B" sans algues. (valeurs moyennes pour quatre déterminations \pm écart-type)

DENSITE DE PERCOLL ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	SUSPENSION "A" %	SUSPENSION "B" %
1.00 (surnageant)	1.5 ± 0.2	35.6 ± 3.9
1.04	2.3 ± 0.4	29.1 ± 3.5
1.07	1.2 ± 0.2	7.8 ± 2.4
1.10	0.6 ± 0.1	2.8 ± 0.5
1.13 (100% Percoll)	94.8 ± 1.0	24.8 ± 1.0

presqu'à éliminer les précipités de la suspension A du surnageant, mais ne permettait cependant pas de débarrasser le surnageant des colloïdes de Fe de la suspension B. En effet, une partie importante des colloïdes de Fe présents dans ce milieu avaient une densité équivalente à celle des algues. Il devenait alors possible de séparer ces colloïdes des algues par une simple filtration subséquente sur un filtre de porosité de 1.0 μm , seules les algues étant retenues sur le filtre.

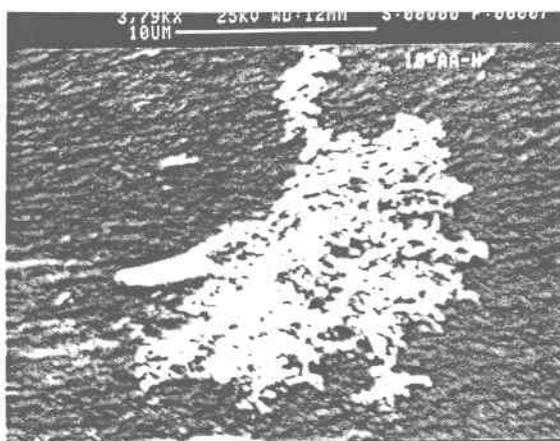
La présence de colloïdes de Fe dans les milieux AA, AM et AB a été confirmée par des observations faites sur des membranes filtrantes à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB), modèle Cambridge S200 (fig. 6.2). Les échantillons pour le MEB étaient préparés en filtrant un volume de 5 mL provenant de chaque milieu de culture sur une membrane Nuclepore à porosité de 0.1 μm . Ces membranes étaient alors traitées avec 2 mL d'acétone (100%), séchées sous vide à température ambiante et recouvertes d'une couche de platine. La composition de ces colloïdes a été confirmée comme étant surtout du Fe par microanalyse avec un spectromètre en diffraction d'énergie, modèle LINK AN-10 000 (Un spectre typique est présenté à la figure 6.3)

6.2.4 Expérience de dissolution et de réduction

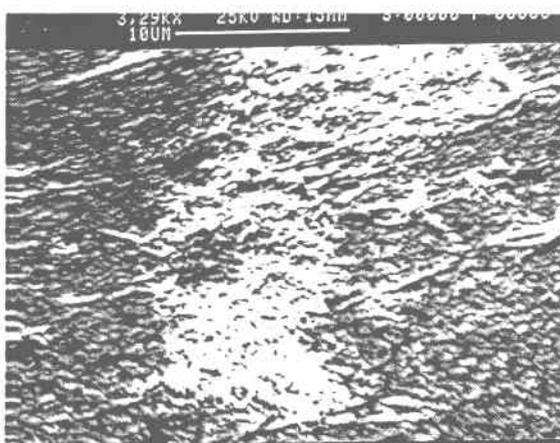
L'expérience de photoréduction a été réalisée avec les mêmes milieux (AM, AA et AB: sans algues) exposés aux mêmes

Figure 6.2. Photographies par MEB des particules de Fe des milieux (A) AA, (B) AM et (C) AB

A)



B)



C)

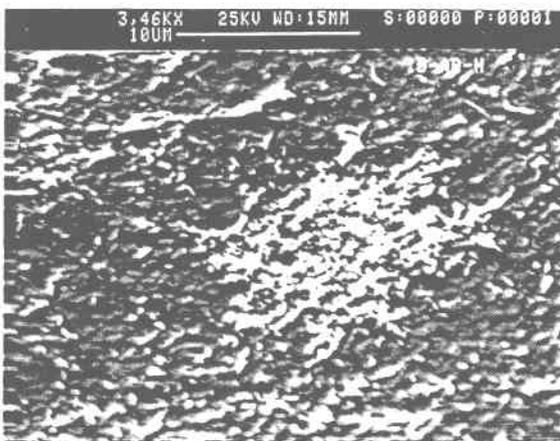
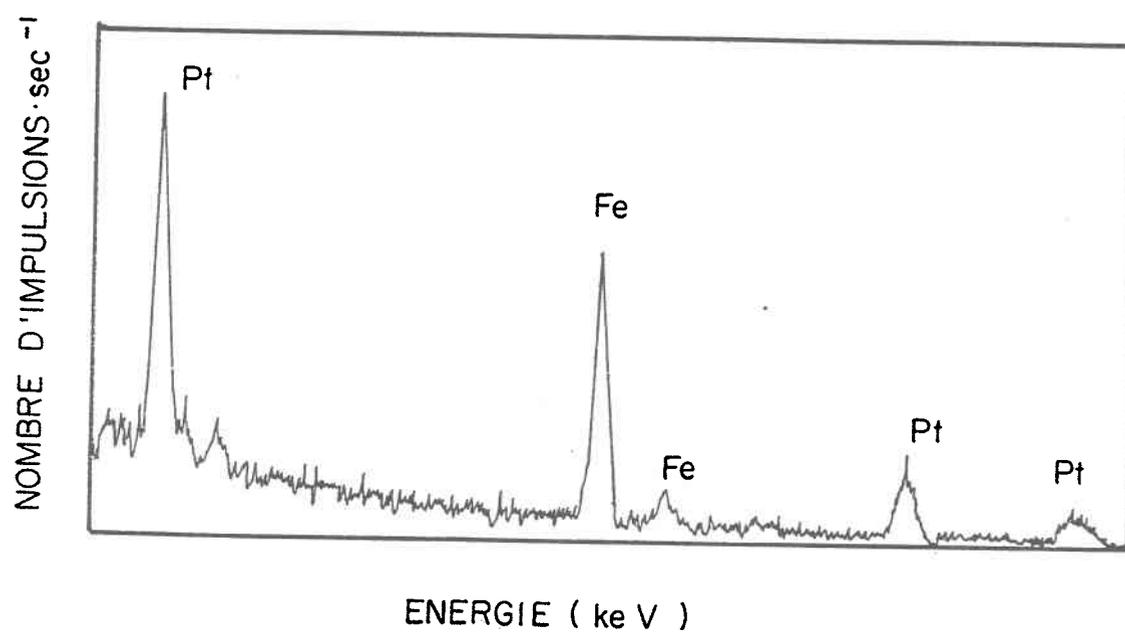


Figure 6.3. Spectre en diffraction d'énergie obtenu à partir de particules du milieu AA



conditions de lumière, de température et d'agitation que dans les expériences de croissance et de prise en charge. Bien que ces milieux aient été stériles au début de l'expérience, aucune précaution particulière n'a été prise pour assurer la stérilité de chaque milieu par la suite. Chaque milieu était divisé en deux portions de 200 mL et placé dans des fioles coniques de 250 mL en polycarbonate. Une fiole pour chaque type de milieu était recouverte de papier d'aluminium pour la soustraire à l'influence de la lumière. A $t = 0$, ainsi qu'à $t = 16, 23, 40$ et 45 h, soit avant et après chaque expérience de prise en charge ($t = 21$ et 42 h), divers prélèvements étaient faits dans chacune des fioles afin de déterminer l'état de la photoréduction et de la dissociation des précipités.

Le degré de photoréduction était immédiatement estimé par le dosage du Fe(II) selon la méthode de la ferrozine (chapitre 3). Pour estimer le degré de dissolution des précipités, des portions de 5 mL de chaque milieu étaient filtrées sur des membranes Nuclepore à porosité de $0.1 \mu\text{m}$. Le premier mL était rejeté afin de limiter l'effet d'adsorption sur la membrane; l'activité isotopique était mesurée sur 4 mL de filtrat et sur les filtres avec un compteur γ .

6.3 Résultats

6.3.1 Expérience de croissance

Les résultats montrent que la croissance des cellules, autant pour le nombre de cellules que pour les volumes cellulaires totaux (VCT), a été meilleure dans le milieu AM que dans les milieux AB et AA (fig. 6.4). Les valeurs de surface sous la courbe de croissance, calculées à partir des dénombrements ou des VCT de la culture AM, étaient significativement supérieures ($\alpha = 0.05$) aux valeurs d'aires sous les courbes des deux autres milieux; aucune différence significative n'a été trouvée entre les valeurs des surfaces sous la courbe des milieux AB et AA (tableau 6.3).

6.3.2 Expérience de dissolution et de réduction

La présence de MOD semble avoir un effet positif sur la dissolution des précipités et colloïdes de Fe comme l'indiquent les pourcentages de Fe radioactif total mesurés dans les filtrats ($< 0.1 \mu\text{m}$) des milieux expérimentaux à la lumière et à l'obscurité (fig. 6.5). En effet, on observe que la dissolution des précipités de Fe du **milieu AM** a augmenté dès que ceux-ci sont entrés en contact avec la MOD à la lumière. Le pourcentage de dissolution a atteint un maximum après 16 h et a diminué brusquement par la suite. La dynamique de dissolution des particules de Fe à l'obscurité semble plus lente, puisque

Figure 6.4. Courbes de croissance de *S. capricornutum* dans les milieux AA, AM et AB, obtenues à partir, (a) des valeurs de dénombrement ($\text{cellules} \cdot \text{mL}^{-1} \times 10^6$) et (b) des valeurs de VCT ($\text{nL} \cdot \text{mL}^{-1}$)

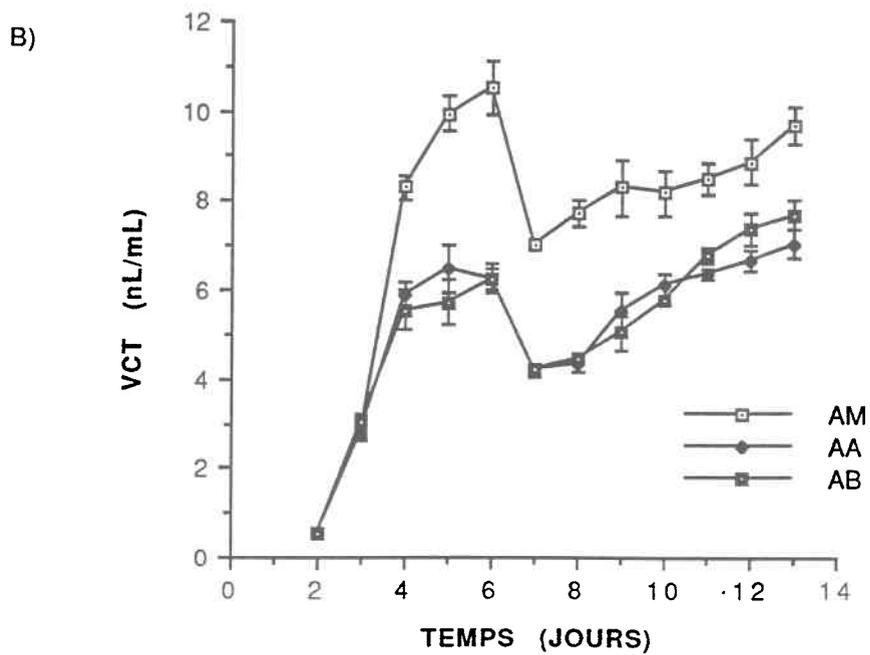
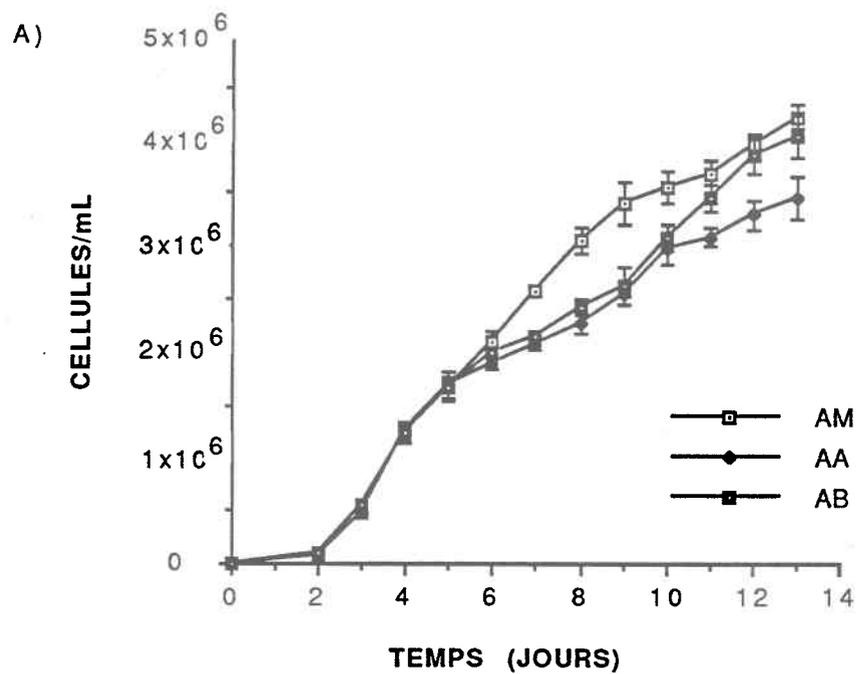


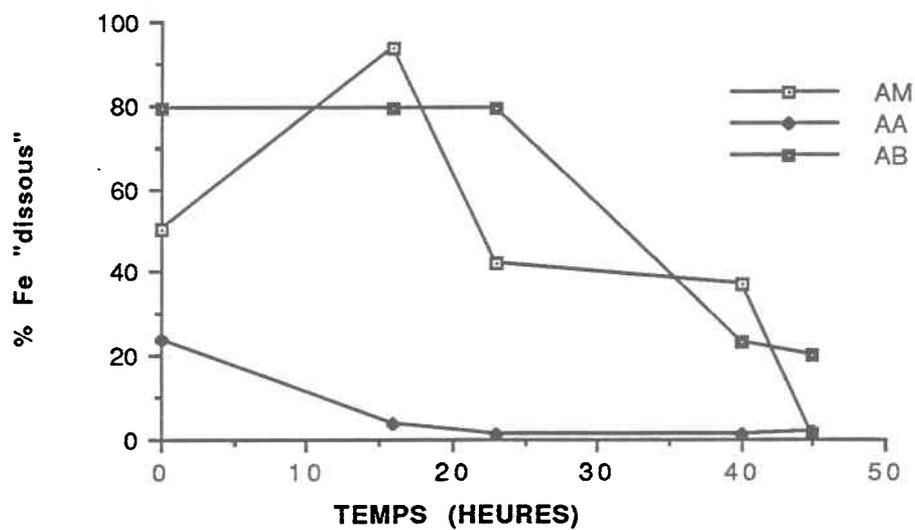
TABLEAU 6.3. Valeurs des surfaces sous les courbes de crois-
sances pour les trois milieux de culture (AM, AA et AB).
Moyennes de trois mesures faites en parallèle \pm écart type

	Milieux de culture		
	AM	AA	AB
dénombrement (cell. \cdot mL ⁻¹ x 10 ⁶)	27.90 \pm 0.73 ^a	23.40 \pm 0.94	25.22 \pm 1.13
VCT (μ l \cdot mL ⁻¹ x 10 ⁻⁹)	8.43 \pm 0.20 ^a	5.61 \pm 0.12	5.64 \pm 0.14

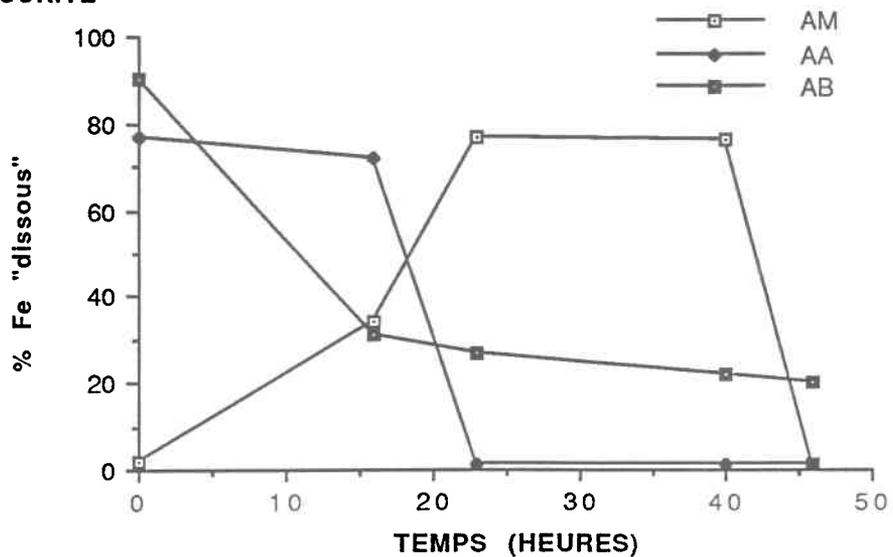
^a différence significative ($\alpha= 0.05$) entre traitements

Figure 6.5. Pourcentages de ^{59}Fe obtenus dans les filtrats ($0.1\ \mu\text{m}$) des milieux AA, AM et AB, (a) à la lumière et (b) à l'obscurité.

A) LUMIERE



B) OBSCURITE

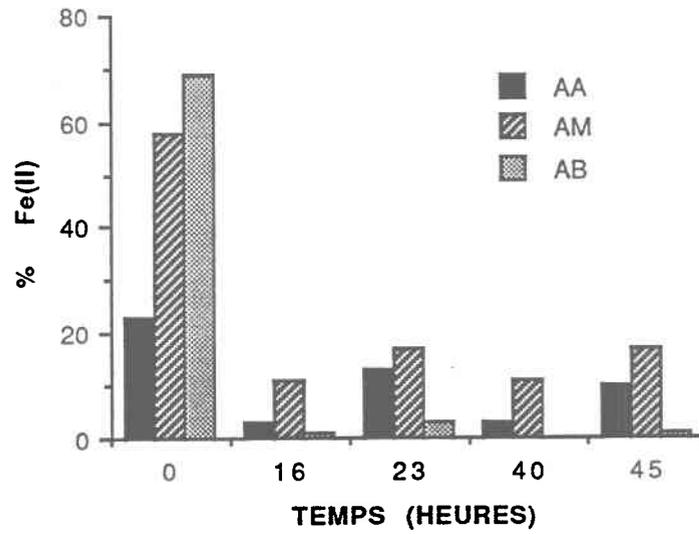


dans le milieu AM le pourcentage de dissolution a atteint les valeurs les plus élevées 7 h plus tard. L'effet de la lumière semble plus évident dans le cas du milieu AB, où la quantité de Fe filtrable reste importante jusqu'à 24 h après le début de l'expérience à la lumière, alors qu'à l'obscurité elle atteint des valeurs presque trois fois plus faibles après seulement 16 h. Par contre, dans le milieu AA, on observe, à la lumière comme à l'obscurité, une diminution importante suivie de valeurs presque négligeables de la quantité de Fe filtrable de 23 h à 46 h après le début de l'expérience. En général, les réactions de dissolution apparaissent limitées par un ou plusieurs facteur(s), comme le suggèrent les chutes brusques des quantités de Fe filtrable observées dans tous les milieux.

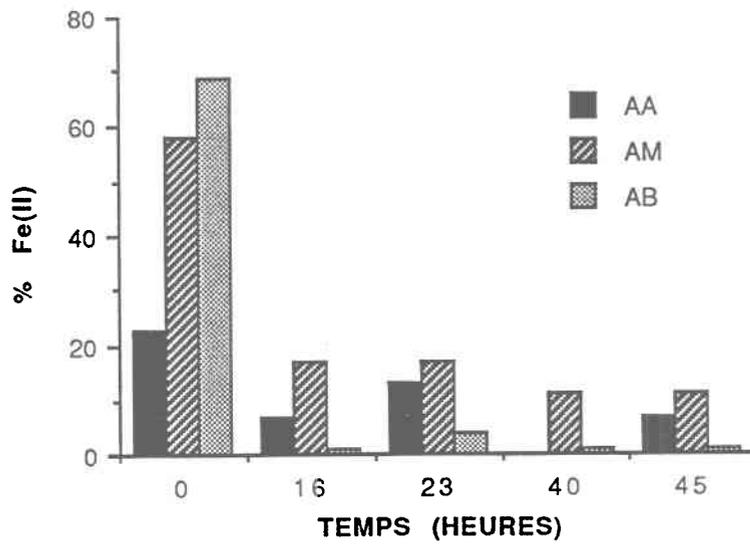
La présence de MOD semble aussi favoriser la réduction des oxyhydroxydes de Fe même si peu de Fe(II) est maintenu dans chaque milieu (fig. 6.6a, b). A la lumière comme à l'obscurité, à $t=0$, on trouve le plus grand pourcentage de Fe réduit dans le milieu AB (69%), le milieu où le colloïde était formé en présence de matière organique, suivi du milieu AM (58%) où les précipités de la suspension "A" commencent à subir l'influence de la MOD. Le plus faible pourcentage initial de Fe(II) est observé dans le milieu AA (23%), lequel est entièrement dépourvu de matière organique. Les résultats ne montrent pas d'effet de la lumière sur le pourcentage de Fe réduit.

Figure 6.6 Pourcentages de Fe(II) dans les milieux AA, AM et AB, (a) à la lumière et (b) à l'obscurité

A) LUMIERE



B) OBSCURITE



Une diminution importante de la quantité de Fe(II) dans tous les milieux peut être observée durant les premières 16 h. Cette diminution, particulièrement importante dans le cas du milieu AB, suggère que la réaction de réduction du Fe(III), tout comme la réaction de dissociation, est contrôlée par les concentrations en MOD. En effet, le pourcentage plus élevé de Fe(II) observé dans le milieu AM, après la diminution initiale, est probablement un résultat de la plus grande disponibilité de MOD dans ce milieu ($2.40 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$) par rapport au milieu AB ($0.02 \text{ mg C}\cdot\text{L}^{-1}$).

6.3.3 Expérience de prise en charge

Tout comme pour les expériences de croissance et de dissolution-réduction, la MOD a exercé une influence sur la prise en charge du Fe (tableau 6.4). On peut noter que la technique d'extraction à l'EDTA n'a pas eu d'effet notable (sauf pour AA à $t= 42 \text{ h}$) sur les valeurs de radioactivité associées aux cellules, ce qui indique qu'il n'y avait que peu de Fe "adsorbé". Signalons que la centrifugation des cellules sur Percoll aurait pu contribuer à désorber du Fe faiblement lié à leur surface. Comme une meilleure reproductibilité a été obtenue avec les échantillons extraits à l'EDTA, sauf dans le cas des résultats du milieu AM (à $t= 42 \text{ h}$), la discussion portera sur la fraction non extractible à l'EDTA.

TABLEAU 6.4. Prises en charge du ^{59}Fe lors des expériences réalisées à $t=21$ h et $t=42$ h. Valeurs moyennes de l'activité isotopique (^{59}Fe , comptes par minute) pour trois à quatre filtrations en parallèle \pm écart-types

	Milieux de culture		
	AA	AM	AB
t= 21 h			
totale ¹	341 \pm 85 ^a	229 \pm 105 ^a	88 \pm 22
non extractible ²	231 \pm 53 ^a	271 \pm 95 ^a	80 \pm 13
t= 42 h			
totale ¹	208 \pm 204 ^a	516 \pm 21 ^a	29 \pm 28
non extractible ²	44 \pm 9	583 \pm 128 ^a	77 \pm 22

¹ Activité totale= suspensions filtrées sans pré-traitement

² Activité non extractible= suspensions traitées avec l'EDTA (10^{-3} M, 20 min), puis filtrées.

^a différence significative ($\alpha=0.05$) entre traitements

Les deux expériences de prise en charge du Fe radioactif ont montré une prise en charge du Fe supérieure dans le milieu AM par rapport aux deux autres milieux (tableau 6.4). Dans le cas de l'expérience réalisée 21 h après la préparation des milieux expérimentaux, les différences entre les valeurs obtenues dans les milieux AM et AA ne sont, cependant, pas significatives. Toutefois, lors de l'expérience de prise en charge réalisée 42 h après cette préparation, les quantités de Fe non extractibles à l'EDTA obtenues avec les algues du milieu AM sont significativement supérieures aux quantités mesurées chez les algues des milieux AA et AB.

6.4 Discussion

Les résultats des expériences sur la croissance, la prise en charge, la dissolution et la réduction ont montré le rôle prépondérant de la matière organique dans les réactions régissant la biodisponibilité du Fe.

6.4.1 Dissolution et réduction

Les expériences de dissolution et de réduction ont démontré que la MOD jouait un rôle important dans le maintien d'une réserve de Fe réduit par son influence sur la dissolution des particules à la lumière et à l'obscurité. Cette différence s'estompe cependant à $t = 45$ h.

A la lumière, les quantités de Fe filtrable ($<0.1 \mu\text{m}$) ont diminué dans tous les milieux au fur et à mesure que les particules vieillissaient (fig. 6.5a). En général, la présence de la MOD a permis de maintenir une plus grande quantité de formes filtrables "en solution". Nos résultats s'accordent avec ceux de Waite et Morel (1984b) qui avaient obtenu un taux de dissolution positif d'oxyhydroxydes ferriques en présence d'acides fulviques comme en présence de citrate. Les conditions étaient cependant différentes de celles rapportées ici, leurs résultats ayant été obtenus avec une intensité lumineuse de $50\,000 \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (irradiation solaire simulée) et à des pH de 4 et de 6.5. Ils avaient cependant obtenu des taux de dissolution presque négligeables à l'obscurité. Dans le cas présent, les valeurs obtenues à l'obscurité varient globalement de la même façon qu'à la lumière pour les milieux AA et AB, alors que pour le milieu AM, une forte dissolution est apparente 16 h après le début de l'expérience. Les résultats obtenus dans les milieux AM et AB à l'obscurité, quoiqu'inattendus, indiquent que la MOD serait capable de favoriser la dissolution en absence de lumière. Les pourcentages élevés de Fe filtrable obtenus dans le milieu AA à l'obscurité à $t=0$ et à $t=16$ h ont été suivis de valeurs nulles jusqu'à la fin de l'expérience et pourraient donc être le résultat d'un filtre déplacé ou encore déchiré.

Ces derniers résultats sont appuyés par l'expérience de réduction, où aucun effet significatif de la lumière n'a été

détecté (fig. 6.6). Waite et Morel (1984c) n'avaient, eux aussi, observé qu'un effet mineur de la lumière (même à $50\,000\ \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sur l'échange du Fe entre un complexe Fe-acide fulvique et le chélate Fe-phénanthroline (un chélateur spécifique au Fe(II)) à pH 6.5. Cependant un effet significatif de la lumière était noté à pH 3.9. On peut alors supposer que les oxyhydroxydes préparés pour cette étude étaient encore plus réfractaires à la lumière, puisque le pH était maintenu à 7.2 et l'intensité lumineuse n'était que de $280\ \mu\text{Einstein}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Finden et al. (1984), par contre, avaient obtenu des résultats significatifs de photoréduction à partir d'oxydes ferriques naturels, dont 10% de la masse était constitué de substances humiques, à un pH de 8.15. Ils avaient aussi mesuré une faible réduction du Fe à l'obscurité en présence de substances humiques. Celle-ci avait été attribuée à la complexation-réduction du Fe(III) par le réactif colorimétrique bathophénanthroline disulphonate (BPDS, un agent qui complexe fortement le Fe(II)) qu'ils avaient ajouté aux milieux expérimentaux, ou à une réduction directe causée par les substances humiques. Il est peu probable que la ferrozine ait induit une réduction dans notre expérience; le temps de contact avec la ferrozine était maintenu à 3 min justement pour éviter la lente réduction du Fe(III) en présence des réactifs (tampon acétate et ferrozine) observée par Box (1984). Bien qu'aucun effet stimulateur de la lumière n'ait été mis en évidence, il reste donc que la MOD utilisée dans la présente expérience est capable de ralentir l'oxydation du Fe(II) à l'obscurité, ce qui

est démontré par la proportion de Fe réduit dans le milieu AM et par le fait qu'il y avait toujours du Fe réduit dans la suspension stock "B" ($0.54 \mu\text{M}$ ou 0.5% du Fe total) après 48 h à l'obscurité, malgré le pH élevé de cette solution.

Par ailleurs, il est important de rappeler que les valeurs de Fe(II) mesurées ici sont des valeurs nettes obtenues à des moments précis. Elles donnent donc une image partielle de la quantité de Fe réduit. En effet, à pH 7.2 et dans des milieux oxydés, l'existence du Fe(II) est éphémère, puisque celui-ci est rapidement oxydé. Même si la présence d'agents complexants organiques a ralenti cette oxydation, les quantités totales de Fe(II) produit sont certainement plus élevées qu'il ne paraît et pourraient être à l'origine du Fe filtrable présent dans les milieux AM et AB.

Le ralentissement des réactions d'oxydation du Fe(II) en présence de certaines substances organiques a déjà été observé (Theis et Singer, 1974; Miles et Brezonik, 1981). On observe, de plus, qu'il y a une réduction du Fe provenant de la suspension "A" lorsque celui-ci est ajouté au milieu AM et que c'est dans ce milieu que l'on observe la plus forte proportion résiduelle de Fe réduit à partir de $t = 16$ h. En général, le pourcentage de Fe réduit reste très faible (fig. 6.6a, b) probablement en raison de l'efficacité des rétro-réactions d'oxydation. A titre d'exemple, des pourcentages de Fe réduit rapportés dans la littérature ont varié de 6% (Finden et al.,

1984) à 12% (Waite et Morel, 1984a) selon le pH, l'intensité lumineuse et le type de MO utilisée.

6.4.2 Incidence de la dissolution sur la prise en charge du Fe

Comme les formes de Fe qui peuvent être utilisées directement par le phytoplancton se résument aux formes ioniques à savoir, le Fe^{3+} (Anderson et Morel, 1982), le Fe^{2+} et, possiblement, les hydroxo-complexes $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ et $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ (Schenck et al., 1988), la dissolution du colloïde a été sans doute nécessaire à la stimulation de la croissance et de la prise en charge observée dans le milieu AM. En effet, les résultats des expériences de dissolution et de réduction (fig. 6.5 et 6.6) montrent que le milieu AM présente les plus grandes activités de dissolution et de réduction. Ces résultats suggèrent que la MOD adsorbée à la surface des particules ferriques stabilisées favorise la dissolution du Fe; le flux additionnel de Fe(II) qui en résulte expliquerait la meilleure croissance et la meilleure prise en charge du Fe observées dans le milieu AM.

Le plus grand flux de Fe biodisponible du milieu AM peut aussi s'expliquer par le fait que la réaction de réduction dans le milieu AM (à $t=0$) ne serait pas limitée en substrat organique comme c'est probablement le cas dans le milieu AB. En effet, la réduction du Fe(III) en milieu oxygéné suppose une oxydation de la MOD; la réaction peut être bloquée par l'absence de substances organiques oxydables.

Par contre, les différences entre les valeurs de prise en charge après 21 h et 42 h peuvent difficilement être corrélées aux pourcentages de dissolution relatifs des divers milieux, surtout si l'on considère les valeurs obtenues dans le milieu AB. En effet, la prise en charge du Fe durant 20 min est demeurée à peu près inchangée entre 21 et 42 h (tableau 6.4), alors que la quantité de Fe filtrable a diminué d'un facteur d'environ 4. Notons que les expériences de mesure du Fe filtrable ne font que fournir une estimation de la véritable dissolution, puisque des colloïdes ou autres formes de Fe non disponibles peuvent traverser un filtre à porosité de 0.1 μm et ainsi surestimer la concentration réelle en Fe dissous. La seule véritable mesure du flux de Fe biodisponible reste la valeur de prise en charge.

Il est difficile d'expliquer la valeur élevée de prise en charge obtenue dans le milieu AA à $t = 21$ h (tableau 6.4). Il est peu probable que ce résultat soit dû à un mécanisme tel la production de sidérophores puisqu'aucune valeur élevée n'a été relevée dans la culture AB et que lorsque la même expérience a été reprise à $t = 42$ h à partir des mêmes solutions (mais avec un inoculum provenant d'une culture différente), les valeurs de prise en charge les plus faibles ont été obtenues dans le milieu AA. Il demeure que la valeur élevée obtenue dans le milieu AA devrait encourager l'étude des circonstances qui permettent la prise en charge du Fe en absence de MOD. Dans cette perspective

il serait intéressant d'étudier l'effet des algues elles-mêmes sur leur milieu. Rappelons que les expériences rapportées ici ont été réalisées avec une concentration élevée de cellules, ce qui a pu, par exemple, permettre une production suffisante de substances extracellulaires pour modifier, même à court terme, la biodisponibilité du Fe.

6.4.3 Colloïdes et précipités

Étant donné qu'aucune différence n'a été détectée dans les croissances (tableau 6.3) et les prises en charge à $t = 42$ h (tableau 6.4) entre les milieux AB et AA chez *S. capricornutum*, il n'est pas possible d'inférer que la MOD associée aux colloïdes du milieu AB lors de leur formation entraîne une plus grande disponibilité du Fe. En effet, les particules formées en présence de MOD ne semblent pas plus biodisponibles que les précipités formés dans la solution inorganique "A" (cf. croissance et prise en charge dans le milieu AA).

La densité des particules des solution "A" et "B" obtenue par les gradients de Percoll (tableau 6.2) montre bien que deux différents types de particules ont été générés. Ainsi, comme 35.6% des particules obtenues dans la solution "B" avaient une densité plus faible ou équivalente à $1.00 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, une fraction significative de ces dernières peuvent être considérées comme étant des colloïdes. Toutefois, la solution "A" a presque uniquement généré des précipités: 94.8% des particules

avaient une densité plus grande ou égale à $1.13 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Selon les hypothèses développées au chapitre 2, on se serait attendu à une croissance plus importante et des niveaux de prise en charge du Fe plus élevés chez *S. capricornutum* en présence des colloïdes MOD-Fe du milieu AB, en regard de leur meilleure photo-labilité. Toutefois, aucune photoréduction n'a été détectée pour les colloïdes et co-précipités Fe(III)-MOD du milieu AB (fig. 6.6). Finden et al. (1984), par contre, avaient observé que 7% du Fe d'un co-précipité Fe(III)-substances humiques réagissaient avec le bathophénanthroline disulphonate (un chélateur spécifique au Fe(II)) après 16 h d'exposition à la lumière; parallèlement, ils n'avaient noté aucune inhibition de croissance pour les algues soumises à cette même source de Fe. Les résultats différents obtenus par Finden et al. (1984) pourraient s'expliquer par la meilleure capacité réductrice des substances humiques utilisées par ces derniers; en effet, leur expérience a été réalisée dans des conditions très proches de l'expérience actuelle, sauf pour le type de MOD et le mode de préparation des précipités (tableau 2.2). Rappelons que les propriétés chélatrices, et aussi photoactives, des substances organiques dépendent surtout de leurs caractéristiques chimiques (groupements fonctionnels, poids moléculaires, groupes chromophores); ainsi, chaque source de MOD ou encore de substances humiques est susceptible d'avoir une efficacité de photoréduction qui lui est propre.

On peut observer à la figure 6.4a une légère stimulation de la croissance pour la culture du milieu AB les jours 11, 12 et 13. Si l'on considère uniquement les valeurs de dénombrement (cellules \cdot mL $^{-1}$ \pm écart-type) obtenues au jour 13, on observe que le rendement de la culture du milieu AB (4.04×10^6 cellules \cdot mL $^{-1} \pm 0.19 \times 10^6$) est significativement supérieur ($\alpha = 0.05$) au rendement de la culture AA (3.46×10^6 cellules \cdot mL $^{-1} \pm 0.20 \times 10^6$). Cependant la valeur de biomasse algale (exprimées en VCT \pm écart-type) obtenue pour les algues du milieu AB au jour 13 (7.69 nL \cdot mL $^{-1} \pm 0.33$) n'est pas significativement supérieure à la biomasse des algues du milieu AA (7.03 ± 0.33). Comme les valeurs basées sur les volumes cellulaires sont plus représentatives de la croissance des algues (voir section 5.2.2), on ne peut pas considérer cette stimulation comme étant significative. L'absence de stimulation significative de la biodisponibilité du Fe dans le milieu AB par rapport au milieu AA avant le jour 11 peut avoir été causée par la disparition de MOD oxydable au début de l'expérience. Il reste possible qu'une source adéquate de MOD oxydable a pu, cependant, devenir disponible lorsque les substances organiques extracellulaires ont atteint une concentration suffisante après 10 à 12 jours d'incubation. Ces substances organiques auraient pu se substituer à la MOD déjà oxydée des colloïdes et induire la réduction du Fe(III) complexé. Selon ce scénario, il est possible que les colloïdes du milieu AB, dont une partie importante était capable de traverser les filtres de $0.1 \mu\text{m}$ (fig. 6.5) et,

potentiellement plus labiles que les précipités du milieu AA, aient pu fournir suffisamment de Fe ionique aux cellules avec le concours d'une source fraîche de MOD (substances extracellulaires). Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une expérience où l'on observerait une diminution progressive du flux de Fe dissous, provenant d'un milieu analogue à AB, à travers une membrane semi-perméable et le possible rétablissement du flux suite à l'ajout d'une source fraîche de MOD. Une autre explication serait que les cellules elles-mêmes aient pu réduire ce Fe colloïdal labile à la membrane cellulaire selon un mécanisme proposé récemment par Jones et al. (1987).

6.5 Conclusions

Les expériences rapportées ici ont démontré qu'une fraction de poids moléculaire de 1000 à 10 000 daltons de MOD extraite d'un effluent secondaire possède des propriétés pour améliorer la biodisponibilité des oxyhydroxydes de Fe.

En général, la présence de MOD a permis de maintenir une plus grande quantité de Fe filtrable "en solution". Cela peut s'expliquer par la stabilisation des colloïdes précédemment observée chez les substances humiques (Shapiro, 1964; Davis et Leckie, 1978; Tipping et Ohnstad, 1984).

La fraction de MOD possède des propriétés qui lui permettent de favoriser la dissolution des particules

d'oxyhydroxyde ferrique ainsi que la réduction du Fe(III) à la lumière comme à l'obscurité. L'absence d'une contribution de la lumière au phénomène de réduction-dissolution n'a pas de précédent dans la littérature scientifique.

La prise en charge du Fe chez *S. capricornutum* est aussi favorisée par la fraction de MOD. Dans cette perspective, le phytoplancton serait tributaire du flux accru de formes de Fe transitoires, tels que le Fe^{2+} , le Fe^{3+} et les hydroxo-complexes, résultant de la réduction-dissociation des colloïdes ferriques stabilisés par la MOD.

De plus, pour assurer un flux significatif de Fe biodisponible, une quantité suffisante de MOD doit être présente afin de compenser l'oxydation de groupements fonctionnels impliqués dans les réactions de réduction du Fe(III), lesquelles permettent la dissolution des particules ferriques. Ainsi la seule présence de groupements organiques associés à la phase colloïdale ne permet pas d'améliorer la biodisponibilité du Fe. Une source additionnelle de MO non oxydée serait alors nécessaire pour induire le processus de dissolution et favoriser la biodisponibilité du Fe.

Les limitations de la production primaire par le Fe observées dans certains lacs et réservoirs (Schelske, 1962; Elder, 1977; Lin et Schelske, 1981; Wurtsbaugh et Horne, 1983) pourraient bien résulter de l'absence de MO ayant des propriétés

nécessaires à la réduction-dissolution et rarement d'un manque de Fe total.

CONCLUSIONS

Les expériences rapportées ici ont démontré qu'un effet majeur de la MOD résiduaire d'un traitement secondaire d'eaux usées domestiques était de favoriser la biodisponibilité du Fe pour une algue test, *S. capricornutum*. Les résultats du chapitre 4 ont, en effet, montré que la MOD avait un effet significatif sur la biodisponibilité des métaux à l'état de traces et tendait à augmenter la biodisponibilité du Fe plus que celle du Mn ou tout autre micro élément du milieu nutritif AAP. Les résultats des présents travaux indiquent que le rejet de MOD dans les milieux aquatiques, pauvres en matière organique, pourrait stimuler la production phytoplanctonique chez des populations limitées en Fe.

Par la suite les expériences décrites aux chapitres 5 et 6 sont venues confirmer de manière significative cet effet de la

MOD sur la biodisponibilité du Fe. Il est important de noter que cet effet de la MOD a été constant d'une expérience à l'autre en dépit du fait que chaque expérience a été réalisée à partir d'échantillons distincts pris à des moments différents (mais extraits rigoureusement de la même façon).

Une deuxième conclusion est tirée de l'expérience du chapitre 5. Celle-ci a démontré que la biodisponibilité du Fe n'est pas affectée également par toutes les substances organiques résiduelles d'un traitement secondaire. En effet, lorsque celles-ci sont séparées sur la base de leur poids moléculaire, la courbe de croissance des algues s'en trouve modifiée. Dans ce cas-ci, ce fut la fraction de faible poids moléculaire (1000 à 10 000 daltons) qui a stimulé la biodisponibilité du Fe avec le plus d'efficacité. Les résultats ont, de plus, indiqué que le rôle de la MOD serait de prévenir les effets du vieillissement des particules de Fe sur la biodisponibilité.

Les mécanismes chimiques qui gouvernent la dissolution des colloïdes ferriques sont fortement influencés par la MOD de l'effluent secondaire. Cette constatation peut être tirée des résultats du chapitre 6. En effet, on peut y établir une corrélation entre l'effet stimulateur de la MOD sur la réduction et la dissolution des particules de Fe pré-formées et leur effet stimulateur sur la croissance et la prise en charge du Fe par *S. capricornutum*. Contrairement aux résultats décrits dans la

littérature scientifique (chapitre 2), aucun effet de la lumière sur la réduction du Fe(III) et sur la dissolution des colloïdes ferriques n'a été détecté. De plus, les résultats décrits au chapitre 6 ont mis en évidence certains mécanismes chimiques modulant la biodisponibilité des particules d'oxyhydroxydes ferriques, tels que la réduction-dissolution et suggérés l'importance des groupements oxydables de la MOD pour ce processus.

Bien qu'il soit possible actuellement de relier les propriétés de complexation des métaux par les substances organiques à certains groupements fonctionnels, il reste difficile de définir les caractéristiques qui affecteront la réduction et la dissolution des oxyhydroxydes de Fe. Avec le manque actuel de connaissances sur la caractérisation des substances organiques tant naturelles que d'origine anthropique, il est donc impossible de prévoir dans quelle mesure une substance organique pourra favoriser la biodisponibilité du Fe et comment les réactions chimiques favorisant cette biodisponibilité seront affectées par des facteurs tels que le pH et la lumière.

Les résultats des recherches présentées ici s'inscrivent bien à l'intérieur du modèle conceptuel proposé au chapitre 2. Il serait cependant important de clarifier la contribution de l'énergie lumineuse à la cinétique des réactions qui favorisent la biodisponibilité du Fe en regard des différentes substances organiques en cause. Les substances organiques utilisées ici

étaient différentes de celles qui ont été utilisées par d'autres chercheurs et, malgré leurs propriétés communes à certains égards, elles pourraient être moins réactives à la lumière. Ces résultats soutiennent, de plus, l'hypothèse selon laquelle la réduction-dissolution du complexe Fe(III)-MOD (catalysée ou non par la lumière) est la réaction qui limite la biodisponibilité du Fe.

Dans une perspective différente, il serait intéressant de savoir comment et dans quelles conditions le taux de prise en charge du Fe pourrait être limité par des réactions chimiques, soit entièrement extérieures aux cellules, ou soit dans la zone d'influence de la membrane cellulaire (micro-couche de diffusion). On peut penser par exemple aux travaux de Jones et al. (1987) sur le potentiel réducteur de membranes de cellules phytoplanctoniques.

RÉFÉRENCES CITÉES

Ahel, M., T. Conrad et W. Giger. 1987. Persistent organic chemicals in sewage effluents. 3. Determination of nonphenoxy carboxylic acids by high-resolution gas chromatography/mass spectrography and high-performance liquid chromatography. Environ. Sci. Technol. 21: 697-703.

Anderson, M.A. et F.F.M. Morel. 1982. The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. Limnol. Oceanogr. 27: 789-813.

APHA. 1985. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 16ième edit. Washington. D.C. 1268 p.

- Baes, C.F. et R.E. Mesmer. 1976. *The hydrolysis of cations*. John Wiley and Sons. New York. N.Y. 489 p.
- Bailey, K.M. et F.B. Taub. 1980. Effects of hydroxamate siderophores (strong Fe(III) chelators) on the growth of algae. *J. Phycol.* 16: 334-339.
- Balzani, V. et Carassiti. 1970. *Photochemistry of coordination compounds*. Academic Press, New York, NY.
- Bates, S.S., A. Tessier, P.G.C. Campbell et J. Buffle. 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *J. Phycol.* 18: 521-529.
- Beers, J.R. 1986. Organisms and the food web, p.84-175. In Eppley, R.W. (ed.) *Plankton dynamics in the Southern California Bight: lecture notes on coastal and estuarine studies*. Vol 15. Springer-Verlag, New-York, NY.
- Bender, M.F., W.R. Matson et R.A. Jordan. 1970. On the significance of metal complexing agents in secondary sewage effluents. *Environ. Sci. Technol.* 4: 520-521.

Blatt, W.F., S.M. Robinson et H.J. Bixler. 1968. Membrane ultrafiltration: the diafiltration technique and its application to microsoluble exchange and binding phenomena. *Anal. Biochem.* 26: 151-173.

Box, J.D. 1984. Observations on the use of iron(II) complexing agents to fractionate the total filterable iron in natural water samples. *Water Res.* 18: 397-402.

Boyle, E.A., J.M. Edmond et E.R. Sholkovitz. 1977. The mechanism of iron removal in estuaries. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41: 1313-1324.

Brand, L.E., R.R. Guillard et L.S. Murphy. 1981. A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.* 3: 193-201.

Buffle, J., P. Deladoey et W. Haerdi. 1978. The use of ultrafiltration for the separation and fractionation of organic ligands in fresh waters. *Anal. Chim. Acta* 101: 339-357.

Burmester, D.E. 1979. The unsteady continuous culture of phosphate-limited *Monochrysis lutheri* Droop: experimental and theoretical analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 39: 167-186.

Cameron, A.J. et P.S. Liss. 1984. The stabilization of "dissolved" iron in freshwaters. *Water Res.* 18: 179-185.

Campbell, P.G.C., M. Bisson, R. Bougie, A. Tessier et J.P. Villeneuve. 1983. Speciation of aluminum in acidic freshwaters. *Anal. Chem.* 55: 2246-2252.

Chiaudani, G. et M. Vighi. 1978. The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.* 21: 316-329.

Clair, T.A. et B. Freedman. 1986. Patterns and importance of dissolved organic carbon in four acidic brownwater streams in Nova Scotia, Canada. *Water Air Soil Pollut.* 31: 139-147.

Collienne, R.H. 1983. Photoreduction of iron in the epilimnion of acidic lakes. *Limnol. Oceanogr.* 28: 83-100.

Cooper, W.J. et R.G. Zika. 1983. Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science (Wash., DC)* 220: 711-712.

Crosby, S.A., D.R. Glasson, A.H. Cuttler, I. Butler, D.R. Turner, M. Whitfiels et G.E. Millward. 1983. Surface areas and porosities of Fe(III)- and Fe(II)- derived oxyhydroxides. *Environ. Sci. Technol.* 17: 709-713.

Davis, J.A. et J.O. Leckie. 1978. Effect of adsorbed complexing ligands on trace metal uptake by hydrolysis oxides. *Environ. Sci. Technol.* 12: 1309-1315.

Davison, W. 1985. Conceptual models for transport at a redox boundary. p. 31-53. In: Stumm, W. (ed) *Chemical processes in lakes*. John Wiley and Sons, New York, N.Y. 435 p.

Davison, W. et G. Seed. 1983. The kinetics of the oxidation of ferrous iron in synthetic and natural waters. *Geochim. Cosmochim. Acta* 47: 67-79.

De Haan, H. et T. De Boer. 1986. Geochemical aspects of aqueous iron, phosphorus and dissolved organic carbon in the humic Lake Tjeukemeer, The Netherlands. *Freshwater Biol.* 16: 661-672.

De Haan, H., M.J.W. Veldhuis et J.R. Moed. 1985. Availability of dissolved iron from Tjeukemeer, The Netherlands, for iron-limited growing *Scenedesmus quadricauda*. *Water Res.* 19: 235-239.

De Haan, H. G. Werlemark et T. De Boer. 1983. Effect of pH on molecular weight and size of fulvic acids in drainage water from peaty grassland in NW Netherlands. *Plant Soil* 75: 63-73.

Diekmann, H. 1984. Siderochromes [Iron(III)-trihydroxamates]. p.783-792. In: Laskin, A.I. et H.A. Lechevalier (eds.). *CRC Handbook of microbiology*. 2nd edition. Vol. 5. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Dufkova, V. 1984. EDTA in algal culture media. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 67: 479-492.

Elder, J.F. 1975. Complexation side reactions involving trace metals in natural water systems. *Limnol. Oceanogr.* 20: 96-102.

Elder, J.F. 1977. Iron uptake by freshwater algae and its diel variation. p. 346-357. In Drucker, H. et R.E. Wilding (eds.). *Biological implications of metals in the environment*. ERDA Symp. Ser. No. 42.

Entsch, B., R.G. Sim et B.G. Hatcher. 1983. Indications from photosynthetic components that iron is a limiting nutrient in primary producers on coral reefs. *Mar. Biol.* 73: 17-30.

Figura, P. et B. McDuffie. 1977. Characterization of the calcium form of Chelex-100 for trace metal studies. *Anal. Chem.* 49: 1050-1053.

Finden, D.A.S., E. Tipping, G.H.M. Jaworski et C.S. Reynolds. 1984. Light-induced reduction of natural iron(III) oxide and its relevance to phytoplankton. *Nature (Lond.)* 309: 783-784.

Florence, T.M. 1982. The speciation of trace elements in waters. *Talanta* 29:345-364.

Florence, T.M. et G.E. Batley. 1980. Chemical speciation in natural waters. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* 9: 219-296.

Ghosh, K. et M. Schnitzer. 1980. Macromolecular structures of humic substances. *Soil Sci.* 129: 266-276.

Gibbs, M.M. 1979. A simple method for the rapid determination of iron in natural waters. *Water Res.* 13: 295-297.

Giesy, P.J. Jr. 1976. Stimulation of growth in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) by humic acids under iron limiting conditions. *J. Phycol.* 12: 172-179.

Glover, H.E. 1978. Iron in Maine coastal waters: seasonal variation and its apparent correlation with the dinoflagellate bloom. *Limnol. Oceanogr.* 23: 534-537.

Good, N.E., G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa et R.M.M. Singh. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5: 467-477.

Harrison, G. I. et F.M.M. Morel. 1986. Response of the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* to iron stress. *Limnol. Oceanogr.* 31: 989-997.

Harvey, H.W. 1937. The supply of iron to diatoms. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 22: 205-219.

Hayward, J. 1968. Studies on the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. III. The effect of iron on growth. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 48: 295-302.

Jackson, T.A. et R.E. Hecky 1980. Depression of primary productivity by humic matter in lake and reservoir waters of the boreal forest zone. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 2300-2317.

Jackson, G.A. et J.J. Morgan. 1978. Trace metal-chelator interactions and phytoplankton growth in seawater media: theoretical analysis and comparison with reported observations. *Limnol. Oceanogr.* 23: 268-284.

Johnston, R. 1964. Sea-water, the natural medium for phytoplankton. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 44: 87-109.

Jones, G.J., B.P. Palenik et F.F.M. Morel. 1987. Trace metal reduction by phytoplankton: the role of plasmalemma redox enzymes. *J. Phycol.* 23: 237-244.

Kester, D.A., R.H. Byrne and Y.J. Liang. 1975. Redox reactions and solution complexes of iron in marine systems p.56-67. In Church, T.M. (ed.). *Marine Chemistry in the coastal environment* ACS Symposium Series 18, ACS, Washington, D.C.

Koenings, J.P. 1976. *In situ* experiments on the dissolved and colloidal state of iron in an acid bog lake. *Limnol. Oceanogr.* 21: 674-683.

Koenings, J.P. et F.F. Hooper. 1976. The influence of colloidal organic matter on iron and iron-phosphorus cycling in an acid bog lake. *Limnol. Oceanogr.* 21: 684-696.

Lalucat, J., J. Imperial et R. Pares. 1984. Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp. VJ79. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 677-681.

Langford, C.H., M. Wingham et V.S. Sastri. 1973. Ligand photooxidation in copper(II) complexes of nitrilotriacetic acid. *Environ. Sci. Technol.* 7: 820-822.

Langis, R., P. Couture, J. de la Noüe et N. Méthot. 1986. Induced responses on algal growth and phosphate removal by three molecular weight DOM fractions from a secondary effluent. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 58: 1074- 1077.

Lavoie, A., J.-L. Mouget et J. de la Noüe. 1986. Measurement of freshwater micro-algal cell density with Percoll density gradients. *J. Microbiol. Methods* 4: 251-260.

Leong, J. 1986. Siderophores, their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens, p.187-210. In Cook, R.J. (ed.). *Annual review of phytopathology*. Vol. 24. Annual Reviews inc., Palo Alto, CA.

Lewin, J.C. et C.H. Chen. 1971. Available iron: a limiting factor for marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 16: 670-675.

Lewin, J.C. et C.H. Chen. 1973. Changes in the concentration of soluble and particulate iron in seawater enclosed in containers. *Limnol. Oceanogr.* 18: 590-596.

Lin, C.K. et C.L. Schelske. 1981. Seasonal variation of potential nutrient limitation to chlorophyll production in southern Lake Huron. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38: 1-9.

Livingstone, D.A. 1963. *Chemical composition of rivers and lakes*. U.S. geol. Surv. Prof. Pap. 440-G. 64 p.

Malcolm, R.L. et P. MacCarthy. 1986. Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environ. Sci. Technol.* 20: 904-911.

Menzel, D.W. et J.H. Ryther. 1961. Nutrients limiting the production of phytoplankton in the Sargasso Sea, with special reference to iron. *Deep-Sea Res.* 7: 276-281.

Ministère de l'Environnement du Québec. 1986. *Eaux-Détermination du carbone organique dissous. Méthode conductivimétrique automatisée. Méthode MENVIQ. 86.01/303 - C 2.1.*

Miles, C.J. et P.L. Brezonik. 1981. Oxygen consumption in humic-colored waters by a photochemical ferrous-ferric catalytic cycle. *Environ. Sci. Technol.* 15: 1089-1095.

Miller, G.W., J.C. Pushnik et N. Reyes. 1986. Trace elements in plants. p.110-161. In De Wayne Ashmead, H., H.H. Aschmead, G.W. Miller et H.H. Hsu (eds.). *Foliar feeding of plants with amino acid chelates.* Noyes Publications, Park Ridge, NJ.

Moore, R.M, J.D. Burton, P.J., le B. Williams et M.L. Young 1979. The behavior of dissolved organic material, iron and manganese in estuarine mixing. *Geochim. Cosmochim. Acta* 43: 919-926.

Morel, F.M.M. 1983. *Principles of aquatic chemistry.* John Wiley and Sons. New York, NY.

Murphy, T.P., D.R.S. Lean et C. Nalewajko. 1976. Blue-green algae: their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae. *Science* (Wash., DC) 192: 900-902.

Murphy, J. et J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 27: 31-36.

Neilands, J.B. 1973. Microbial iron transport compounds (siderochromes). p. 167-202. In Eichhorn, G.L.(ed.) *Inorganic biochemistry*. Vol. 1. Elsevier, New-York, NY.

Neilands, J.B. 1974. Iron and its role in microbial physiology. p. 3-34. In Neilands, J.B. (ed.). *Microbial iron metabolism: a comprehensive treatise*, Academic Press, New York, NY.

Neilands, J.B. 1981. Microbial iron compounds. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 715-731.

Oborn, E.T. 1960. *A survey of pertinent biochemical literature: the chemistry of iron in natural water*. USGS. Water Supply Paper 1459-F. 52 p.

Ogura, N. 1974. Molecular weight fractionation of dissolved organic matter in coastal seawater by ultrafiltration. *Mar. Biol.* 24: 305-312.

Ortner, P.B., G.R. Harvey et C. Kreader. 1983. Interactive effects of metals and humus on marine phytoplankton carbon uptake. *Nature(Lond)* 301: 57-59.

Perdue, E.M., K.C. Beck et J.H. Reuter. 1976. Organic complexes of iron and aluminium in natural waters. *Nature(Lond.)* 260: 418-420.

Plumb, R.H. et G.F. Lee. 1973. A note on iron organic relationships in natural water. *Water Res.* 7: 581-585.

Prakash, A. et M.A. Rashid. 1968. Influence of humic substances on the growth of phytoplankton: Dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 13: 598-606.

Prakash, A., M.A. Rashid, A. Jensen et D.V. Subba Rao. 1973. Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: Diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 18: 516-524.

Provasoli, L. 1963. Organic regulation of phytoplankton fertility. p. 115-219. *In: Hill, M.N. (ed). The Sea. Vol 2.*

Reuter, J.H. et E.M. Perdue. 1977. Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural water. *Geochim. Cosmochim. Acta* 41: 325-334.

Rueter, J.G. et D.R. Ades. 1987. The role of iron nutrition in photosynthesis and nitrogen assimilation in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). J. Phycol. 23: 452-457.

Ryther, J.H. et R.R.L. Guillard. 1959. Enrichment experiments as a means of studying nutrients limiting to phytoplankton populations. Deep-Sea Res. 6: 65-69.

Sachdev, D.R. et N.L. Clesceri. 1978. Effects of organic fractions from a secondary effluent on *Selenastrum capricornutum* (Kutz.). J. Water Pollut. Control Fed. 50: 1810-1820.

Sandmann, G. 1985. Consequence of iron deficiency on photosynthetic and respiratory electron transport in blue-green algae. Photosynthesis Res. 6: 261-171.

Schelske, C.L. 1962. Iron, organic matter and other factors limiting primary productivity in a marl lake. Science (Wash., DC) 136: 45-46.

Schenck, R.C., A. Tessier et P.G.C. Campbell. 1988. The effect of pH on iron and manganese uptake by a green algae. Limnol. Oceanogr. 33: 538-550.

Schindler, J.E. et J.J. Alberts. 1974. Analysis of organic-inorganic associations in four Georgia reservoirs. Arch. Hydrobiol. 74: 429-440.

Schnitzer, M. et S.U. Khan. 1972. *Humic substances in the environment*. Marcel Dekker Inc, New York, NY.

Sedlacek, J; E. Gjessing et J.P. Rambaek. 1987. Isotope exchange between inorganic iron and iron naturally complexed by aquatic humus. *Sci. Total Environ.* 62: 275-279.

Sedlacek, J.; T. Kallquist et E.T. Gjessing. 1981. Effect of aquatic humus on uptake and toxicity of cadmium to *Selenastrum capricornutum* Printz, p. 495-516. In Christman, R.F. et E.T. Gjessing (eds.). *Aquatic and terrestrial humic materials symposium, Chapel Hill N.C.* Ann Arbor Science Publishing, Ann Arbor, MI.

Shapiro, J. 1964. Effect of yellow organic acids on iron and other metals in water. *J. Am. Water Works Ass.* 56: 1062-1082.

Shapiro, J. 1969. Iron in natural waters - its characteristics and biological availability as determined with the ferrigram. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 17: 456-466.

Sherrer, B. 1984. *Biostatistique*. Gaëtan Morin, Chicoutimi, 850p.

Sholkovitz, E.R., E.A. Boyle et N.B. Price. 1978. The removal of dissolved humic acids and iron during estuarine mixing. *Earth Planet. Sci. Lett.* 40: 130-136.

Skogerboe, R.K. et S.A. Wilson. 1981. Reduction of ionic species by fulvic acid. *Anal. Chem.* 53: 228-232.

Smith, R.M. et A.E. Martell. 1976. *Critical stability constants: inorganic complexes*. Vol 4. Plenum New York, NY.

Sokal, R.R. et F.J. Rohlf. 1969. *Biometry*. W.H. Freeman and Co. San Francisco, CA, 776p.

Stainton, M.P., M.J. Capel et F.A.J. Armstrong. 1977. *The chemical analysis of fresh water*. Misc. Sp. Publi. No. 25. 2nd edition. Fisheries and Environment Canada, 180p.

Stephanou, E. et W. Giger. 1982. Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determination of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 16: 800-805.

Stevenson, F.J. 1982. *Humus chemistry*. John Wiley and Sons. New York, NY, 443p.

Stookey, L.L. 1970. Ferrozine - a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42: 779-781.

Storch, T.A. et V.L. Dunham. 1986. Iron-mediated changes in the growth of Lake Erie phytoplankton and axenic algal cultures. *J. Phycol.* 22: 109-117.

Stumm, W. et G.F. Lee. 1960. The chemistry of aqueous iron. *Schweiz Z. Hydrol.* 22: 295-319.

Stumm, W. et J.J. Morgan. 1981. *Aquatic chemistry*. Wiley-Interscience, New York, NY.

Subba Rao, D.V. et P.A. Yeats. 1984. Effect of iron on phytoplankton production in the Sargasso Sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 81: 281-289.

Sunda, W.G. et R.L. Ferguson. 1983. Sensitivity of natural bacterial communities to additions of copper and to cupric ion activity: a bioassay of copper complexation. p.871-891. In Wong, C.S. E. Boyle, K.W. Bruland, J.D. Burton and E.D. Goldberg (eds.). *Trace metals in seawater*. Plenum, New York, NY.

Sunda, W.G. et J.A.M. Lewis. 1978. Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.* 23: 870-876.

Sung, W. et J.J. Morgan. 1980. Kinetics and product of Ferrous iron oxygenation in aqueous systems. *Env. Sci. Technol.* 14: 561- 568.

Theis, T.L. et P.C. Singer. 1974. Complexation of iron(II) by organic matter and its effect on iron(II) oxygenation. *Environ. Sci. Technol.* 8: 569-573.

Thurman, E. M. 1985. *Organic geochemistry of natural waters*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk, Dordrecht, The Netherlands, 497p.

Tipping, E. et D. Cooke. 1982. The effects of adsorbed humic substances on the surface charge of goethite (α -FeOOH) in freshwaters. *Geochim. Cosmochim Acta* 46: 75-80.

Tipping, E. et D.C. Higgins. 1982. The effect of adsorbed humic substances on the colloid stability of hematite particles. *Colloid Surf.* 5: 85-92.

Tipping, E. et M. Ohnstad. 1984. Colloid stability of iron oxide particles from freshwater lake. *Nature(Lond.)* 308:266-268.

Trick, C.G., R.J. Andersen, A. Gillam et P.J. Harrison. 1983a. Prorocentrin: an extracellular siderophore produced by the marine dinoflagellate *Prorocentrum minimum*. *Science (Wash., DC)* 219: 306-308.

Trick, C.G., R.J. Andersen, N.M. Price, A. Gillam et P.J. Harrison. 1983b. Examination of hydroxamate-siderophore production by neritic eukaryotic marine phytoplankton. *Mar. Biol.* 75: 9-17.

Trott, T., R.W. Henwood et C.H. Langford. 1972. Sunlight photochemistry of ferric nitrilotriacetate complexes. *Environ. Sci. Technol.* 6: 367-368.

Verduin, J. 1971. Phytoplankton energetics in a sewage-treatment lagoon. *Ecology* 52: 626-631.

Waite, T.D. et F.M.M. Morel. 1984a. Photoreductive dissolution of colloidal iron oxide: effect of citrate. *J. Colloid Interface Sci.* 102: 121-137.

Waite, T.D. et F.M.M. Morel. 1984b. Photoreductive dissolution of colloidal iron oxides in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* 18: 860-868.

Waite T.D. et F.M.M. Morel. 1984c. Ligand exchange and fluorescence quenching studies of the fulvic acid-iron interaction. Effects of pH and light. *Anal. Chim. Acta* 162: 263-274.

Wells, M.L., N.G. Zorkin et A.G. Lewis. 1983. The role of colloid chemistry in providing a source of iron to phytoplankton. *J. Mar. Res.* 41: 731-746.

Westall, J.C., J.L. Zachary et F.M.M. Morel. 1976. *MINEQL, a computer program for the calculation of the chemical equilibrium composition of aqueous systems*. Massachusetts Institute of Technology, Department of Civil Engineering, Technical Report 18, 91 p.

Wetzel, R.G. 1983. *Limnology*. Saunders, Philadelphia, PA, 743p.

Wilander, A. 1972. A study on the fractionation of organic matter in natural water by ultrafiltration techniques. *Schweiz. J. Hydrol.* 34: 190-200.

Williams, P.M. 1986. Chemistry of the dissolved and particulate phase in the water column, p. 53-83. In Eppley, R.W. (ed.) *Plankton dynamics in the Southern California Bight: lecture notes on coastal and estuarine studies*. Vol 15. Springer-Verlag, New-York, NY.

Wong, P.T.S. et P. Couture. 1986. Toxicity screening using phytoplankton. p 79-100. In Dutka, B.J. et G. Bitton (eds). *Toxicity testing using microorganisms*. Vol 2. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Wong, P.T.S., Y.K. Chau et P.L. Luxon. 1978. Toxicity of a mixture of metals to freshwater algae. *J. Fish. Res. Board Can.* 35: 479-481.

Wong, P.T.S., Y.K. Chau et D. Patel. 1982. Physiological and biochemical responses of several freshwater algae to a mixture of metals. *Chemosphere* 11: 367-376.

Wurtsbaugh, W.A. et A.J. Horne. 1983. Iron in eutrophic Clear lake, California, USA. Its importance for algal nitrogen fixation and growth. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40: 1419-1429.

Zafiriou, O.C. 1983. Natural water photochemistry. p. 339-370. In Riley, J.P. et R. Chester (eds.). *Chemical Oceanography*. Vol 8. Academic Press, London, New York.

ANNEXE

Langis, R.; P. Couture; J. de la Noüe et N. Méthot. 1986.
Induced responses on algal growth and phosphate removal by three
molecular weight DOM fractions from a secondary effluent. J.
Water Pollut. Control Fed. 58: 1073-1077.

L'INRS ne détient pas les droits pour diffuser cette version de l'article :

Langis, R., Couture, P., De la Noue, J. et Méthot, N. (1986). Induced responses on algal growth and phosphate removal by three molecular weight DOM fractions from a secondary effluent. *Water Pollut. Control Fed. J.* 58(11): 1073-1077.