

Conseil International pour l'Exploration
de la Mer

C.M. 1981/E : 41
Comité de la Qualité de l'Environnement marin

UTILISATION DE CULTURES D'ALGUES UNICELLULAIRES
MARINES EN ECOTOXICOLOGIE

par

P. LASSUS (1) et J. DEVINEAU (2)

Résumé

Des cultures en milieu liquide de *Tetraselmis suecica* et *Dunaliella tertiolecta* sont utilisées afin d'évaluer la toxicité directe ou à moyen terme des nuisances littorales.

A partir des résultats obtenus par divers tests de contraintes (élévations brutales de température, adjonction de biocides tels que le chlore ou des sels de métaux lourds) une procédure expérimentale est proposée. Les critères étudiés sont les variations du volume plasmiqne et les modifications des rythmes de division cellulaire. Les facilités de mise en oeuvre de ce type de test devraient permettre d'aboutir à une standardisation des essais.

Abstract

Filtered sea water enriched medium is used for cultures of *Tetraselmis suecica* and *Dunaliella tertiolecta* in order to evaluate acute or late toxicity from seashore wastes. Experimental procedure is considered on basis of several environmental tests results (thermal stresses, addition of biocids like chlorine or heavy metals salts). Proposed criteria are variations in Cell-Volume regulation and in growth rate. The easiness of such a test would allow to expect a standard procedure.

(1) Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes, rue de l'Île d'Yeu
B. P. n° 1049, 44037 NANTES CEDEX

(2) Université de RENNES I. U.E.R. Des Sciences de la Vie et de l'Environnement

I - INTRODUCTION

Les cultures monospécifiques en salle thermostatée d'algues planctoniques sont pratiquées par divers laboratoires et ce depuis longtemps. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux phytoflagellés du fait de leur taux élevé de division cellulaire et également de leurs possibilités de régulation du volume plasmique en fonction des conditions de milieu. Ces deux aspects sont d'une grande importance en écotoxicologie puisqu'ils permettent d'appréhender rapidement les effets sub-létaux de substances polluantes.

Les données concernant les conditions de culture de la chlorophycée *Dunaliella tertiolecta* sont nombreuses (Mc LACHLAN, 1960 ; DAVIES, 1970 ; SJOBLAD et Coll., 1978), et son utilisation comme organisme test s'est montrée appropriée, en particulier pour évaluer les effets de métaux lourds (DAVIES, 1976 ; JENNINGS, 1979).

Par ailleurs, le genre *Dunaliella* est cité dans la littérature, pour estimer l'impact du chlore (VIDEAU et Coll., 1979), du cuivre (RIISGARD, 1979) ou d'organohalogénés (BIGGS et Coll., 1979).

Nous nous sommes plus spécialement intéressés aux résultats de RIISGARD (1979) qui font apparaître une quasi impossibilité pour *Dunaliella marina* à réguler son volume cellulaire lorsque des concentrations croissantes de cuivre sont ajoutées au milieu.

En effet, des travaux personnels (LASSUS, MAGGI, 1980 ; MAGGI et Coll., 1980) nous ont permis d'éprouver des techniques de culture en masse et d'analyse journalière au moyen d'un Coulter-counter. Selon les contraintes imposées, des altérations physiologiques peuvent entraîner des retards dans l'apparition de la phase exponentielle de croissance, une diminution du rythme des multiplications ou une hypertrophie cellulaire plus ou moins réversible en fonction des conditions de milieu.

Outre les données concernant *D. tertiolecta* nous avons également des résultats préliminaires sur l'utilisation en écotoxicité de *Tetraselmis suecica*, flagellé formant des kystes à une ou deux cellules-filles. Cette dernière particularité devrait permettre de mesurer la réponse d'une population cellulaire à un environnement hostile par l'augmentation numérique de ces formes de résistance qui sont deux fois plus grosses que les cellules flagellées mobiles.

Sur la base de résultats concernant l'incidence de variations brusques de températures, d'adjonction de chlore ou de différents sels de métaux lourds, nous avons tenté de définir un protocole simple, différent des procédures décrites par d'autres auteurs (HIRAYAMA et HIRANO, 1970 ; ROBERTS, 1977 ; DASTE et Coll., 1978).

II - DONNEES EXPERIMENTALES

1. Effets de chocs thermiques sur la croissance de *D. tertiolecta*

Afin de quantifier l'impact des échauffements reçus par le plancton transitant dans les circuits de refroidissement des centrales thermiques littorales un module expérimental a été réalisé (MACGI et Coll., 1980). Les effets d'élévations brutales de température ont ainsi été analysés sur plusieurs espèces algales (*Phaeodactylum tricornutum*, *Gyrosigma spencerii* et *Dunaliella tertiolecta*).

Nous avons représenté les résultats obtenus avec *D. tertiolecta* (fig. 1), exprimés en termes de pourcentages de développement par rapport à des cultures témoins. Les échauffements subis sont de 10, 12, 15 et 17° C pendant 5, 10, 15, 25 et 40 minutes à partir de températures initiales : 12, 16, 20 et 24° C.

Non seulement la croissance n'est pas altérée, même aux conditions extrêmes (41° C de température finale n'entraînent qu'un léger retard après 40 minutes d'application) mais elle est même améliorée lorsque la température initiale est basse (12° C) et le choc thermique élevé (17° C).

Aucune différence sensible n'a été notée en ce qui concerne les volumes cellulaires moyens.

2. Effets d'une chloration surajoutée à un choc thermique

Nous avons illustré dans la fig. 2 les effets d'une chloration ponctuelle (de 5, 10, 15, 25 ou 40 minutes), jointe aux mêmes chocs thermiques, sur la croissance de *D. tertiolecta*.

Les résultats sont exprimés en pourcentages de développement par rapport aux témoins en fonction des différentes contraintes exercées et ceci au 10e jour de culture (phase de plateau). Il est clair que l'action biocide du chlore, même appliqué pendant un temps très court, est immédiate et qu'il agit semble-t-il en synergie avec les échauffements puisque l'absence d'élévation thermique permet quelques reprises de croissance.

3. Effets du chlore sur la croissance et la taille de *D. tertiolecta*

Des expériences préliminaires nous ayant permis de constater qu'à partir d'un seuil de 0,5 mg/l de chlore le développement était gravement altéré du fait de la mortalité cellulaire, nous nous sommes intéressés à des teneurs sub-létales : 0,1 et 0,3 mg/l. Les résultats concernant la croissance cellulaire à 20° C, après 5 à 40 minutes de chloration, sont représentés sur la fig. 3, de même que les variations journalières de volume plasmique par rapport au témoin (V./Vo). On constate ainsi que malgré des retards dans le développement à 0,3 mg/l proportionnels à la durée de chloration, on n'observe pas d'altérations dans les volumes cellulaires.

.../...

4. Effets d'un sel de zinc sur la croissance et la taille de *D. tertiolecta*

Du citrate de zinc : $Zn_3 (C_6 H_5 O_7)_2 \cdot 2 H_2 O$ a été injecté dans des cultures en début de phase exponentielle aux concentrations de 4, 8 et 16 mg/l de zinc. Les résultats de la fig. 4 montrent que parallèlement à des altérations de la croissance à 16 mg/l on note des hypertrophies cellulaires qui augmentent au cours du temps, même aux concentrations plus faibles.

5. Effets de sels de zinc et de cuivre sur la croissance et la taille de *Tetrasetimis suecica*

Le zinc et le cuivre sous forme de sulfates et d'acétates ont été injectés dans les mêmes conditions que précédemment. Les variations dans le développement sont représentées dans la fig. 5, tandis que les altérations du volume cellulaire moyen sont examinées dans la fig. 6. Le phénomène précédemment décrit est ici amplifié. La croissance est ralentie (diminution du rythme des divisions) à 15 et 20 mg/l de zinc et de 3 à 10 mg/l de cuivre proportionnellement à la concentration et de façon comparable pour les deux sels. En revanche les modifications du volume cellulaire sont de grande amplitude, progressives pour le zinc (ce qui était déjà le cas pour le citrate) et cycliques pour le cuivre.

L'action du zinc paraît plus nocive à concentrations voisines (15 et 16 mg/l) sur *Tetrasetimis* que sur *Dunaliella* lorsqu'on examine les hypertrophies du volume cellulaire.

Notons cependant qu'il peut s'agir dans ce cas non de formes flagellées mais de kystes dont le volume est nettement supérieur.

III - DISCUSSION

Ces résultats permettent de préciser un certain nombre d'éléments à prendre en considération pour des tests d'écotoxicité utilisant des cultures d'algues marines unicellulaires.

En effet, si un indice rapide de toxicité peut être la mortalité cellulaire - ce qui se traduit par un retard dans la phase de latence - il est par contre plus démonstratif, à des teneurs sub-létales entraînant ou non une diminution du rythme des divisions (phase exponentielle) de contrôler les variations compensatrices du volume cellulaire.

Ceci est particulièrement sensible chez les flagellés aptes à réguler activement leurs échanges membranaires ou à produire spontanément des formes de résistance.

Les protocoles expérimentaux sont simples puisqu'il s'agit de cultures en masse (6 litres par essai) subissant quotidiennement un sous échantillonnage permettant les dénombrements cellulaires et les observations.

Le milieu de culture est largement utilisé par d'autres laboratoires (E.S. de PROVASOLI) et l'eau de mer naturelle filtrée sur 0,22 μ convient à une croissance non carencée.

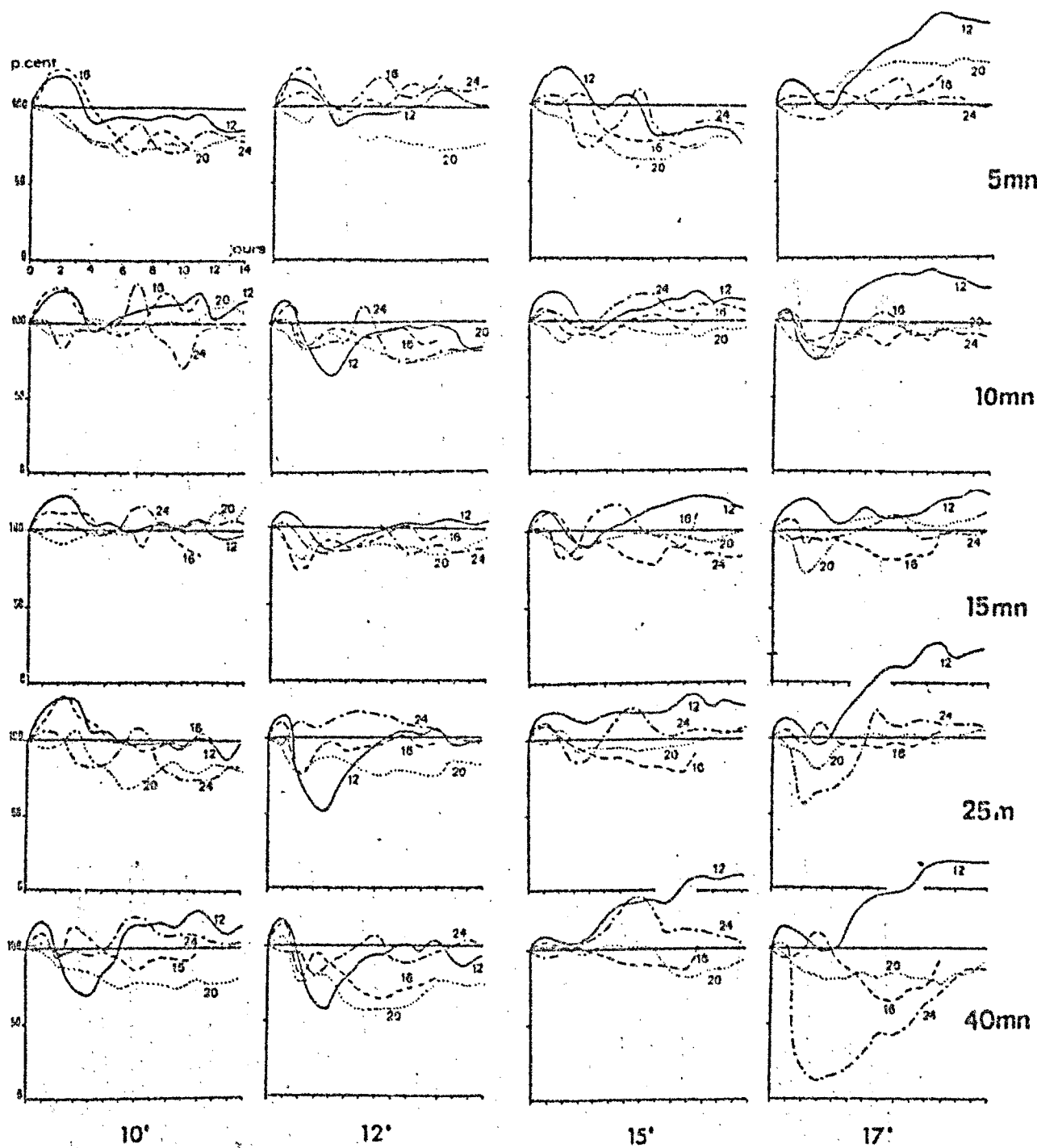
Les conditions de culture (éclairage de rythme 12/12, température contrôlée) sont propres à toutes les salles isothermes équipées en algorithme et les souches monospécifiques peuvent être obtenues auprès de laboratoires spécialisés sans difficulté majeure (Laboratoires de Plymouth, d'Helgoland etc.).

Des tests de ce type ont en outre l'avantage d'être rapides (10 à 15 jours à 16° C) tout en étant riches en information, ce qui devrait permettre de s'orienter vers un test standard propre au phytoplancton marin ou d'eau saumâtre.

IV - BIBLIOGRAPHIE

- BIGGS (D.C.), ROWLAND (R.G.) et WURSTER (C.F.), 1979. - Effects of trichloroethylene, hexachlorobenzene and polychlorinated biphenyls on the growth and cell size of marine phytoplankton. - Bull. Environm. Contam. Toxicol. 21, 196 - 201.
- DASTE (P.), KHALANSKI (M.) et NEUVILLE (D.), 1978. - Effets de facteurs thermique et chimique, liés au refroidissement des centrales nucléaires, sur quatre espèces phytoplanctoniques cultivés in vitro. C.R. Acad. Sc. Paris (286), Série D : 1911 - 1913.
- DAVIES (A.G.), 1970. - Iron, chelation and the growth of marine phytoplankton. I. Growth kinetics and chlorophyll production in cultures of the euryhaline flagellate *Dunaliella tertiolecta* under iron-limiting conditions. - J. Mar. Biol. Ass. U. K. (50) : 65 - 86.
- DAVIES (A.G.), 1976. - An assessment of the basis of mercury tolerance in *Dunaliella tertiolecta*. - J. Mar. Biol. Ass. U. K. (56) : 39-57.
- HIRAYAMA (K.) et HIRANO (R.), 1970. - Influences of high temperature and residual chlorine on marine phytoplankton. - Mar. Biol., 7 : 205 - 213.
- JENNINGS (J.R.), 1979. - The effect of cadmium and lead on the growth of two species of marine phytoplankton with particular reference to the development of tolerance. Journal of Plankton Research. (1) 2 : 121 - 136.
- LASSUS (P.) et MAGGI (P.), 1980. - Influence de chocs thermiques et d'un traitement au chlore sur la croissance d'organismes phytoplanctoniques marins. 2. Le flagellé *Dunaliella tertiolecta* (Butcher). Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit. (302) : 1-9.
- Mc LACHLAN (J.), 1960. - The culture of *Dunaliella tertiolecta* Butcher. - A euryhaline organism. Can. J. Microbiol. (6) : 367-379.

- MAGGI (P.), LASSUS (P.) et ABARNOU (A.), 1980. - Influence de chocs thermiques et d'un traitement au chlore sur la croissance d'organismes phytoplanctoniques marins. 1. La diatomée *Gyrosigma spencerii* (Cleve). Science et Pêche. Bull. Inst. Pêches marit. (301) : 1 - 15.
- RIISGARD (H.U.), 1979. - Effect of Copper on volume regulation in the marine flagellate *Dunaliella marina*. Marine Biology (50) : 189 - 193.
- ROBERTS (M.H.) JR 1977. - Bioassay procedures for marine phytoplankton with special reference to chlorine. Chesapeake Science (18), 1, : 130 - 136.
- SJOBLAD (R.D.), CHET (I.), MITCHELL (R.), 1978. - Quantitative assay for algal chemotaxis. Applied and environmental Microbiology. (36), 6 : 847 - 850.
- VIDEAU (C.), KHALANSKI (M.) et PENOT (M.), 1979. - Preliminary results concerning effects of chlorine on monospecific marine phytoplankton. - J. Exp. Mar. Biol. Ecol., (36) : 111 - 123.



DUREES DES PALIERS THERMIQUES

ELEVATIONS THERMIQUES

FIGURE 1 : Pourcentages de développement, par rapport au témoin, de cultures de *Dunaliella tertiolecta* subissant un échauffement brutal, à partir des températures 12, 16, 20 et 24°.

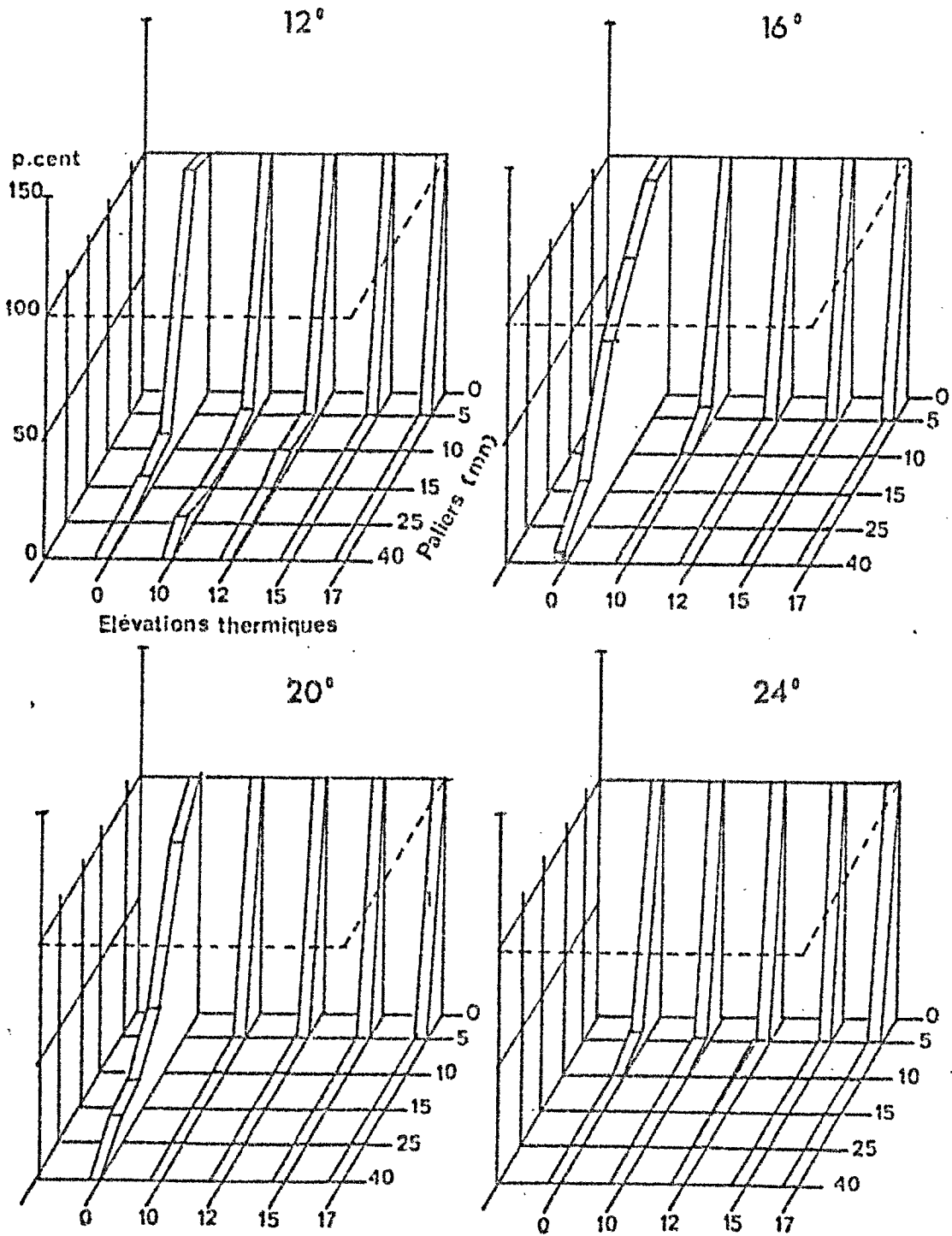


FIGURE 2 : Effets d'une chloration de 0,5 mg/l sur le développement de *Dunaliella tertiolecta* au 10ème jour de culture pour les températures initiales 16, 20 et 24° et au 18ème jour pour 12°

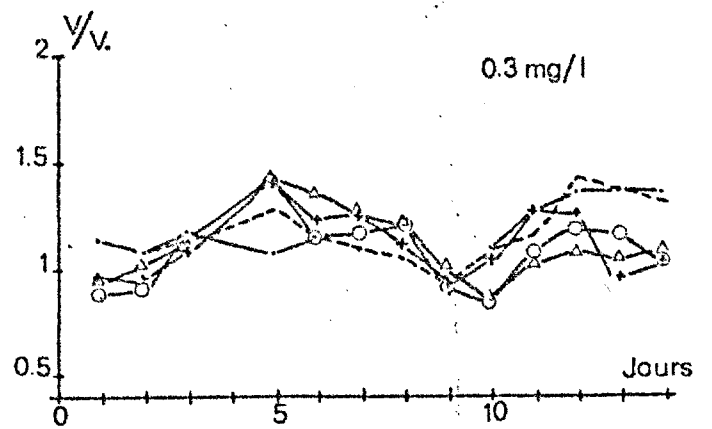
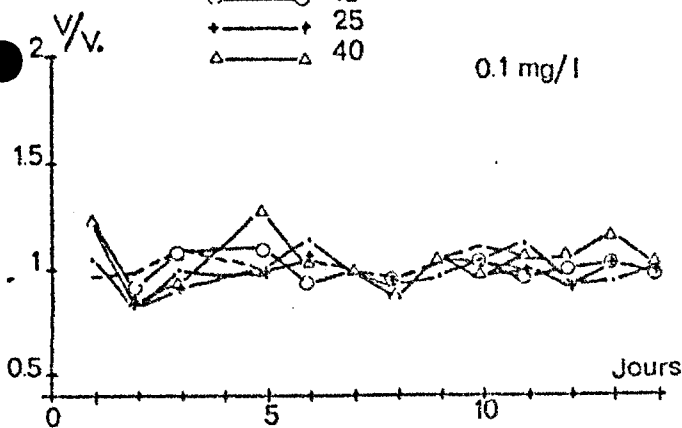
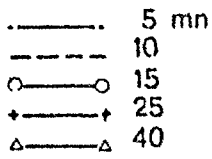
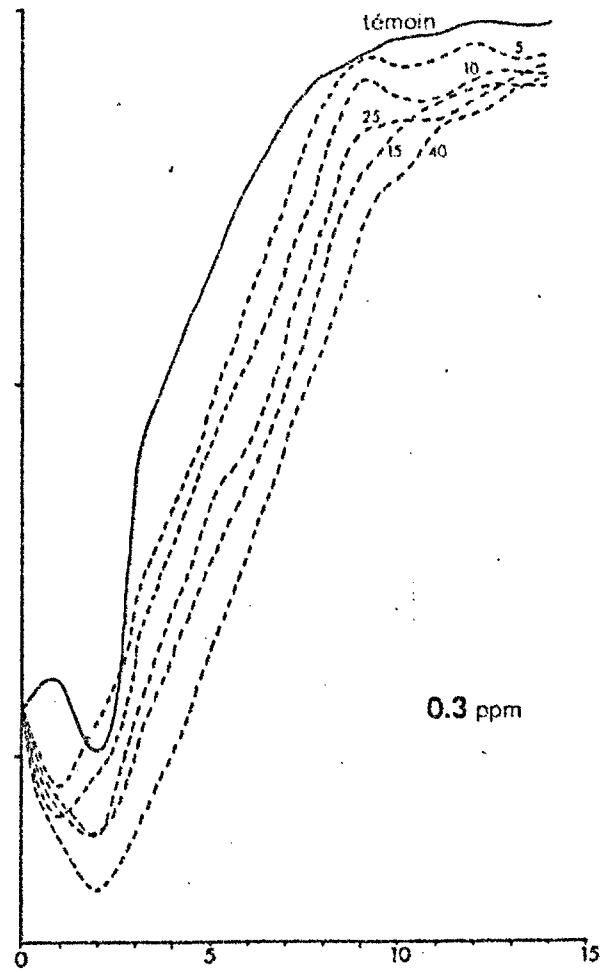
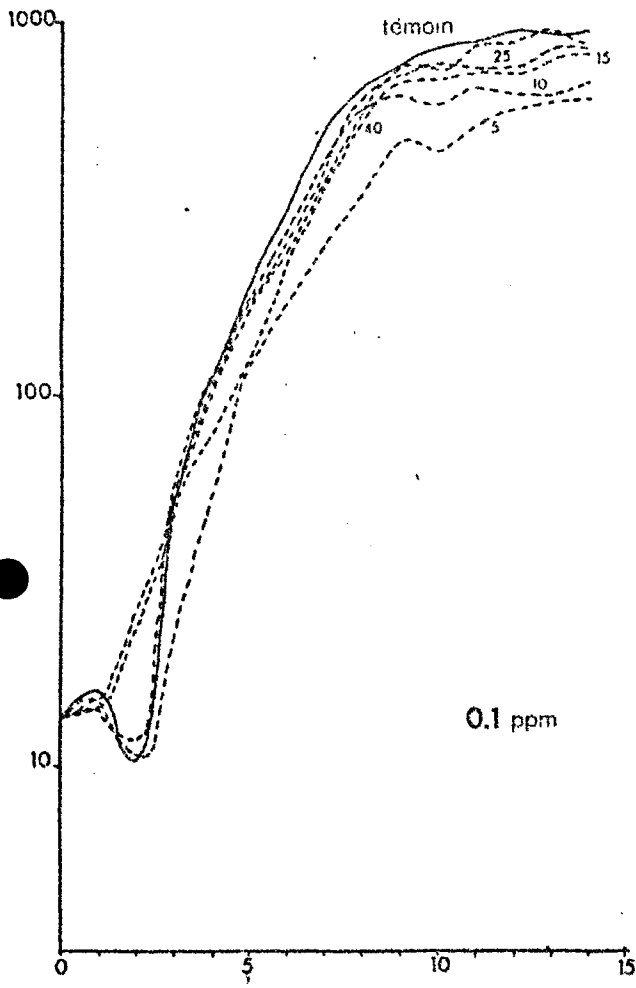


Figure 3 : Effets d'une chloration de 0,1 et 0,3 mg/l sur la croissance et le volume cellulaire de *Dunaliella tertiolecta* à 20° C.

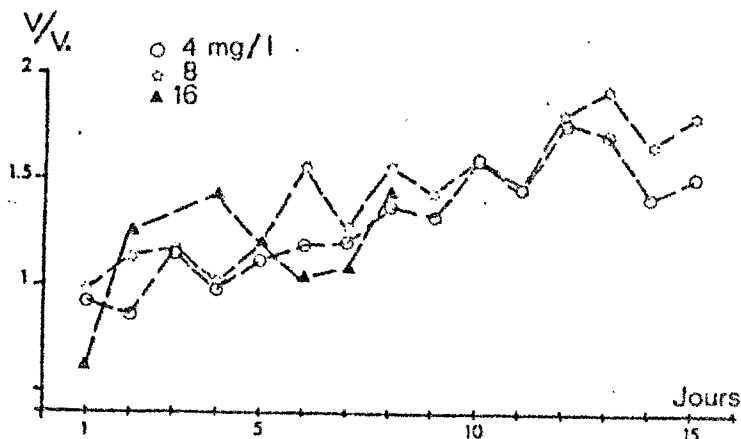
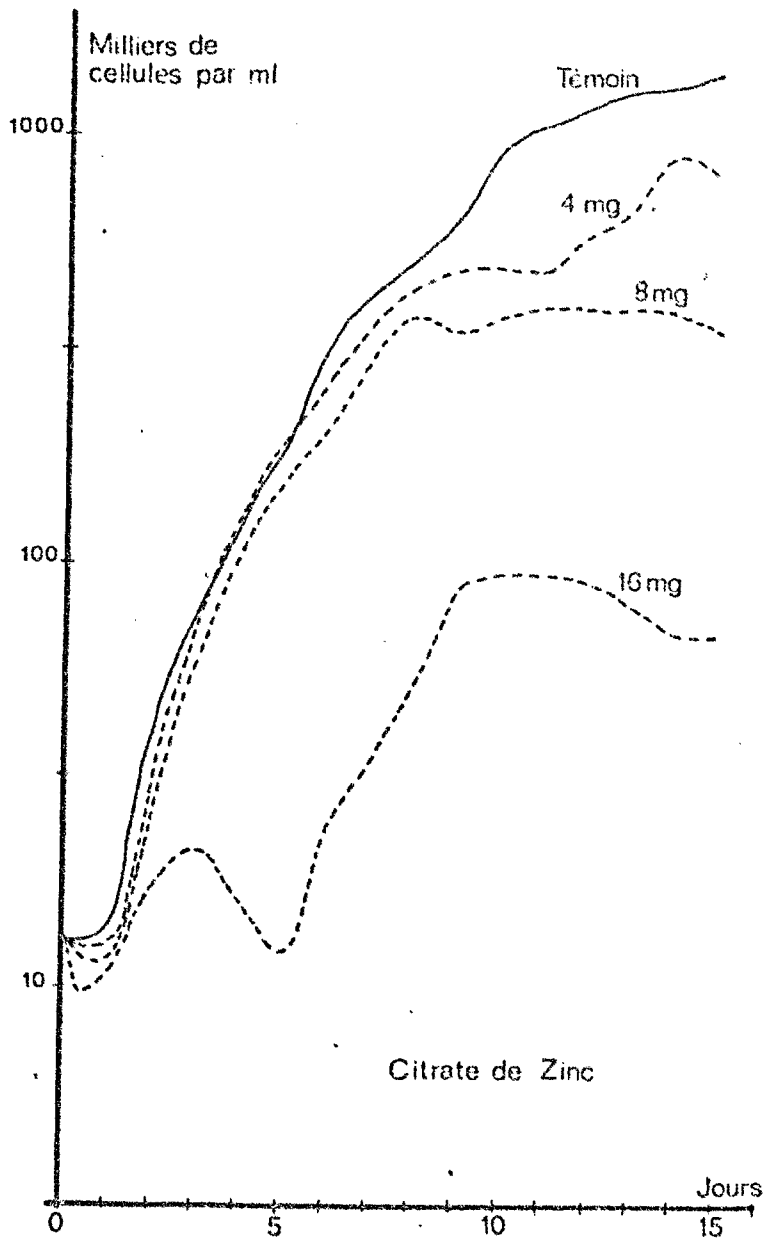


FIG. 4 : Influence du Citrate de Zinc sur la croissance et le volume cellulaire de Dunaliella tertiolecta.

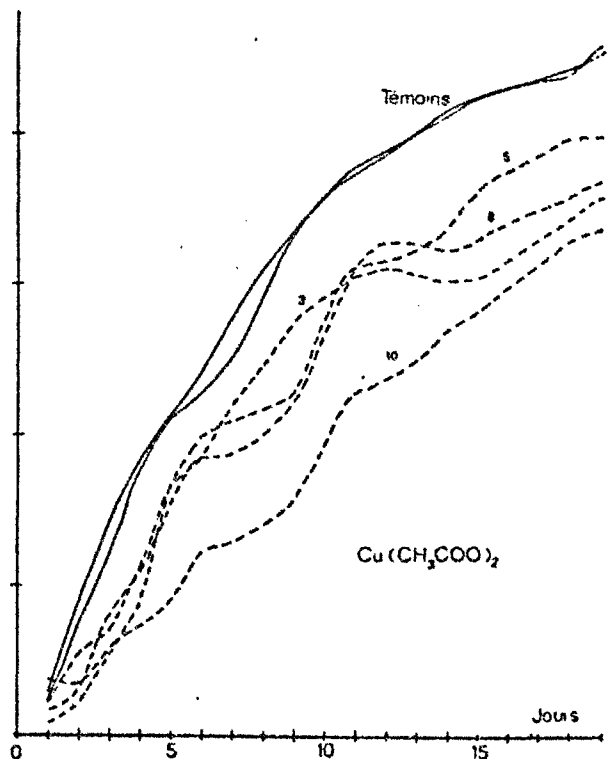
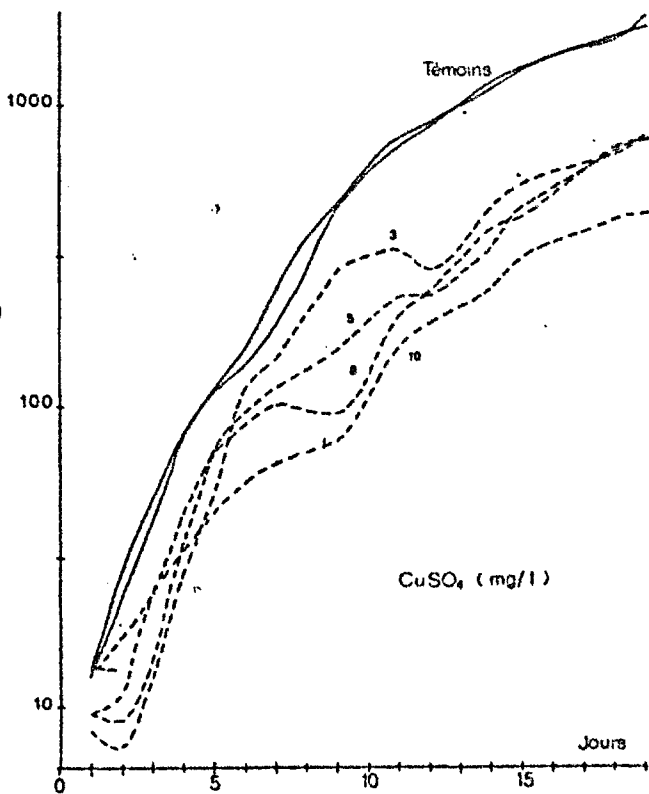
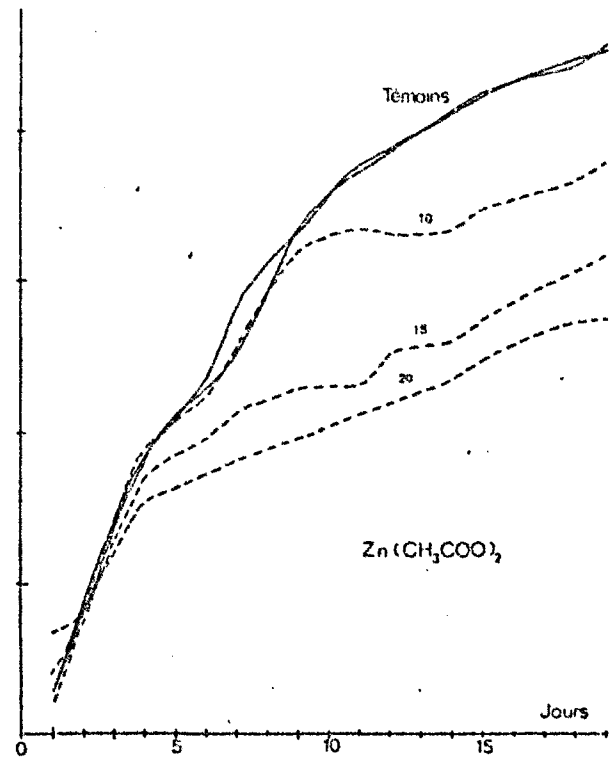
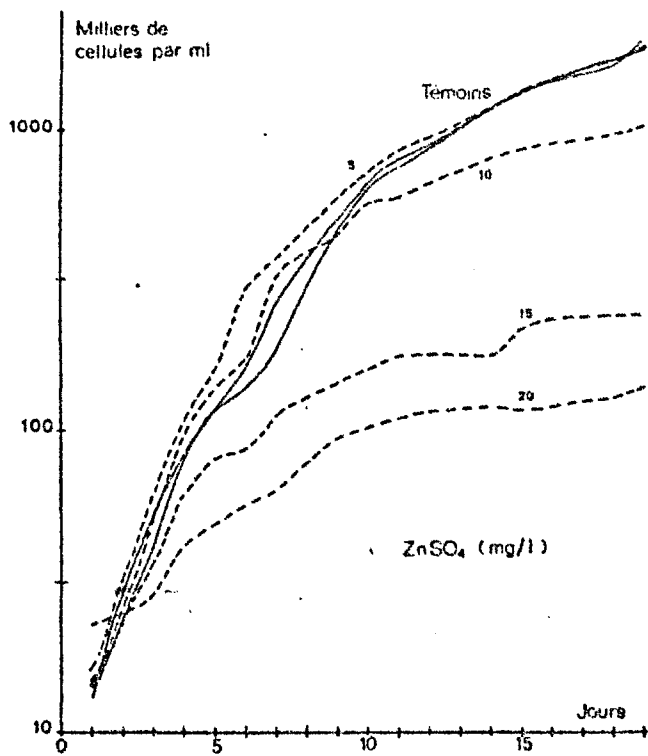


Figure 5 : Développements de *Tetraselmis suecica* pour diverses concentrations en sulfate et acétate de zinc et de cuivre à 20° C.

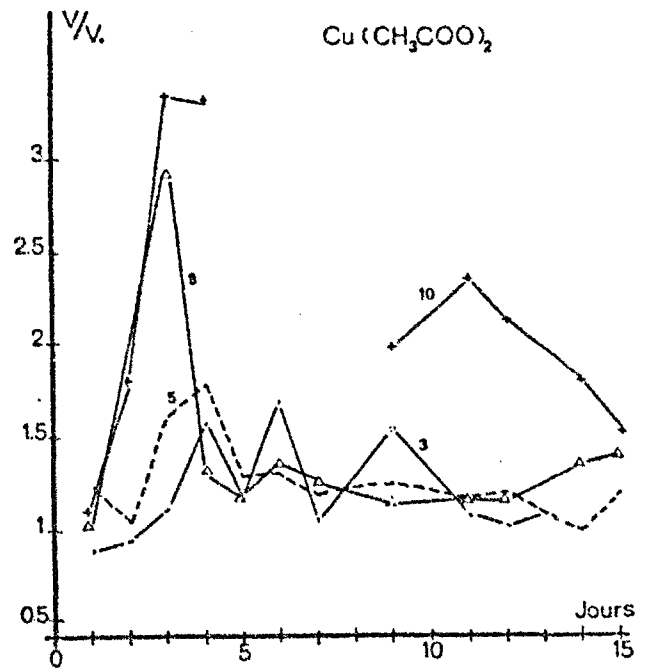
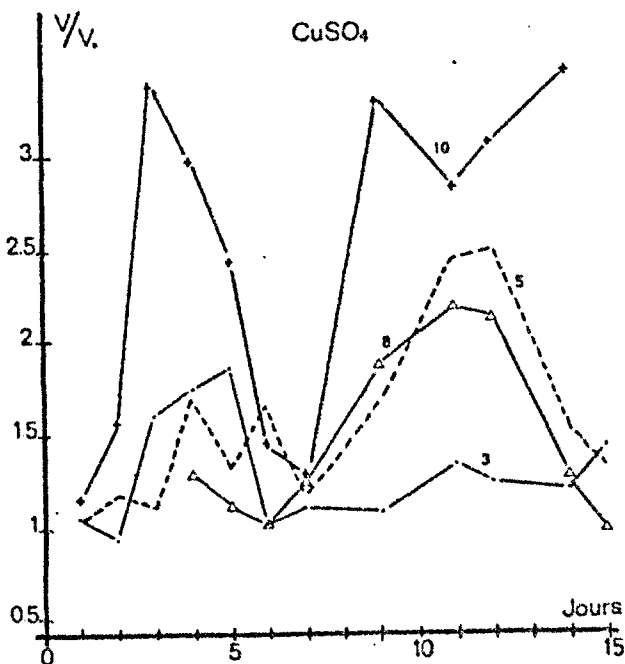
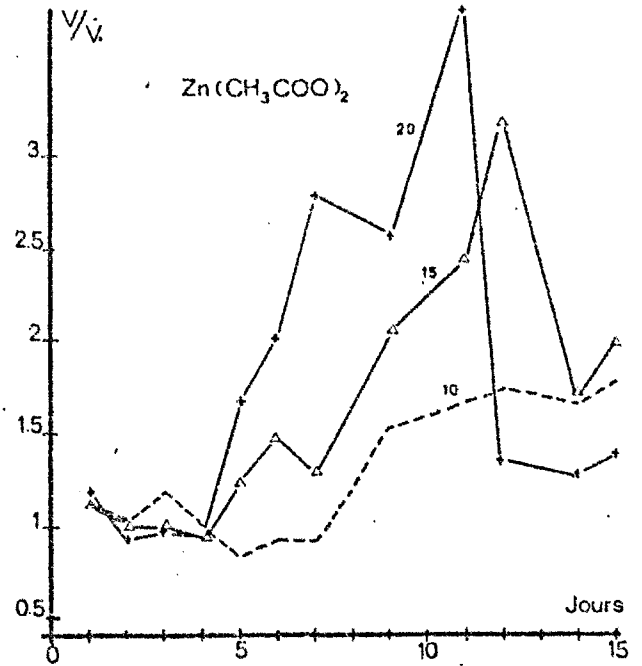
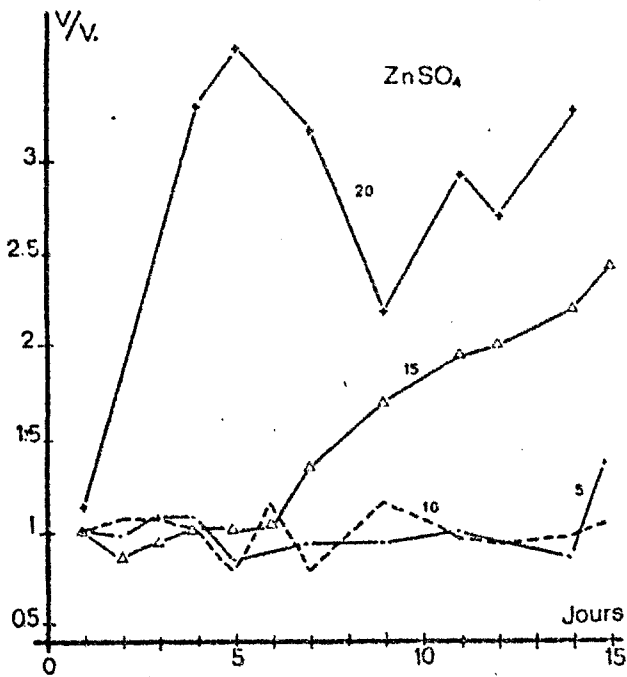


Figure 6 : Variations de volume cellulaire de *Tetraselmis suecica* pour diverses concentrations en sulfate et acétate de zinc et de cuivre à 20° C.