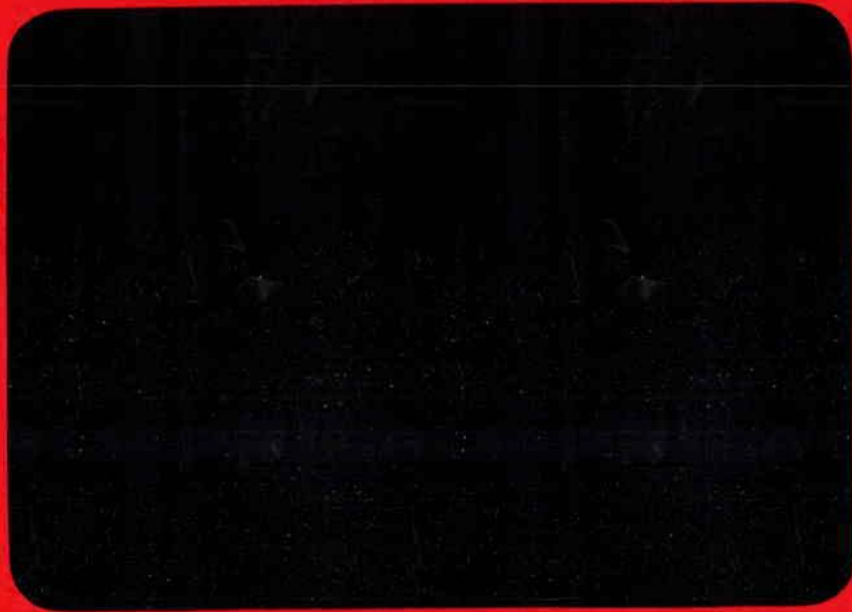


INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DES PECHES MARITIMES





Nantes le 9 novembre 1979

INFLUENCE DE CHOCS THERMIQUES
ET D'UN TRAITEMENT AU CHLORE
SUR LA CROISSANCE D'UN FLAGELLE
Dunaliella tertiolecta (BUTCHER)

par

P. MAGGI et P. LASSUS

avec la collaboration technique de :
M. BARDOUIL, G. BOCQUENE et L. LE DEAN

CONTRAT E.D.F. DIRECTION DE L'EQUIPEMENT DE PARIS : Etude
expérimentale des effets des échauffements sur la vie marine
des côtes atlantiques et de la Manche (1ère partie) du
15 juillet 1975.

INFLUENCE DE CHOCS THERMIQUES ET D'UN TRAITEMENT
AU CHLORE SUR LA CROISSANCE D'UN FLAGELLE
Dunaliella tertiolecta (Butcher)

— Cette étude vient compléter un rapport (1) consacré exclusivement à l'influence de chocs thermiques sur la croissance de *Dunaliella tertiolecta* cultivé à 12, 16, 20 et 24° C.

Nous nous efforcerons de rapprocher ces résultats antérieurs de ceux présentés ici et qui ont trait aux conséquences de traitements de chloration surajoutés ou non à un choc thermique sur le développement de ce flagellé. —

I - METHODOLOGIE

La méthodologie reste semblable à celle que nous avons adoptée pour les espèces précédemment expérimentées (*Phaeodactylum tricorutum* et *Gyrosigma spencerii*), aussi nous renvoyons aux rapports précédents pour la description des courbes de descente en température et des montages expérimentaux ; le schéma de nos appareillages est cependant rappelé dans la figure 1.

La solution d'hypochlorite de sodium est préparée et titrée avant l'expérimentation ; elle est injectée dans le circuit d'eau de mer à l'entrée de l'échangeur thermique au moyen d'une pompe, de façon à avoir 0,5 mg/l de chlore actif à l'injection. La concentration en chlore résiduel a été suivie pour chaque essai, par la méthode à la diéthylparaphénylène diamine (D.P.D.) appliquée à l'eau de mer (FIQUET, 1978). Les cinétiques de disparition du chlore résiduel comprend l'ensemble des éléments oxydants réagissant lors du dosage. Le taux moyen de chlore résiduel a été de l'ordre de 0,05 à 0,1 mg/l pour 0,5 mg/l injecté.

Des expériences préliminaires ont montré les variations obtenues dans la demande en chlore de l'eau de mer selon son traitement. De ce fait, nous avons dû fixer certains critères préalables :

./...

(1) Influence de chocs thermiques sur la croissance d'un flagellé :
Dunaliella tertiolecta (Butcher), 30 novembre 1977.

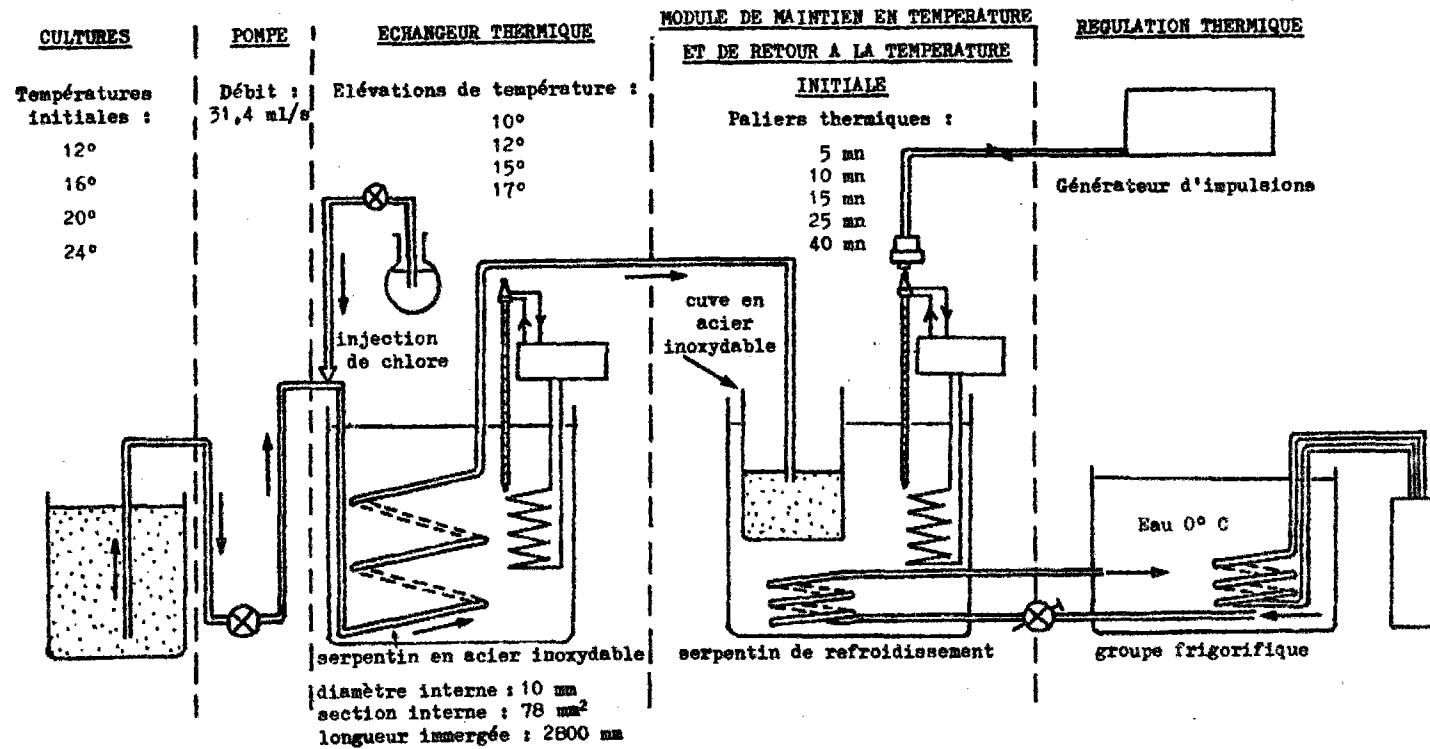


FIGURE 1 : Schéma du dispositif expérimental.

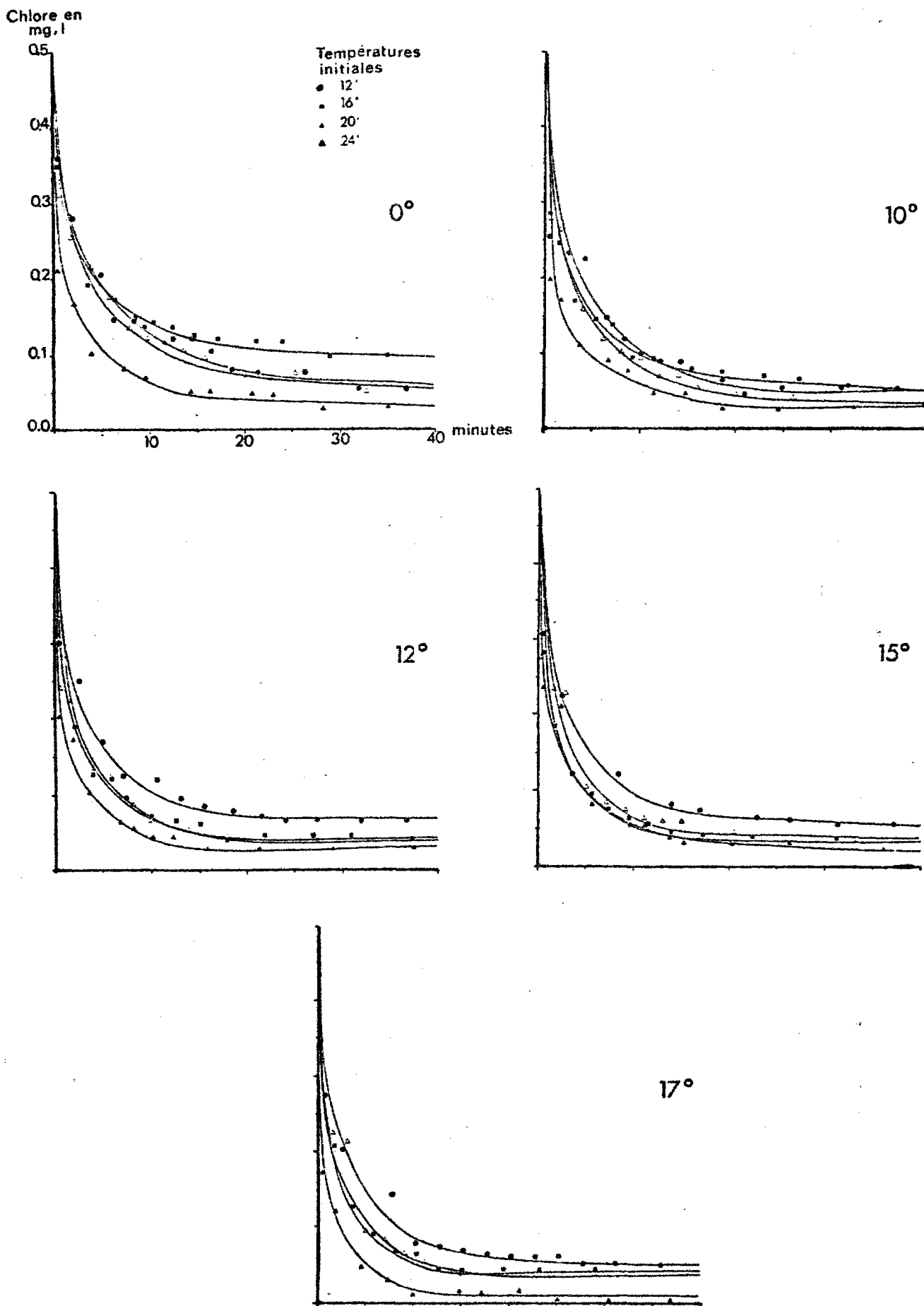


FIGURE 2 : Evolution au cours du temps des teneurs en chlore libre pour chaque élévation thermique étudiée (0, 10, 12, 15 et 17° C) après injection de 0,5 mg/l.

- l'eau de mer utilisée est filtrée sur membrane de 0,22 μ de porosité, quelques heures avant chaque expérimentation ;

- l'inoculation est faite à partir d'une souche stérile de *D. tertiolecta* centrifugée à 1 400 g pendant 15 minutes : le culot est récupéré et dilué par de l'eau de mer filtrée.

De cette façon, on ramène à des valeurs insignifiantes les concentrations en vitamines, complexants et sels métalliques du milieu de culture encore présents ;

- chaque échantillon de 6 litres de culture initiale contenant 15 000 cellules environ par millilitre est agité à la fin des paliers thermiques et de chloration, après adjonction du milieu E. S. de PROVASOLI et de 2 ml de thiosulfate N/10 : durées de paliers thermiques et durées de chloration se trouvent donc confondues.

Des essais préliminaires ont montré que la concentration en thiosulfate employée était sans effet sur la croissance des organismes et excédait le seuil nécessaire à la neutralisation du chlore libre résiduel.

Les méthodes de mesure sont restées inchangées :

- numérations journalières des cellules au compteur de particules,
- distribution des volumes cellulaires,
- dosage de la chlorophylle a par spectrofluorimétrie.

Les cultures ont été suivies pendant 14 jours à 16, 20 et 24° et 18 jours à 12°, ce qui correspond à l'obtention de la phase de plateau pour le développement des témoins.

L'influence de la température d'acclimatation sur la croissance de cette algue est rappelée dans la figure 3.

Comme précédemment, nous avons étudié l'influence des élévations thermiques ou ΔT 10, 12, 15 et 17° sur *D. tertiolecta* auxquelles s'ajoute un traitement par 0,5 mg/l de chlore appliqué pendant les durées des paliers thermiques. Les paliers sont de 5, 10, 15, 25 et 40 minutes et les températures initiales 12, 16, 20 et 24°.

Parallèlement nous avons envisagé l'effet de la chloration à 0,5 mg/l pendant les différentes durées mais sans élévation thermique, pour les quatre températures initiales. Cette série d'essais sans choc thermique est désignée par $\Delta T 0$.

./...

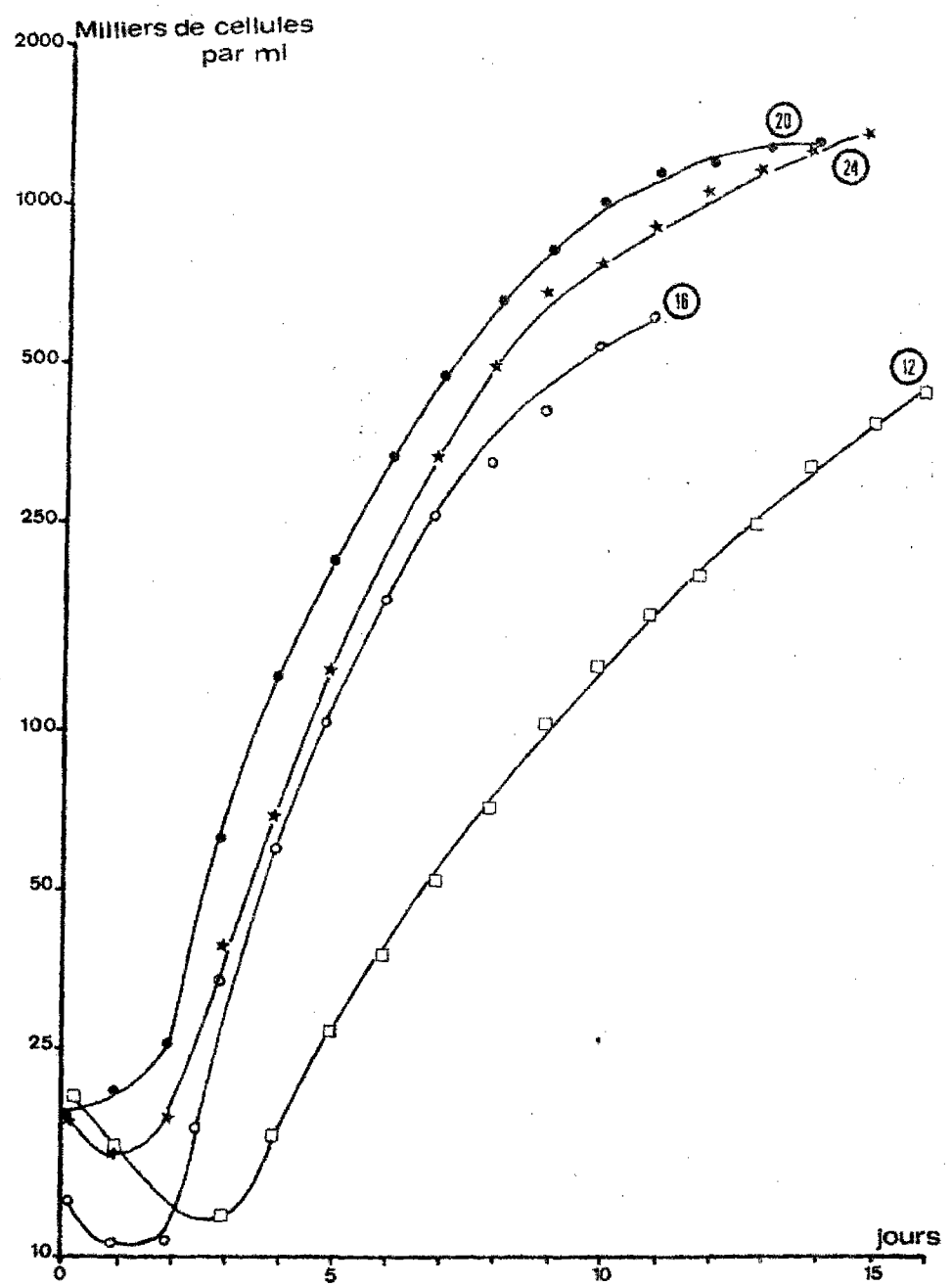


Figure 3 : Influence des températures 12, 16, 20 et 24°C sur le développement de Dunaliella tertiolecta

II - RESULTATS ET DISCUSSION

1°) Croissance cellulaire

Les résultats sont représentés en fonction de chaque élévation thermique étudiée.

L'injection de 0,5 mg/l de chlore, en l'absence de choc thermique provoque de sérieux dommages aux cultures (figure 4) :

- à la température initiale de 12° , les cellules sont détruites sauf celles exposées 5 minutes qui sont seulement retardées de 4 jours dans leur développement .

- à 16 et 20° les retards dans le développement augmentent avec la durée d'exposition jusqu'à atteindre 6 jours :

- à 24° les retards atteignent 9 jours pour pratiquement toutes les durées d'exposition.

Le même traitement ajouté aux élévations thermiques : 10, 12, 15 et 17° entraîne une destruction totale des cultures, quelle que soit la température initiale (figures 5 et 6). A la température initiale de 16° on observe quelques reprises tardives de développement, sans relation étroite avec la durée d'exposition.

On pourrait envisager à partir de ces observations un effet inhibiteur moins marqué à 16 et 20° C, en l'absence de chocs thermiques. Cependant en raison des variations de la demande en chlore du milieu récepteur ces résultats ne peuvent être considérés comme des valeurs absolues. Retenons simplement que la concentration 0,5 mg/l de chlore injecté semble être un seuil supérieur létal pour cette espèce, ce que nous avons déjà observé avec la diatomée *Gyrosigma spencerii* (1).

Afin de quantifier plus clairement ces données nous avons représenté sur la figure 7 les pourcentages de développement de *D. tertiolecta* par rapport à la moyenne des témoins, pour les différentes valeurs d'élévation thermique avec injection de 0,5 mg/l de chlore. Il apparaît ainsi

./...

(1) Influence de chocs thermiques et d'un traitement au chlore sur la croissance d'une diatomée *Gyrosigma spencerii* (Cleve),
20 avril 1978.

Milliers de cellules

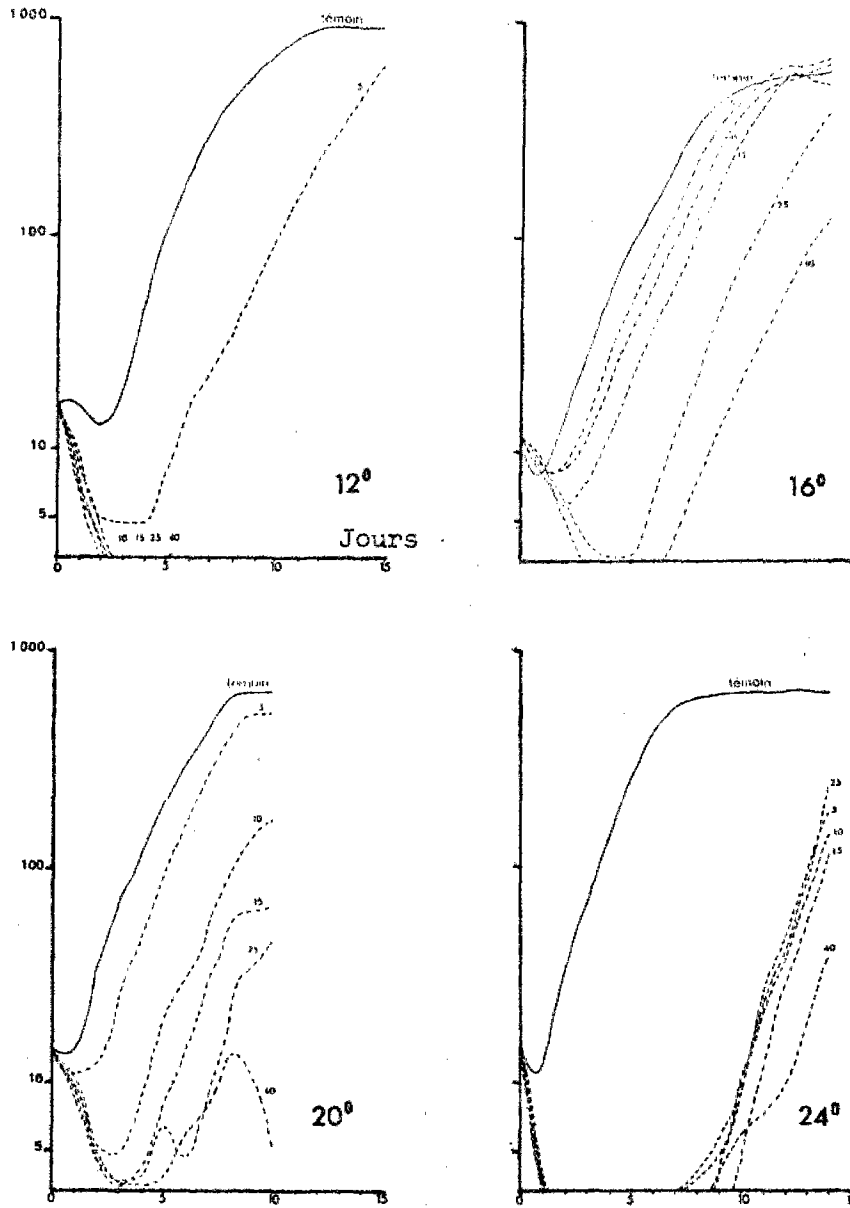


FIGURE 4 : Influence d'un traitement au chlore (0,5 mg/l) sans élévation thermique, aux températures initiales 12, 16, 20 et 24°, sur la multiplication cellulaire de Dunaliella tertiolecta.

Milliers de cellules

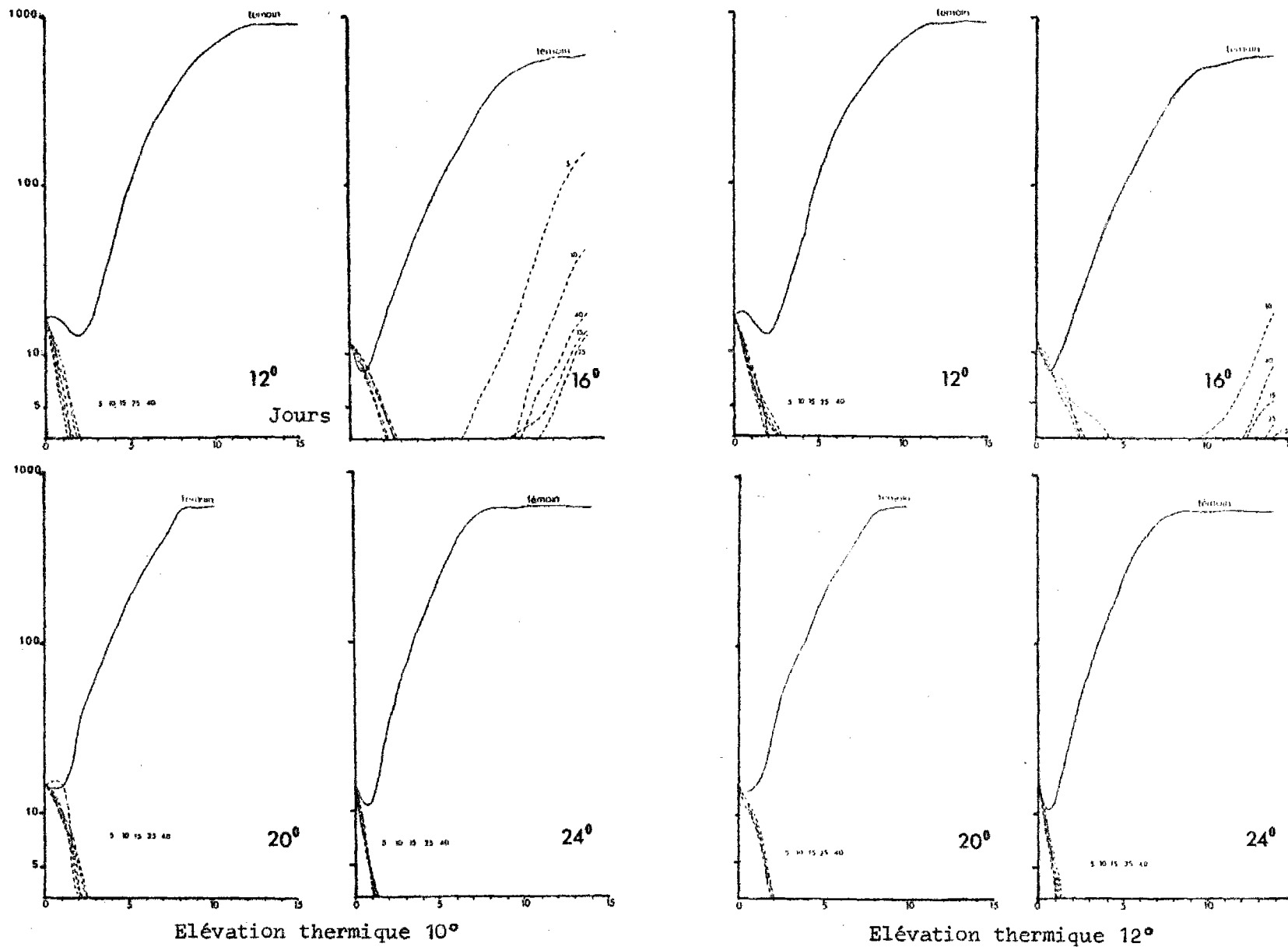


FIGURE 5 : Influence d'un traitement au chlore (0,5 mg/l) et d'élévations thermiques (10 et 12°), à partir des températures initiales 12, 16, 20 et 24°, sur la multiplication cellulaire de Dunaliella tertiolecta.

Milliers de cellules

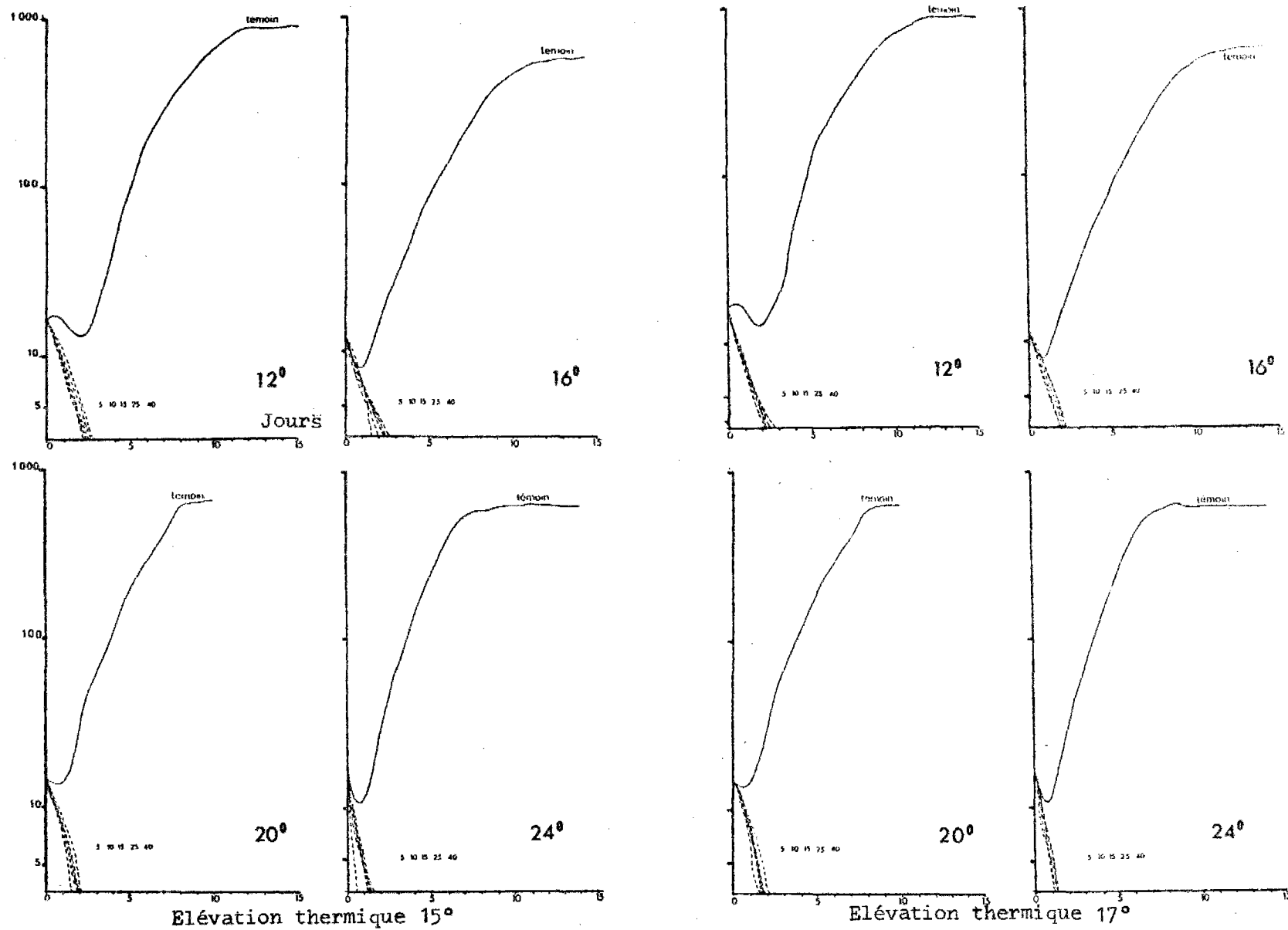


FIGURE 6 : Influence d'un traitement au chlore (0,5 mg/l) et d'élévations thermiques (15 et 17°), à partir des températures initiales 12, 16, 20 et 24°, sur la multiplication cellulaire de *Dunaliella tertiolecta*.

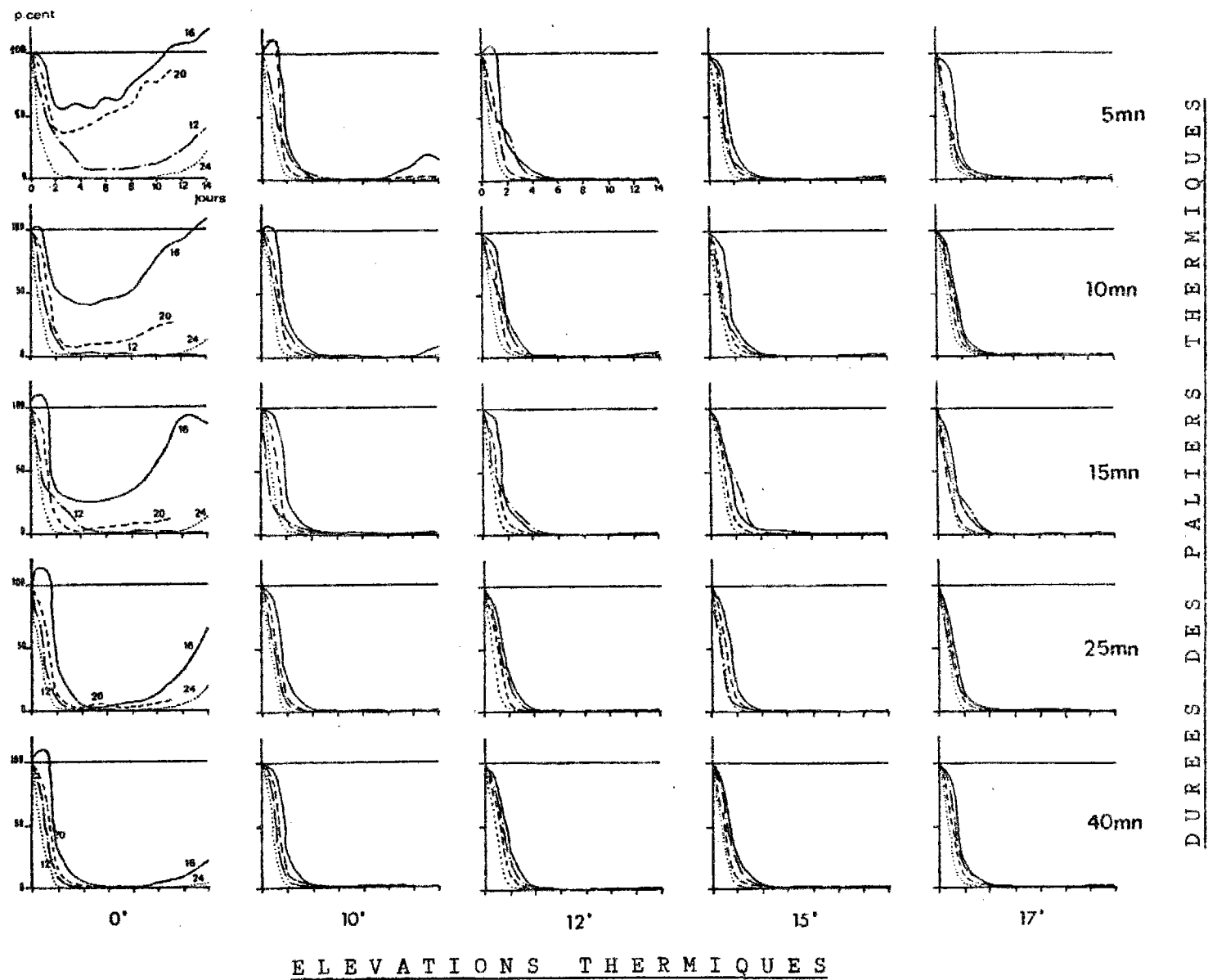


FIGURE 7 : Pourcentages de développement, par rapport au témoin, de cultures de *Dunaliella tertiolecta* subissant un échauffement brutal et une injection de chlore de 0,5 mg/l, à partir des températures initiales 12, 16, 20 et 24°.

de façon évidente que la combinaison échauffement/chloration provoque une destruction totale des cultures. L'effet toxique du chlore seul est globalement accentué par l'augmentation de la durée d'exposition au chlore, les cultures semblant plus résistantes à 16° C. Aux autres températures les reprises dans le développement ne sont observables que pour le ΔT 0 et le palier 5 minutes.

L'influence du temps de chloration apparaît d'ailleurs nettement pour le ΔT 0 dans le diagramme de la figure 8, contruit à partir des pourcentages de développement en début de phase de plateau pour tous les cas envisagés. Nous avons choisi le 10ème jour à 16, 20 et 24° C et le 18ème à 12° C qui correspondent à la fin de la phase exponentielle de croissance des cultures témoins. Les données numériques sont consignées sur le tableau 1.

2°) Chlorophylle a et volumes cellulaires

Des mesures de la concentration en chlorophylle a des cultures témoins et d'essais ont été effectuées à chaque expérience tous les deux jours. Elles confirment les résultats donnés par les courbes de croissance cellulaire sans que l'on puisse pour autant déceler une déficience de ce pigment dans les cultures chlorées qui reprennent leur croissance.

En ce qui concerne les volumes cellulaires, la figure 9 permet de représenter par deux exemples extrêmes les seules variations observées : pas de différence sensible dans les distributions par rapport au témoin lorsque les cultures ont repris leur développement (ΔT 0 à 20° C) et absence de mode lorsque les cultures sont détruites par le chlore associé à une élévation thermique quelconque (ΔT 12°).

Notons que lorsque les cultures chlorées en l'absence de choc thermique reprenaient leur développement, le rapport quotidien du volume cellulaire moyen du témoin et de celui des différents essais (V/V_0) était toujours peu différent de 1, ce qui implique une absence d'effet à long terme du chlore sur le volume cytoplasmique des cellules survivantes.

./...

Jour de culture	Ti (° C)	ΔT (° C)	Ti + ΔT (° C)	Paliers en minutes				
				5	10	15	25	40
18ème	12	0	12	94	5	4	0	0
10ème	16	0	16	91	76	58	16	4
10ème	20	0	20	77	24	10	7	0
18ème	12	10	22	1	0	0	1	0
18ème	12	12	24	0	0	0	0	0
10ème	24	0	24	2	1	0	1	1
10ème	16	10	26	4	0	0	0	0
18ème	12	15	27	0	0	0	0	0
10ème	16	12	28	0	0	0	0	0
18ème	12	17	29	0	0	0	0	0
10ème	20	10	30	0	0	0	0	0
10ème	16	15	31	0	0	0	0	0
10ème	20	12	32	0	0	0	0	0
10ème	16	17	33	0	0	0	0	0
10ème	24	10	34	0	0	0	0	0
10ème	20	15	35	0	0	0	0	0
10ème	24	12	36	0	0	0	0	0
10ème	20	17	37	0	0	0	0	0
10ème	24	15	39	0	0	0	0	0
10ème	24	17	41	0	0	0	0	0

TABLEAU 1 : Pourcentages de développement des cultures de *D. tertiolecta* aux 10ème et 18ème jours, en fonction des différents paramètres étudiés et pour une injection de 0,5 mg/l de chlore.

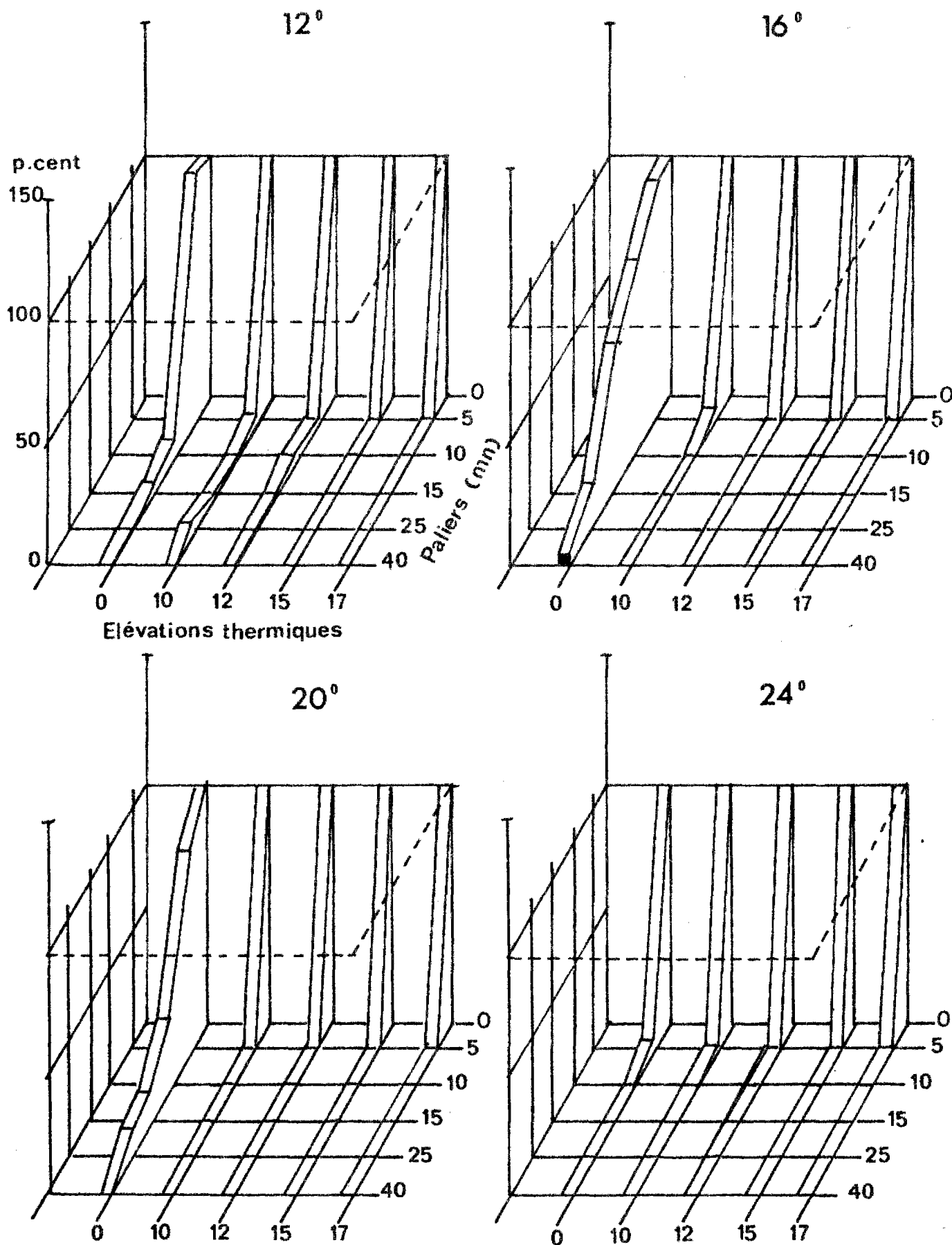


FIGURE 8 : Effets d'une chloration de 0,5 mg/l sur le développement de *Dunaliella tertiolecta* au 10ème jour de culture pour les températures initiales 16, 20 et 24° et au 18ème jour pour 12°

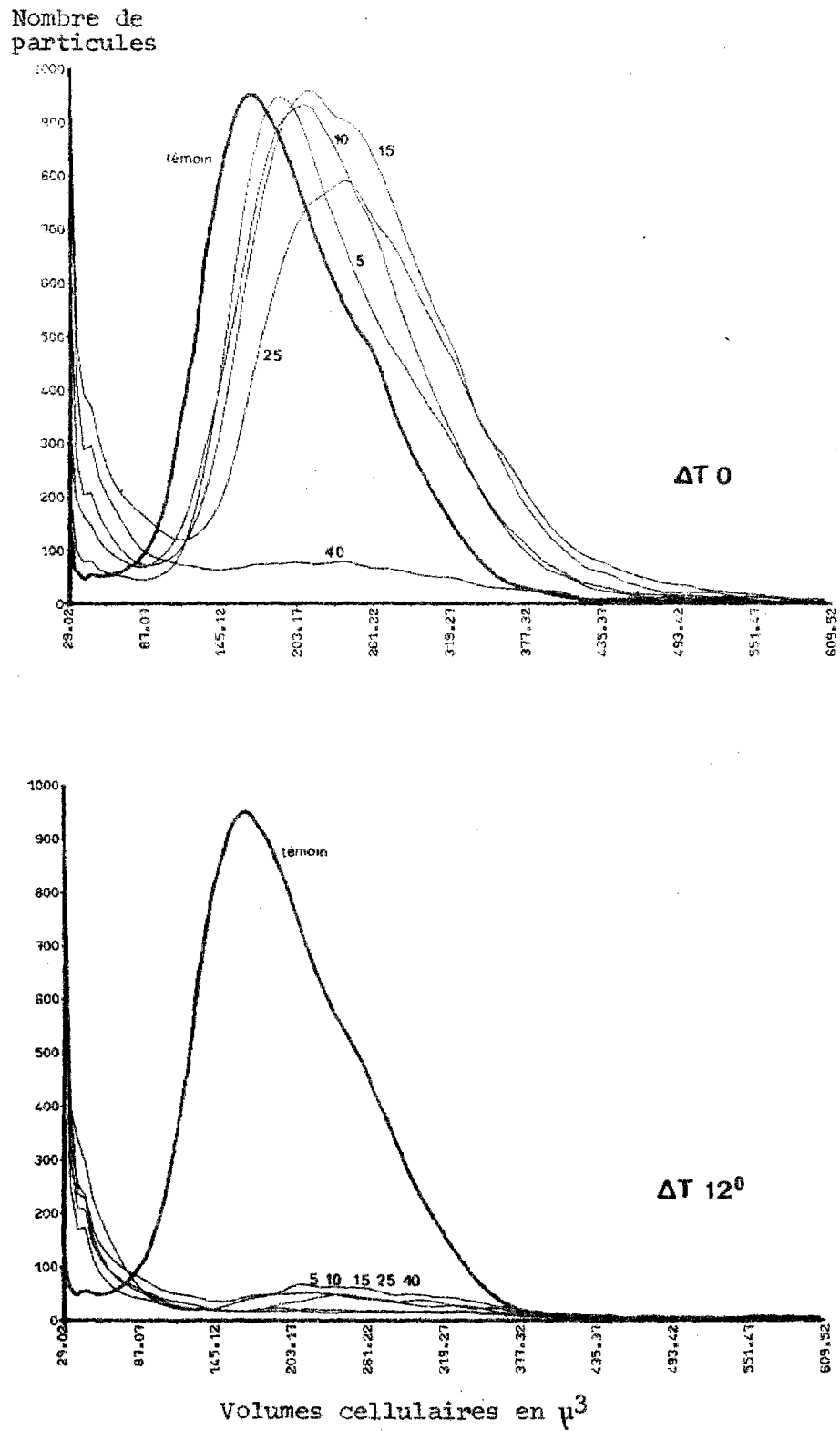


FIGURE 9 : distribution des volumes cellulaires, au 10ème jour de culture à 20°, pour différentes durées de chloration à 0,5 mg/l avec ou sans élévation thermique.

III - CONCLUSIONS

Dans un travail antérieur (1), concernant les effets de chocs thermiques sur *Dunaliella tertiolecta*, nous observons l'extrême résistance de ce flagellé aux variations brutales de température puisqu'aucun effet nocif important n'était décelé à moins de 41°.

Il semble qu'il en soit tout autrement des effets du chlore. En effet, l'injection de 0,5 mg/l de chlore provoque chez cette espèce un retard du développement, qui va de quelques jours à plus de deux semaines suivant le choc thermique reçu.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sur *Gyrosigma spenceri* à la même concentration, montre que les effets inhibiteurs sont plus marqués chez *D. tertiolecta*. Notons par exemple, sur les courbes de pourcentages de croissance, l'absence de reprise de développement, après un échauffement et une chloration de 5 minutes, alors qu'il n'en est pas de même chez *G. spenceri*.

* Néanmoins, pour ces deux algues, le chlore appliqué seul entraîne des retards de développement croissant de façon similaire avec l'augmentation de la durée d'exposition.

Il semble donc que ce flagellé soit un peu plus sensible au chlore que la diatomée antérieurement étudiée. Ces résultats sont opposables à ceux d'HIRAYAMA et HIRANO (1970) vis-à-vis d'un autre flagellé *Chlamydomonas sp.* dont le développement n'est pas affecté même après 5 à 10 minutes de chloration à 20 mg/l.

Dans un autre type d'expérimentation GENTILE, citée par MATTICE et ZITTEL (1976), fait état d'une CL 50 à 24 heures de 0,11 mg/l pour *D. tertiolecta*. Cependant, ces travaux ne font pas état de l'influence de la concentration cellulaire initiale. VIDEAU et Coll. (1979), par contre, montrent que la sensibilité au chlore de cultures de *D. primolecta* diminue avec l'augmentation de la densité cellulaire initiale, ce qui peut s'ex-

(1) Influence de chocs thermiques sur la croissance d'un flagellé : ./...

Dunaliella tertiolecta (Butcher), 30 novembre 1977.

pliquer par une diminution de la quantité d'agent oxydant disponible au niveau de chaque cellule lorsque le nombre de cellules est plus élevé. Pour une densité cellulaire initiale de 10^6 cellules par millilitre, la mortalité en 24 heures de *D. primolecta* est de 80 % pour 0,6 ppm de chlore.

Il est intéressant de remarquer la sensibilité au chlore de *D. tertiolecta* qui, par ailleurs, se révèle résistante à divers polluants tels que :

- les résidus de papeteries (STOCKNER et COSTELLA, 1976) ;
- le chlorure de mercure (DAVIES, 1976) ;
- les composés chlorés tels que le trichloroéthylène, l'hexachlorobenzène et les biphényles polychlorés (BIGGS et Coll., 1979).

BIBLIOGRAPHIE

- BIGGS (D.C.), ROWLAND (R.G.) et WURSTER (C.F.), 1979. - Effects of trichloroéthylène, hexachlorobenzène and polychlorinated biphenyls on the growth and cell size of marine phytoplankton. - Bull. Environm. Contam. Toxicol. 21, 196 - 201.
- DAVIES (A.G.), 1976. - An assessment of the basis of mercury tolerance in *Dunaliella tertiolecta*. - J. Mar. Biol. Ass. U.K.; 56, p. 39 - 57.
- FIQUET (J.M.), 1978. - Contribution à l'étude du dosage du chlore dans l'eau de mer. - Techniques et Sciences municipales, l'Eau, p. 239 - 245.
- HIRAYAMA (K.) et HIRANO (R.), 1970. - Influences of high temperature and residual chlorine on marine phytoplankton. - Mar. Biol., 7, p. 205 - 213.
- MATTICE (J.S.) et ZITTEL (H.E.), 1976. - Site-specific evaluation of power plant chlorination. - Journal WPCF 48 (10), p. 2284-2308.
- STOCKNER (J.G.) et COSTELLA (A.C.), 1976. - Marine phytoplankton growth in high concentrations of pulp mill effluent. - J. Fish. Res. Board. Can. 33, p. 2758-2765.
- 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.