

# Action de métaux lourds à des doses sublétales sur les caractéristiques de la croissance chez la diatomée *Skeletonema costatum*

B.R. Berland, D.J. Bonin, O.J. Guérin-Ancey, V.I. Kapkov\* et D.P. Arlhac

Station Marine d'Endoume et Centre d'Océanographie; Marseille, France

## Abstract

*Action of Sublethal Doses of Heavy Metals on the Growth Characteristics of the Diatom Skeletonema costatum*

Sublethal effects of mercury, cadmium and copper on the diatom *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve, grown in batch and bacteria-free culture are studied. Division rate, maximum yield growth, mean cell volume, particulate carbon and nitrogen, and  $^{14}\text{C}$ -bicarbonate uptake are used as toxic impairment criteria. Division rate is the first-affected and most sensitive parameter, but algal responses vary according to the metal. Hg produces an acute decrease in division rate, followed by a temporary recovery of growth capacity within the first 48 h after metal addition. Cd, on the other hand, increases division rate, followed by an obvious decrease. Cu reduces division rate slowly or quickly, depending on the metal concentration. Cell synthesis capacity (culture biovolume, particulate carbon and nitrogen, carbon assimilation) is less affected than division rate, especially with Hg. The C:N cell ratio is unchanged at sublethal concentrations, even when production is reduced. The mean cell volume is slightly affected: the variations are not greater than those of the control during its growth phases. Markedly teratological forms are never observed. In the authors' opinion, these results confirm that many parameters and growth kinetic aspects must be considered to fully appreciate the effects of sublethal concentrations of heavy metals. It would also be of advantage to develop a better methodology for such research, applying, for example, techniques already employed in enzymology.

## Introduction

Dans une publication antérieure, nous avons montré le rôle inhibiteur très important de certains métaux lourds sur la croissance du phytoplancton marin (Berland *et al.*, 1976). Cette étude, réalisée sur un grand nombre d'algues, a mis en évidence la diversité des résultats en fonction des espèces et permis de déterminer, parmi les espèces étudiées, celles qui sont les plus sensibles et celles, au contraire, plus résistantes, encore que, pour une même algue, les seuils de toxicité diffèrent selon les métaux utilisés. C'est ainsi qu'il est apparu que les algues marines sont particulièrement sensibles au mercure, résis-

tent à de fortes concentrations de plomb, et se différencient par des réponses très variées à la présence de cadmium et de cuivre.

Après ces premières recherches, il convenait de caractériser les perturbations apportées au métabolisme par la présence de métaux lourds à des concentrations sublétales, de vérifier quelles sont les premières manifestations de la toxicité sur la qualité de la production et de rechercher ainsi le paramètre estimatif de la croissance le plus approprié à détecter l'apparition de l'inhibition. Une telle étude était rendue d'autant plus nécessaire que jusque là assez peu de travaux ont été consacrés à cette question dans cette optique. De plus, certains d'entre eux, souvent mentionnés dans la littérature, tels ceux de Steemann Nielsen et collaborateurs (Steemann Nielsen *et al.*, 1969; Steemann Nielsen

\*Adresse actuelle: Dr. V.I. Kapkov, Chaire d'Hydrobiologie, Université Lomonosov, Moscou, URSS.

et Kamp-Nielsen, 1970; Steemann Nielsen et Wiium-Andersen, 1971), s'ils ont trait à l'influence du métal sur la photosynthèse et la croissance, concernent essentiellement les algues d'eau douce. Quant aux travaux portant sur les algues marines, ils ne se rapportent le plus souvent qu'à des aspects très limités du métabolisme, tel par exemple, le problème particulier de l'accumulation des métaux dans la cellule.

La mesure de la densité optique à 600 nm utilisée dans la précédente étude déjà citée, pour estimer la croissance, se justifiait par sa facilité d'emploi dans un travail de caractère extensif, mais cette méthode reste assez peu précise et ne donne qu'une indication globale résultant de nombreux facteurs: taille des cellules, densité du cytoplasme, épaisseur de la paroi cellulaire, richesse et nature des pigments (Spencer, 1954). Pour cette raison, nous avons préféré, dans le présent travail, suivre la croissance au moyen de critères variés nous permettant de mieux apprécier le comportement des cellules et l'évolution globale de la culture en présence de différentes concentrations de mercure, cadmium et cuivre. Nous avons employé plusieurs méthodes choisies volontairement parmi celles actuellement pratiquées en océanographie et qui permettent, à des titres divers, d'évaluer la matière organique en suspension dans les eaux marines: (a) certaines, de nature pondérale, donnent une indication sur la masse totale du matériel particulaire sans apporter d'information réelle sur l'état vivant ou non des cellules, telles les mesures de carbone et d'azote particulaires (le volume cellulaire estimé conjointement fournit, de plus, une appréciation sur la densité du cytoplasme); (b) l'assimilation du carbone par la méthode du  $^{14}\text{C}$ , qui reflète moins une biomasse qu'une vitesse de croissance mesurée pendant une période brève; (c) la mesure de l'ATP, qui est un constituant cellulaire très rapidement dégradé à la mort des cellules et qui est plus particulièrement représentative de la matière vivante *stricto sensu*<sup>1</sup>; (d) la numération cellulaire nécessaire à l'établissement de la vitesse de division et qui reste indispensable si l'on

Tableau 1. Composition du milieu expérimental de base

Eau de mer	900 ml
Eau distillée	100 ml
$\text{KNO}_3$	200 $\mu\text{moles}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, \text{H}_2\text{O}$	20 $\mu\text{moles}$
$\text{Na}_2\text{SiO}_3, 9\text{H}_2\text{O}$	120 $\mu\text{moles}$
$\text{FeCl}_3, 3\text{H}_2\text{O}$	4 $\mu\text{moles}$
TRIS	2 $\text{mmoles}$
Thiamine	600 $\text{nmoles}$
Biotine	1,6 $\text{nmole}$
$\text{B}_{12}$	0,55 $\text{nmole}$
Salinité	35 ‰
pH	7,8

Tableau 2. Concentrations métalliques sublétales utilisées, exprimées en  $\mu\text{g/l}$  (= ppb des auteurs anglo-saxons)

Métal	Sel	Concentrations de métal utilisées		
Hg	$\text{HgCl}_2$	5	7,5	10
Cd	$\text{CdCl}_2, 2,5\text{H}_2\text{O}$	25	50	100
Cu	$\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	50	100	200

veut rapporter tous les composants à l'unité cellulaire.

Dans cette optique et avec cette méthodologie, nous avons étudié la diatomée marine *Skeletonema costatum*, qui est d'un intérêt écologique certain et à l'origine de floraisons importantes dans les eaux superficielles de la province néritique, où, précisément, l'on peut penser que les perturbations apportées par les effluents industriels côtiers sont les plus marquées. Par ailleurs, de nombreux travaux lui ont été consacrés et, dans l'ensemble, les exigences nutritionnelles de cette espèce, ainsi que les divers aspects de ses comportements physiologique et biologique sont assez bien connus.

#### Matériel et méthodes

La souche de *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, maintenue en culture abactérienne, provenait de la collection du laboratoire de l'Office des Pêches canadien de Vancouver.

L'inoculum a été cultivé sur un milieu d'expérience (Tableau 1), plus pauvre en nutrilites que celui habituellement retenu pour les cultures d'algues dans notre laboratoire (Antia et al., 1975), et dont l'eau de mer, constituant essentiel, avait été prélevée en Méditerranée, à 10 milles au large des côtes marseillaises, à une profondeur de 50 m et

<sup>1</sup> Malheureusement les résultats obtenus avec cette méthode n'ont pu être exploités dans le présent travail, du fait de l'action des ions métalliques en particulier du mercure, qui diminuent l'activité enzymatique, sans qu'il soit possible de déterminer l'importance de cette erreur systématique avec une précision suffisante.

filtrée sur membrane de 0,22  $\mu\text{m}$ . Les phosphates et les vitamines sont incorporés au milieu de base après autoclavage de ce dernier, par filtration stérilisante. On doit remarquer que l'on n'apporte au milieu expérimental ni métaux-traces (excepté le fer), ni chélateur, tel d'EDTA, et ceci afin d'éviter tout masquage éventuel de l'action toxique des métaux lourds lié à une complexation, à une coprécipitation ou à un antagonisme entre constituants métalliques, comme cela a été démontré par Steemann Nielsen et Kamp-Nielsen (1970). L'expérimentation est conduite dans des ballons de 2 l, contenant 1,5 l de milieu. Les ensemencements sont effectués avec des inoculum provenant d'une culture mère en phase de croissance logarithmique apportant une densité cellulaire initiale de  $34 \cdot 10^3$  cellules par ml, densité qui peut être considérée comme élevée, mais qui était rendue nécessaire si l'on voulait que certaines analyses de nature pondérale pussent être effectuées dans de bonnes conditions; 48 h après l'ensemencement des ballons, les sels métalliques sont apportés stérilement sous forme de chlorures, pour chacun d'entre eux, à trois concentrations sublétales (Tableau 2), déterminées à partir des caractéristiques de toxicité observées dans un travail antérieur (Berland et al., 1976). L'expérience est menée en triplicate pour chacune des concentrations étudiées. Les réponses ainsi obtenues sont comparées à celles de trois témoins dans lesquels on n'a apporté aucun sel métallique, et qui, en conséquence, ne contiennent comme traces métalliques que celles initialement présentes dans l'eau de mer, que l'on peut considérer comme négligeables, car ne dépassant pas 1/50 des quantités les plus faibles ajoutées. Les cultures sont incubées à 20°C, sous une énergie lumineuse de 1,5 mW/cm<sup>2</sup>, dispensée par des tubes fluorescents "Sylvania-Grolux" et répondant à un rythme circadien de 14 h de jour et 10 h de nuit. Tout au long de l'expérimentation, d'une durée de huit jours, tous les prélèvements ont été réalisés systématiquement à une même heure, en début des périodes d'illumination, sauf en ce qui concerne la mesure d'assimilation du carbone pour laquelle un prélèvement supplémentaire a été fait en fin d'une période d'éclairage.

La numération cellulaire a été obtenue par observation directe au microscope, au moyen d'une chambre hématimétrique de Neubauer. Le nombre de cellules comptées ayant toujours été supérieur à 1 500, l'erreur doit être inférieure à  $\pm 5\%$ , avec un coefficient de sécurité de 95% (Lund et al., 1958). C'est à partir de

ces numérations que sont calculés les taux journaliers de division.

Les volumes cellulaires sont appréciés à partir des informations données par un compteur électronique de particules (compteur "Coulter" modèle "A industriel") équipé d'une sonde de 70  $\mu\text{m}$  d'ouverture. Une distribution de fréquence des particules est établie en fonction du volume avec un intervalle de classe de raison  $\sqrt{2}$  en volume. C'est à partir de l'histogramme ainsi obtenu qu'est déterminée la population des cellules, et qu'est ultérieurement calculé le volume moyen cellulaire de chaque population. *Skeletonema costatum* formant des chaînes, nous n'avons pu utiliser cette méthode électronique pour effectuer la numération cellulaire proprement dite.

Les teneurs en carbone et azote cellulaires sont mesurés à l'aide d'un analyseur "Perkin Elmer" modèle "240", selon la méthode décrite par Kerambrun et Sze kiolda (1969). Le matériel particulière est retenu sur filtre "Whatman" GFC de 25 mm de diamètre. Pour chaque échantillon, la quantité totale de cellules analysées a varié entre  $40 \cdot 10^6$  et  $80 \cdot 10^6$ . Le calcul final est obtenu en retirant un blanc correspondant à la moyenne des filtres neufs.

Le taux d'assimilation du carbone est mesuré par la méthode de Steemann Nielsen (1952). On inocule 1 ml de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  présentant une activité de 1,2  $\mu\text{Ci}$  dans chacun des récipients d'incubation, qui sont des tubes à essais stériles à bouchons vissés de 33 ml. Les cultures sont ensuite incubées à 20°C pendant 4 h sous une lumière identique à celle utilisée pour la culture expérimentale. Pour chaque prélèvement, 3 tubes sont incubés, dont un maintenu à l'obscurité pendant le même temps. Après incubation le contenu des tubes est filtré sur filtres "Millipore" 0,45  $\mu\text{m}$ , lesquels sont desséchés en présence de silicagel. L'activité des filtres est mesurée au moyen d'un spectromètre à scintillation liquide "Intertechnique SL 30" en utilisant le mélange scintillant suivant: toluène, 1 l; PPO, 4 g; diméthyl POPOP, 0,1 g. Les résultats sont exprimés en nombre de coups/min.

En ce qui concerne les numérations cellulaires, toutes les valeurs estimées pour chacun des flacons sont matérialisées dans l'exposé des résultats. Par contre, pour les autres paramètres, nous avons indiqué une valeur moyenne, procédé qui était rendu obligatoire, en particulier pour les analyses de carbone, d'azote et de volume particulières, puisque dans ces cas précis, les données étaient calculées à partir d'un seul échantillon obtenu par le mélange en

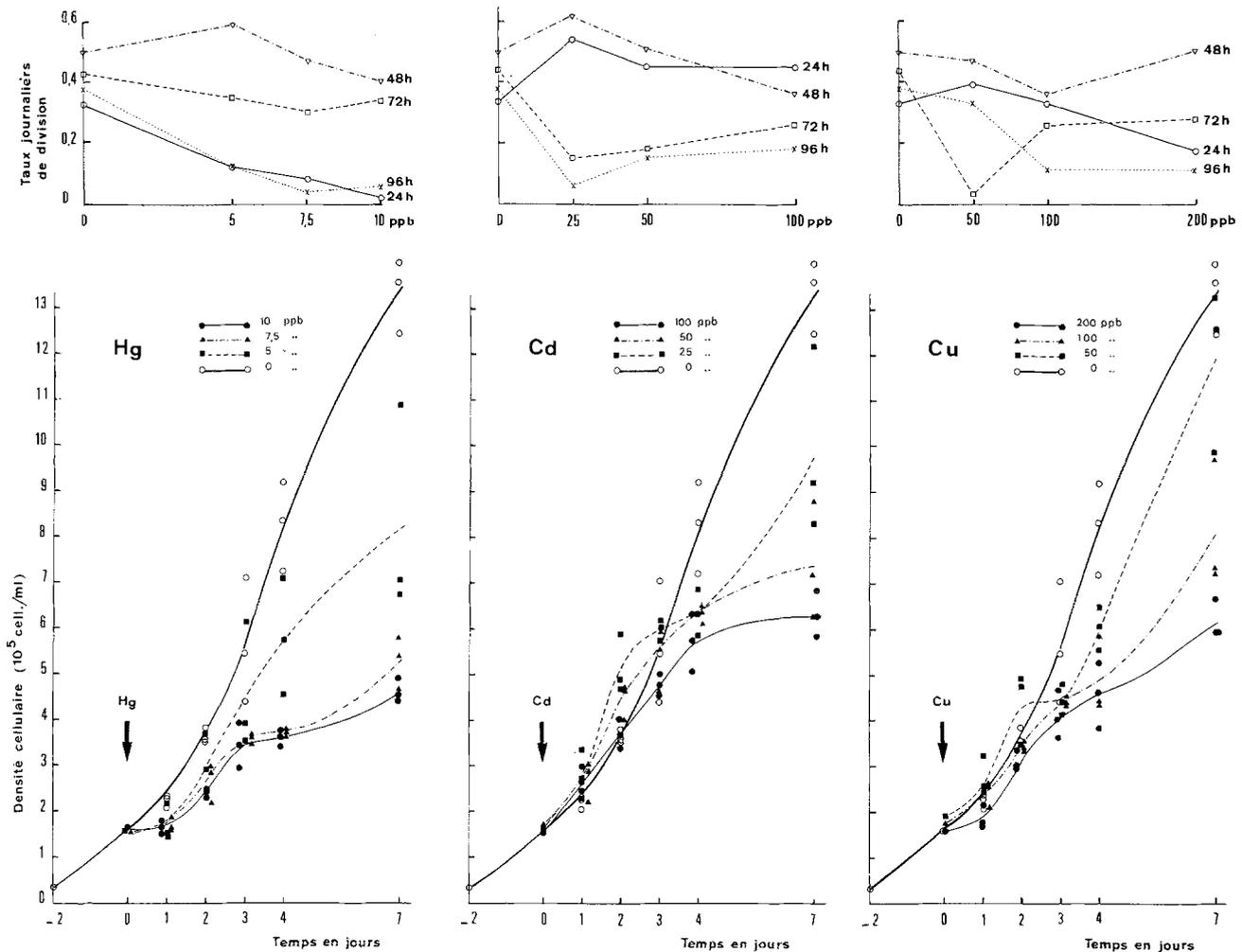


Fig. 1. *Skeletonema costatum*. Evolutions en fonction du temps de la densité cellulaire et du taux journalier de division de l'algue soumise à 3 concentrations sublétales de mercure, de cadmium ou de cuivre. La flèche verticale matérialise le moment de l'introduction du métal dans le milieu de culture

quantités égales, des prélèvements effectués simultanément dans les 3 cultures équivalentes.

## Résultats

### Evolution des numérations cellulaires et vitesses de division

En présence de mercure, à toutes les concentrations, le nombre de cellules de *Skeletonema costatum* par ml est toujours plus faible que dans le contrôle dépourvu de métal toxique, ce qui est accompagné ici d'une diminution de la vitesse de division (Fig. 1); ce ralentissement est particulièrement marqué durant les 24 h qui suivent l'introduction du mer-

cure dans le milieu de culture, le temps de génération étant d'ailleurs d'autant plus long que la quantité de mercure introduit est plus élevée (respectivement 5,97, 10,2 et 28 jours pour les 3 concentrations de mercure utilisées de 5, 7,5 et 10 ppb). Les 2 jours suivants, entre la 24<sup>ème</sup> et la 72<sup>ème</sup> heure qui suivent l'apport du métal, le temps de génération oscille entre 1,5 et 2 jours et est donc très voisin de celui du contrôle (1,4 jour). Après le 3<sup>ème</sup> jour il se produit à nouveau une diminution de la vitesse de division en relation directe avec la concentration de métal.

Ces phénomènes se retrouvent pour la concentration la plus élevée de cuivre, en moins marqué cependant, puisque le temps moyen de génération n'augmente que jusqu'à 4,5 jours pendant les premières

24 h pour atteindre une valeur très brève de 1,34 jour après 48 h. Par contre, pour la plus faible concentration de 50 ppb, la vitesse de division est aussi élevée que dans le témoin. Il est à remarquer, pour cette concentration, la présence d'un arrêt brutal de développement entre la 48ème et la 72ème heure, avec un temps moyen de génération démesurément allongé à 43,2 jours. Ce phénomène se retrouve pour la concentration intermédiaire de cuivre de 100 ppb avec un léger décalage de 24 h et un ralentissement de division moins marqué (temps de génération moyen de 6,9 jours).

Avec le cadmium, à toutes les concentrations, on observe une augmentation de la vitesse de division pendant les premières 24 h qui suivent l'injection du métal dans le milieu de culture, puisque les temps moyens de génération sont de 1,42, 1,52 et 1,29 jours, donc inférieurs à ceux du témoin pour la même période (1,86 jour). Pour les 3 concentrations, on remarque ensuite un ralentissement de la croissance avec un temps moyen de génération de 11,4 jours pour 25 ppb, suivi, en particulier pour cette concentration, d'une reprise de l'activité de division.

On doit signaler cependant que les vitesses de division sont calculées en suivant l'évolution des nombres moyens de cellules, lesquels sont obtenus à partir des densités de cellules de chacun des 3 ballons étudiés en parallèle et que l'on a pu observer entre ces derniers une certaine dispersion des valeurs de densités cellulaires, dispersion d'autant plus importante que les concentrations du métal apportées sont plus faibles.

#### *Evolution des volumes cellulaires*

Dans les témoins, avec la fin de la phase exponentielle de division, on observe un arrêt de l'accroissement des biovolumes par unité de volume de culture (Fig. 2). Il en résulte une diminution marquée du volume moyen de l'unité cellulaire qui, entre le jour 0 et le jour 7, décroît de près de la moitié, de 109 à 57  $\mu\text{m}^3$ ; nous retrouvons donc ici cette diminution de volume moyen cellulaire fréquente dans les cultures d'algues réalisées en milieu fermé, lorsque ces dernières approchent de la phase de plateau, diminution qui a déjà été mentionnée dans des études réalisées avec d'autres espèces d'algues (Berland et al., 1970; Davies, 1976).

L'augmentation des biovolumes en fonction du temps est réduite en présence de

Hg par rapport à ce que l'on observe dans les contrôles; pour les concentrations les plus élevées de Hg (7,5 et 10 ppb), on observe même un arrêt total de cet accroissement à partir du 4ème jour, alors que, pour la concentration la plus faible de 5 ppb, cette augmentation a encore lieu, même si elle est ralentie en fin d'expérimentation. Rapportés à l'unité de cellule, les volumes moyens présentent des évolutions assez proches de celles observées chez les témoins avec cependant une augmentation plus marquée durant les 24 premières heures qui suivent l'apport du Hg. En fin d'expérimentation, les volumes moyens par cellule se présentent selon un ordre croissant, fonction de la concentration du métal, et sont un peu supérieurs à celui du témoin.

Le Cu a une action du même ordre que précédemment pour des concentrations de 50 ppb et 100 ppb: il est à l'origine d'un ralentissement de l'accroissement des biovolumes, encore plus caractéristique à 200 ppb, ralentissement plus marqué que celui observé pour les divisions cellulaires. Il en résulte un volume par unité de cellule de 42  $\mu\text{m}^3$ /cellule, parmi les plus faibles que nous ayons constatés, encore que les valeurs prises isolément doivent être considérées comme moins significatives de la toxicité que l'évolution en fonction du temps de ces valeurs cellulaires comparées à celle des témoins.

L'apport de Cd aux concentrations de 100, 50 et 25 ppb n'entraîne pas une augmentation de volume cellulaire moyen pendant les 24 premières heures comme on peut l'observer chez les témoins et avec les apports de Hg et de Cu. Il en résulte, à ce stade, et pour les 3 concentrations, une différence très marquée avec le volume moyen du contrôle, de l'ordre de 70  $\mu\text{m}^3$  en moyenne contre 109  $\mu\text{m}^3$ ; cette diminution du volume cellulaire est la conséquence à la fois de l'accélération déjà mentionnée des phénomènes de division durant cette période et, conjointement, du ralentissement observé pour l'accroissement du biovolume total. Il y a lieu de remarquer qu'en fin d'expérimentation, le biovolume total est paradoxalement plus élevé pour la plus forte concentration testée, situation inverse de celles que nous avions observées pour les cultures soumises à l'action des deux autres métaux; ce qui se traduit par une augmentation du volume cellulaire moyen qui atteint la plus forte valeur rencontrée le jour 7 soit 99  $\mu\text{m}^3$ .

En définitive, les variations par rapport aux témoins des volumes moyens observés en présence des 3 métaux, même

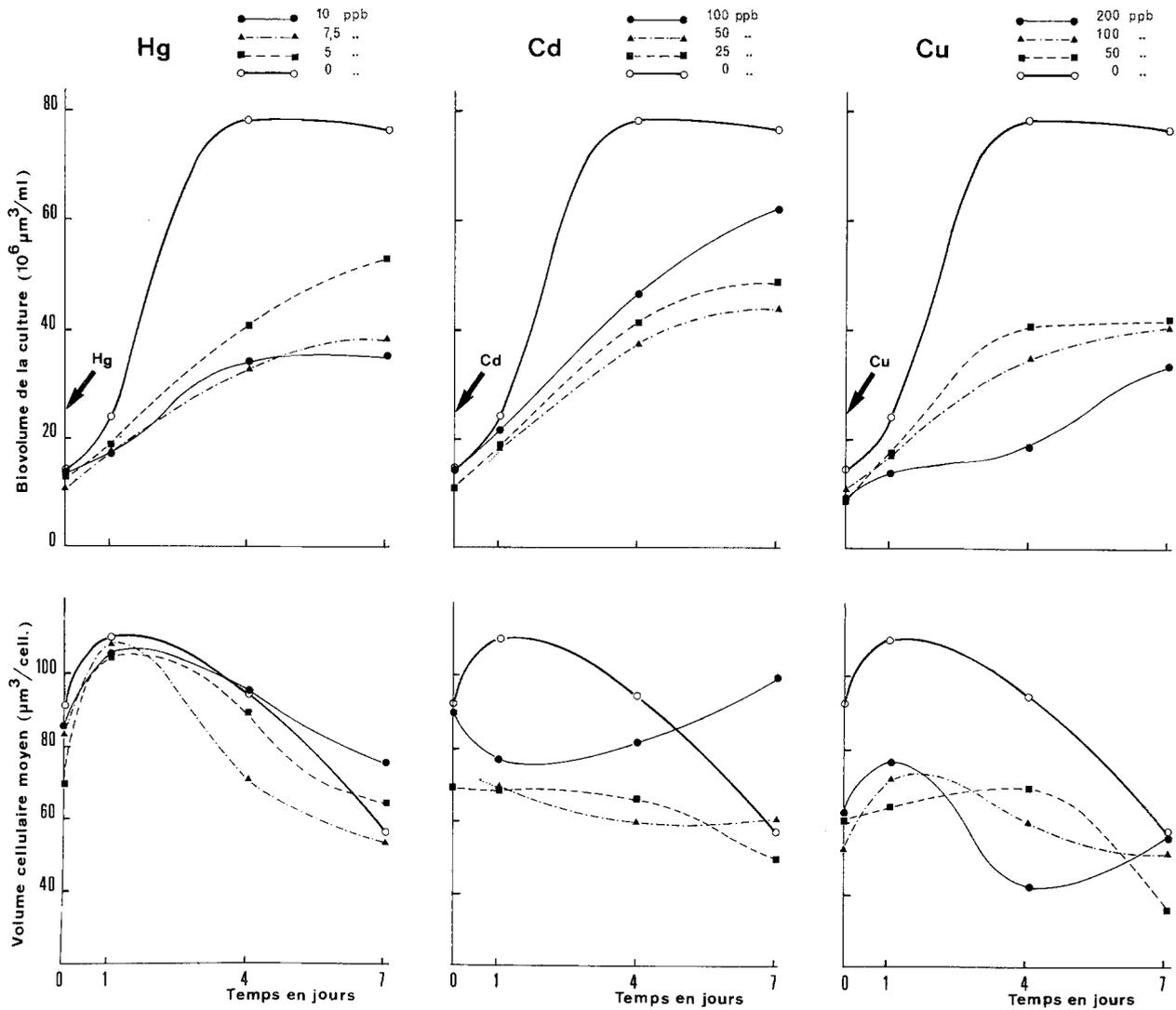


Fig. 2. *Skeletonema costatum*. Evolution des volumes cellulaires (rapportés à l'unité cellulaire et à 1 ml de culture) de l'algue soumise à 3 concentrations sublétales de mercure, de cadmium ou de cuivre

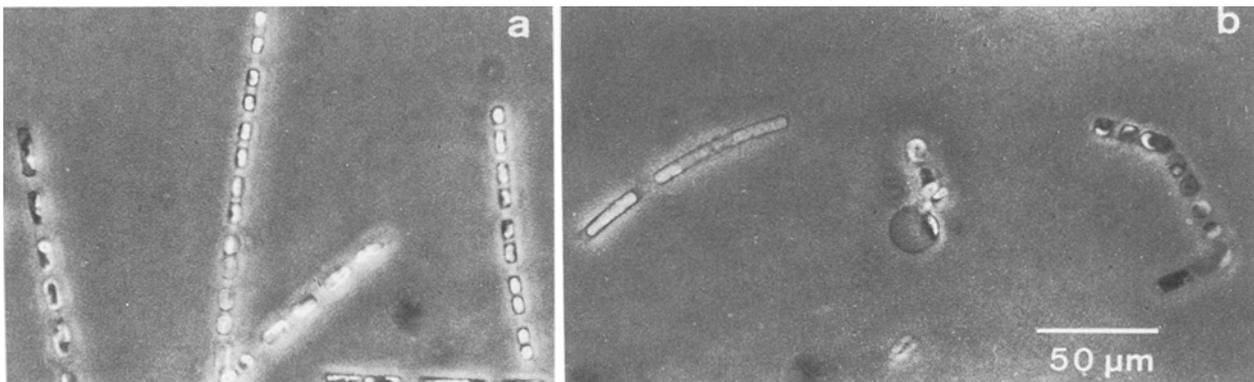


Fig. 3. *Skeletonema costatum*. Exemple de variations de la forme et de la taille des cellules sous l'action de certains métaux lourds. (a) Cellules obtenues en milieu de culture normal; (b) cellules observées dans un milieu contenant du cuivre à une concentration de 200 ppb

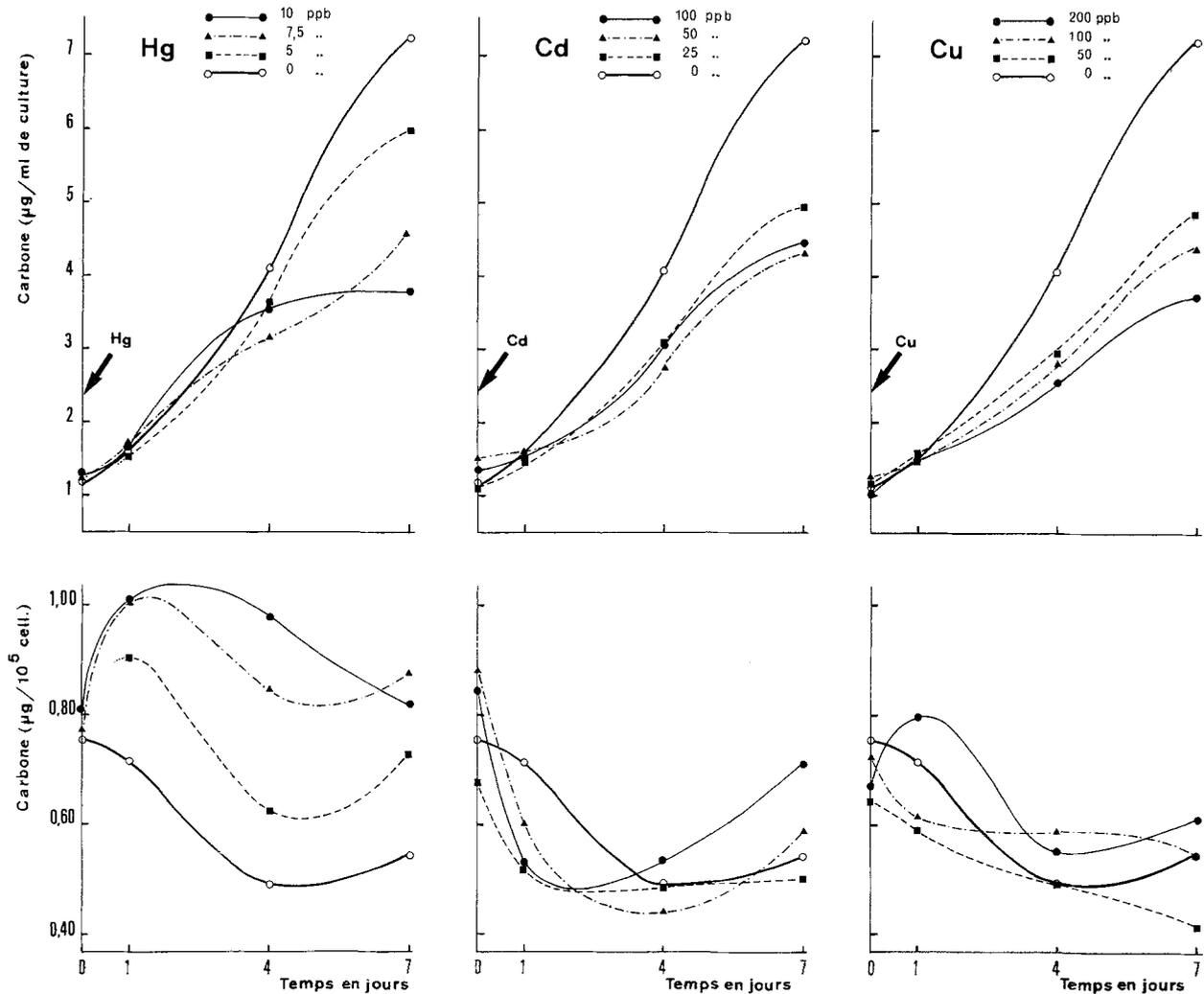


Fig. 4. *Skeletonema costatum*. Evolution des teneurs en carbone cellulaire (rapportées à l'unité cellulaire et à 1 ml de culture) de l'algue soumise à 3 concentrations sublétales de mercure, de cadmium ou de cuivre

si elles sont sensibles, restent toujours inférieures en amplitude, ou au plus égales, à celles observées chez les témoins en fonction du temps. Ainsi, pour le Cd, pour lequel elles sont les plus élevées, ces variations ne dépassent pas un rapport de 1 à 2.

On doit néanmoins préciser la signification des valeurs mentionnées lors de l'appréciation des volumes cellulaires moyens qui représentent, comme tous les paramètres globaux, une intégration statistique des états individuels de chacune des cellules de l'échantillon au moment du prélèvement. En effet, à l'observation directe, il est apparu que les tailles des cellules pouvaient présenter une très grande hétérogénéité en présence de métaux. Cette taille variable, due le plus souvent à un allongement considé-

able de l'axe perlatvaire (Fig. 3) traduit un blocage partiel de la division qui apparaît chez certains composants seulement de la population à un moment donné. Une augmentation relativement faible du volume moyen traduit donc en fait, le plus souvent, une dispersion des volumes autour de la moyenne bien plus grande que celle observée pour la population de contrôle.

#### Evolution du carbone et de l'azote particuliers

Pour tous les prélèvements, les valeurs de carbone rapportées à l'unité de volume de culture présentent un parallélisme marqué avec celles relatives à l'azote (Figs. 4 et 5). L'augmentation de ces

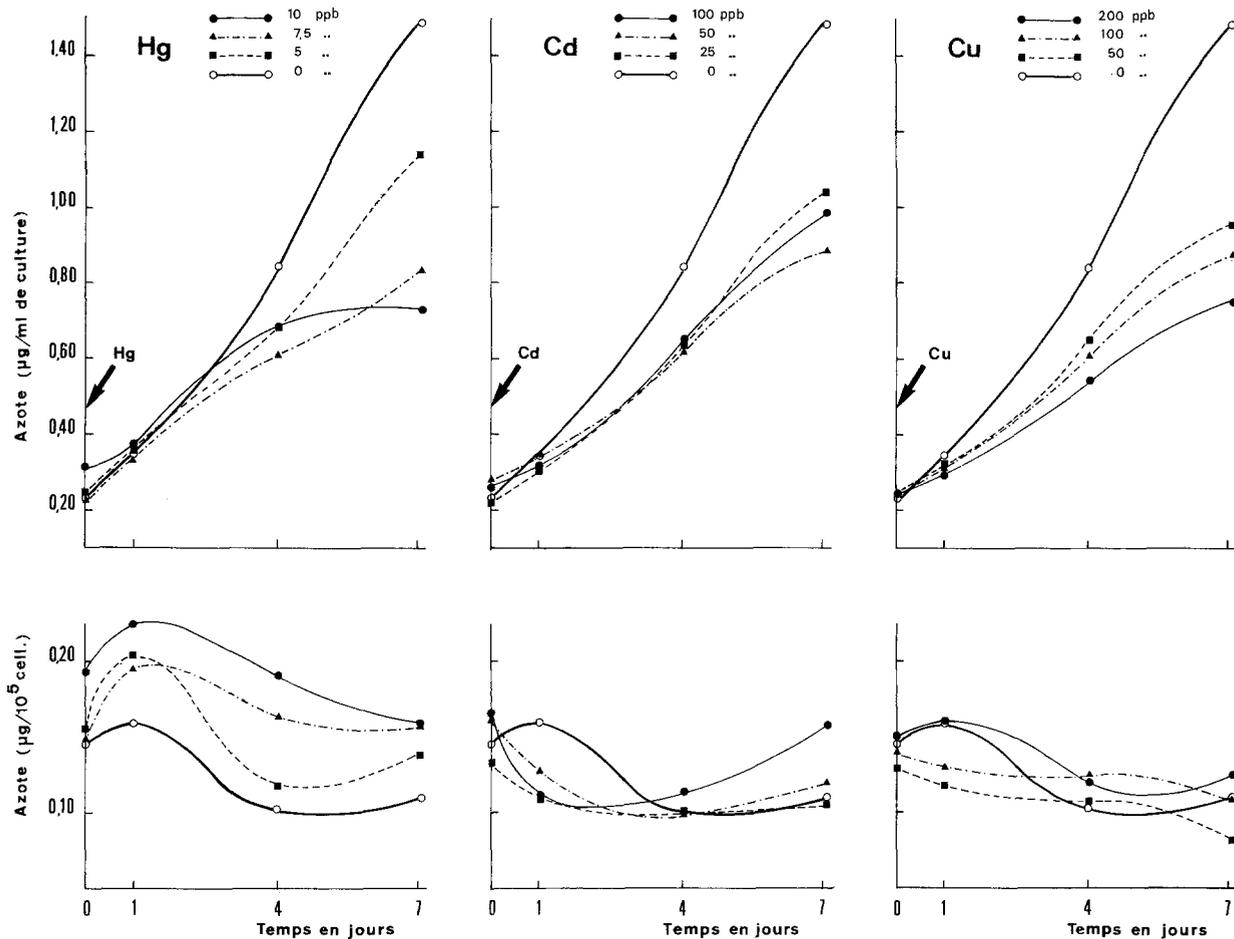


Fig. 5. *Skeletonema costatum*. Evolution des teneurs en azote cellulaire (rapportées à l'unité cellulaire et à 1 ml de culture) de l'algue soumise à 3 concentrations sublétales de mercure, de cadmium ou de cuivre

constituants est moins importante en présence des métaux, et, pour Hg à 10 ppb, ce ralentissement de la croissance va jusqu'à un arrêt complet en fin d'expérimentation.

Par unité cellulaire, on constate, pour les contrôles et pour la plupart des concentrations métalliques, une diminution caractéristique des teneurs en carbone et en azote pendant la première moitié de l'expérimentation, reproduisant ainsi une figure d'observation déjà mentionnée dans la littérature (Berland et al., 1970; Pugh, 1975), et qui traduit un taux de division élevé. Par contre, pour les 3 concentrations de Hg et pour le Cu à 200 ppb, on observe une augmentation très marquée des quantités de constituants cellulaires par cellule, conséquence précisément du ralentissement des divisions observé durant cette période pour ces métaux, non accompagné d'une réduction équivalente des processus métaboliques intervenant dans les synthèses carbonées et azotées.

Le rapport C:N est relativement constant avec des valeurs voisines de 5 (Tableau 3), très proches de celles du contrôle. Tout au plus, doit-on mentionner une élévation de ce rapport jusqu'à des valeurs respectives de 5,21 et 5,51 avec les derniers prélèvements réalisés en présence de Hg aux concentrations de 10 ppb et 7,5 ppb. Inversement, une augmentation plus marquée des teneurs en azote en fin d'expérimentation avec le Cd à 100 ppb se traduit par un abaissement de ce rapport C:N jusqu'à 4,5.

#### Evolution du taux d'assimilation du carbone

La teneur en  $\Sigma \text{CO}_2$  dissous varie toujours dans le sens d'une diminution au cours du développement d'une population algale croissant en milieu fermé; comme il nous était matériellement impossible de réaliser pour tous les prélèvements une analyse du  $\Sigma \text{CO}_2$  dissous par la méthode la plus précise, qui est celle

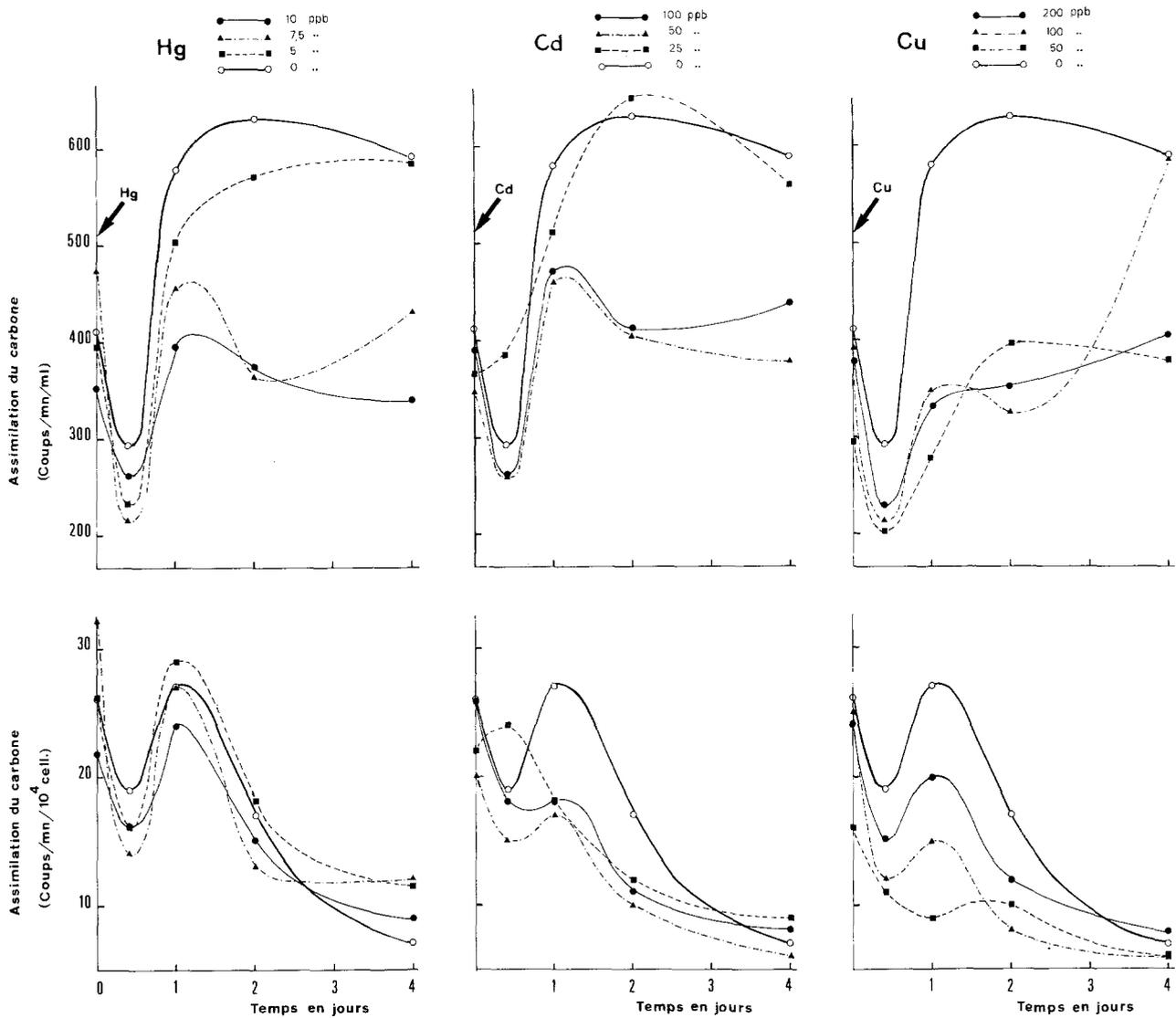


Fig. 6. *Skeletonema costatum*. Evolution de l'assimilation du carbone (rapportée à l'unité cellulaire et à 1 ml de culture) de l'algue soumise à 3 concentrations sublétales de mercure, de cadmium ou de cuivre

Tableau 3. Effet des apports de métaux à différentes concentrations sur l'évolution dans le temps des valeurs du rapport C:N. -: pas de données

Temps (jours)	Témoin	Hg (ppb)			Cd (ppb)			Cu (ppb)		
		10	7,5	5	100	50	25	200	100	50
0	5,16	-	5,18	4,16	5,16	5,41	5,04	4,42	5,21	5,00
1	4,50	4,41	5,16	4,49	4,81	4,68	4,76	4,94	4,72	5,06
4	4,84	5,31	5,18	5,17	4,70	4,45	4,84	4,65	4,66	4,58
7	4,81	5,21	5,51	5,17	4,53	4,91	4,71	4,99	5,02	5,09

de titrimétrie de Van Slyke, nous n'avons pu rapporter pour chaque prélèvement l'activité radioactive mesurée à un taux d'assimilation du carbone; en conséquence, les résultats n'ont pu être présentés que sous la forme d'une activité recueillie par unité de volume de culture ou par unité cellulaire. Nous avons arrêté ces mesures le jour 4, alors que toutes les cultures, tout au moins celles de contrôle, étaient encore en phase exponentielle de division et donc que le CO<sub>2</sub> dissous était manifestement en concentration non limitante.

La présence d'un cycle d'éclairement nyctéméral est à l'origine de variations journalières importantes dans l'activité photosynthétique chez les populations naturelles (Doty et Oguri, 1957) et dans les cultures d'algues unispécifiques. Nous retrouvons, dans la présente expérience et dans les témoins, ce phénomène qui se traduit par une diminution très accusée de l'assimilation du <sup>14</sup>C à la 10ème heure après l'injection du métal, à la fin d'une période d'illumination, et une augmentation relative tout aussi importante de cette incorporation à la 24ème heure, au début de la période d'illumination suivante (Fig. 6). Ensuite, très rapidement, ce taux rapporté à l'unité de cellule, décroît fortement pour atteindre le jour 4 des valeurs 3,5 fois plus faibles que celles mesurées en début d'expérimentation pour des positions équivalentes du rythme nyctéméral (respectivement 26 et 7 coups/min pour 10<sup>4</sup> cellules et par ml). Cette décroissance très rapide de l'incorporation du carbone par cellule, alors que la culture est toujours en phase exponentielle de division, est un phénomène qui a déjà été mis en évidence dans un travail antérieur utilisant un autre matériel (Berland et al., 1970).

Le taux d'assimilation en présence de Hg à toutes les concentrations est assez similaire à celui observé dans les témoins avec cependant une incorporation par unité de volume moins rapide pour tous les états des cultures; l'amoin-drissement de l'incorporation est d'autant plus net que le métal est présent à une concentration plus élevée (Fig. 6). Rapportés à l'unité cellulaire les écarts avec les contrôles sont moins marqués; parfois même les incorporations y sont plus rapides que dans les témoins et nous avons vu qu'il en résulte alors des valeurs de carbone intracellulaires plus importantes.

Avec Cd dans le milieu, pour les concentrations de 100 et 50 ppb, on observe un ralentissement assez marqué de l'incorporation, tout à fait cohérent avec l'évolution des caractères pondéraux.

Par contre, avec la plus faible concentration étudiée de 25 ppb, on constate à la 10ème heure, soit à la fin de la période d'illumination qui suit l'injection du métal, un taux d'incorporation plus important que celui observé en début d'expérimentation, contrairement à ce que l'on observe avec toutes les autres combinaisons métalliques et dans les témoins. La dispersion considérable observée entre les 3 prélèvements parallèles, qui se situe dans un rapport de 1 à 6 semblerait indiquer qu'il s'agit là d'un artéfact, d'autant plus que les taux de carbone intracellulaire sont durant cette époque en nette diminution.

Les figures observées en présence de Cu indiquent, après une diminution de l'activité photosynthétique déjà mentionnée avec les autres échantillons, une reprise par unité de volume sensiblement moins marquée qu'en présence de Hg et de Cd. De plus, cette reprise semble s'effectuer avec un certain déphasage entre les différentes concentrations, rappelant en cela les évolutions discontinues des numérations cellulaires que nous avons observées pour ces mêmes concentrations.

#### Discussion et conclusion

A partir de ces résultats obtenus avec *Skeletonema costatum*, il apparaît d'une manière indiscutable que, parmi les paramètres suivis, et pour les 3 métaux étudiés, c'est l'évolution du nombre de cellules en fonction du temps, et donc la vitesse de division (ou son inverse, c'est-à-dire le taux moyen de génération), qui paraît être dans l'ensemble le premier paramètre perturbé lorsque l'on étudie l'influence des 3 métaux Cd, Cu et Hg aux concentrations sublétales.

Si, pour les concentrations de Hg que nous avons étudiées, cette action se manifeste, comme nous l'avons vu, dans le sens d'une diminution de la vitesse de division, d'autant plus marquée que le métal est présent à une concentration plus élevée, pour Cd, au contraire, il se produit paradoxalement une augmentation très sensible de cette vitesse, amélioration d'ailleurs provisoire que nous retrouvons également en présence de Cu, mais dans ce cas, seulement à la plus faible concentration utilisée, soit 50 ppb. Cette stimulation de l'une des manifestations de la croissance qu'est la division cellulaire a été retrouvée par Rzewuska et Wernikowska-Ukleja (1974) chez la chlorophycée dulçaquicole *Scenedesmus quadricauda* cultivée en présence de Hg, et par Ibragim et Patin (1975) sous la forme d'une accélération de l'assimi-

lation photosynthétique du carbone pour des populations naturelles mises en présence de Cu, Cd et Hg à certaines concentrations. On doit également rapprocher de ces résultats les observations de stimulation mentionnées par Jackim et al. (1970) dans les activités *in vivo* d'enzymes (en particulier de la phosphatase alcaline) mesurées dans le foie d'un poisson soumis à l'influence de Hg et Pb. Si comme le pensent Ibragim et Patin, on peut comprendre assez bien l'amélioration de croissance apportée par le Cu qui intervient comme coenzyme dans plusieurs réactions du métabolisme, au niveau des phénomènes respiratoires en particulier, et dont l'éventail entre les concentrations considérées comme favorisantes et celles à rôle létal est généralement réduit, une telle réponse apparaît comme plus surprenante pour les algues mises en présence de Cd et de Hg, métaux dont on n'a jamais pu mettre en évidence la moindre fonction dans les voies normales de la chimie cellulaire. Ibragim et Patin (1975) avec des populations naturelles, expliquent cette stimulation par des phénomènes d'interrelations algues-bactéries, phénomènes qui ne peuvent être invoqués ici puisque nous avons travaillé en culture abactérienne. Cependant, on peut remarquer que cette amélioration dans tous les cas n'est que transitoire et on doit penser qu'elle traduit déjà un dérèglement du métabolisme et qu'elle est donc révélatrice en soi d'une potentialité d'inhibition. Il est alors tentant de rapprocher ces figures expérimentales de celles de l'"hor-mésis" (Chabbert, 1963), observées sur des croissances de cultures de bactéries, mais aussi d'algues (Berland et Maestri-ni, 1969), soumises à des actions sub-inhibitrices d'antibiotiques.

La diminution de la vitesse de division, qui peut être très marquée immédiatement après l'injection du Hg dans le milieu de culture, rejoint un phénomène trouvé chez les dinoflagellés par Kayser (1976), et appelle un développement. Encore une fois, les prélèvements, parce qu'ils sont globaux, donnent une image statistique moyenne de l'ensemble des cellules constituant chacun des prélèvements. On pourrait donc envisager, comme c'est le cas dans la phase de latence apparente de Fogg (1965), qu'une grande partie des cellules subit au moment de l'introduction du métal des dommages structuraux et un choc métabolique irréversible entraînant une mortalité. Dans ce cas, le ralentissement de croissance observé sur la population globale ne serait, en fait, qu'apparent, puisque les quelques cellules restées viables continuent de se diviser à un rythme

normal. C'est l'hypothèse mentionnée par Gächter et al. (1973) qui tentent ainsi d'expliquer la phase de latence observée chez une chlorelle soumise à l'influence du Cu. Mais on peut aussi considérer, au contraire, que les cellules, dans leur ensemble, n'ont perdu que provisoirement leurs potentialités de division, et qu'après avoir subi de nombreuses perturbations dans leur activité métabolique, elles rentrent en possession de leur structure cellulaire initiale et récupèrent l'intégrité de leur potentiel énergétique. A notre avis cette seconde hypothèse correspond davantage à la réalité car nous avons remarqué chez *Skeletonema costatum*, au cours de ces périodes de ralentissement de division, une poursuite des synthèses, se traduisant par une augmentation sensible des constituants et des volumes moyens cellulaires; ceci a également été mentionné par Davies (1976) chez *Dunaliella tertiolecta*. Cette opinion est confirmée aussi par les travaux de Tingle et al. (1973) qui ont montré que, chez un cilié, des doses sublétales de Hg sont à l'origine d'une désorganisation très poussée de la structure cellulaire, en particulier du chondriome, désorganisation qui n'est cependant que transitoire, car, après un temps de 24 h, les cellules dans leur ensemble, recouvrent un état normal, ce qui révèle donc une adaptation de l'ensemble de la population à l'altérage; cette adaptation, nous l'avons nous-mêmes retrouvée chez *S. costatum*; elle peut être due, entre autres causes, à un processus de détoxification par l'induction d'une protéine susceptible de complexer les ions métalliques comme l'ont démontré Olafson et Thompson (1974) chez des vertébrés marins et MacLean et al. (1972) chez la cyanophycée *Anacystis nidulans*.

Nous avons vu qu'en présence de Cu, les figures représentant les évolutions des densités cellulaires montrent des ralentissements de la vitesse de division qui peuvent être échelonnés dans le temps en fonction de la concentration du métal. Ce phénomène assez particulier apparaît également dans une étude de Steemann Nielsen et Kamp-Nielsen (1970) portant sur l'influence du Cu sur une souche de *Chlorella pyrenoidosa*. On peut tenter d'interpréter ce phénomène de la manière suivante: la pénétration du métal dans la cellule se réalise sans latence et avec une vitesse d'autant plus forte que la concentration extracellulaire du métal est elle-même plus élevée (Mandelli, 1969); il en résulte que les concentrations de Cu intracellulaires atteindront le seuil de toxicité d'autant plus tardivement que le métal sera moins concentré, d'où, dans notre étude, ce

report dans le temps de l'arrêt de division pour les deux concentrations de 50 et 100 ppb. La reprise de la croissance observée après cette période de latence particulière, a été également mentionnée par de nombreux auteurs travaillant, soit *in situ* avec des populations naturelles (Holm-Hansen et al., 1975), soit en culture unispécifique. Elle peut être expliquée, entre autres, par l'accumulation dans le milieu extracellulaire de produits organiques complexants dont la libération précisément serait facilitée chez les diatomées soumises à l'influence du Cu (Stemann Nielsen et Wium-Andersen, 1971) et qui diminueraient la concentration d'ions actifs et donc la toxicité de la solution. *Skeletonema costatum* est une algue connue précisément pour excréter d'assez grandes quantités de matière organique (Eppley et Sloan, 1965; Hellebust, 1965; Ignatiades et Fogg, 1973).

Les paramètres de nature pondérale, biovolume, carbone et azote particuliers, évoluent de façon similaire et indiquent un ralentissement certain des synthèses organiques sous l'effet des métaux; mais ce ralentissement n'est pas aussi marqué (sauf peut-être en présence de Cu) et n'apparaît pas aussi rapidement que les perturbations observées au niveau de la division cellulaire.

En présence des trois métaux, et à toutes les concentrations, le rapport C:N, voisin de 5, reste sensiblement constant et toujours très proche de celui observé dans les contrôles. Il est, de plus, comparable à celui trouvé chez une autre souche de *Skeletonema costatum* et chez d'autres diatomées étudiées en conditions de culture optimale (Berland et al., 1972; Goldman et Stanley, 1974) ou même à ceux calculés à partir d'analyses effectuées sur les populations naturelles par de nombreux auteurs (Fleming, 1940, entre autres). Une augmentation de ce rapport, due à une élévation relative des substances de réserves (essentiellement sucres et lipides) par rapport aux protéines constitutives de la cellule, est souvent significative d'un vieillissement de la population, conséquence de la perte des conditions optimales de croissance. L'origine en est généralement une dystrophie, qui est souvent le résultat direct de l'appauvrissement du milieu en l'un des éléments biogènes principaux, mais qui peut être aussi indirect lorsqu'un facteur chimique considéré comme toxique vient perturber sélectivement la pénétration d'un élément biogène dans la cellule ou son assimilation.

Le fait que le rapport C:N reste en général constant indique que l'action des ions métalliques étudiés intervient

avec une force identique sur les synthèses carbonées et azotées, même lorsqu'elles sont ralenties. Cette observation, bien que faite sur un plan très global, semble aller dans le même sens qu'une opinion déjà mentionnée par Mandelli (1969) selon laquelle les effets inhibiteurs des métaux lourds sur les cellules vivantes ne sont pas spécifiques d'une activité métabolique particulière. Une hypothèse qui est avancée pour expliquer cette absence de spécificité est que les cations fortement électronégatifs, comme le sont les métaux, possèdent une affinité marquée pour certains groupements chimiques (amino, imino et sulfhydryle en particulier) correspondant à des sites recherchés également par de très nombreuses enzymes qui interviennent dans les différents cycles du métabolisme. Il n'en demeure pas moins que des études rationnelles, plus approfondies, devraient être entreprises d'un point de vue enzymologique, afin de rechercher quelles sont les enzymes les premières et les plus fortement perturbées par des doses sublétales de métaux; de telles études font particulièrement défaut en ce qui concerne le phytoplancton marin.

Les variations, par rapport aux témoins, des volumes moyens observés en présence des 3 métaux, sont plus faibles que celles mentionnées par Davies (1974, 1976) chez la chrysophyce *Isochrysis galbana* et surtout chez la chlorophycée *Dunaliella tertiolecta*, ce dernier flagellé étant il est vrai particulièrement résistant au mercure puisqu'une croissance est encore observée au taux très élevé de 10  $\mu$ -at g/l. Par ailleurs, nous n'avons jamais constaté à l'observation directe, même pour les concentrations les plus élevées, d'altérations tératologiques de cellules comme ont pu en observer Nuzzi (1972) chez *Chlorella pyrenoidosa* soumise à l'influence de mercure sous forme organique, et Khabotiev et al. (1975) chez *Scenedesmus quadricauda* en présence de cuivre. Cette non-observation de déformations cellulaires est peut-être due simplement au fait que *Skeletonema costatum* est une diatomée qui se lyse très rapidement lorsque les conditions de milieu deviennent défavorables. Cependant, il faut mentionner que, dans les cultures soumises à l'influence des métaux, et plus particulièrement du cuivre, outre un allongement de l'axe peralvaire, nous avons pu observer une plus grande abondance de chaînes anormalement courbées et une fréquence plus importante de cellules en cours d'auxopopulation.

Malgré des difficultés certaines d'ordre méthodologique et aussi dans

l'interprétation des données, la méthode de l'assimilation du carbone par le  $^{14}\text{C}$  apporte dans notre expérience des résultats assez cohérents, en accord avec l'augmentation de la biomasse de la culture en fonction du temps, exprimée, par exemple, en teneur de carbone par unité de volume de milieu. Mais nous avons vu que, rapportée à la cellule, l'activité photosynthétique n'était pas pour autant systématiquement affaiblie, particulièrement en présence de mercure. Par ailleurs, ce paramètre, même s'il est un bon indicateur du ralentissement de la synthèse pour des populations phytoplanctoniques soumises à l'influence de toxiques, s'avère être dans l'ensemble moins sensible à celle-ci que la vitesse de division, sauf peut-être en présence de cuivre où l'on a observé une activité photosynthétique fortement réduite. L'étude de la vitesse de division cellulaire ne peut malheureusement être étendue aux études *in situ* de populations naturelles, hétérogènes par essence, et, dans ce cas, les mesures de photosynthèse par la méthode du  $^{14}\text{C}$  semblent constituer un moyen rapide et relativement sensible pour détecter l'apparition d'une action toxique.

Mais, si l'on veut comparer les effets délétères de métaux lourds sur la production primaire, il apparaît, au vu de nos résultats, qu'il semble assez illusoire de vouloir apprécier ces actions sur le plan quantitatif en n'utilisant qu'un seul paramètre estimatif de la croissance ou de la biomasse. De plus, par suite de l'évolution rapide de certains de ces facteurs, il importe également d'effectuer une véritable cinétique de croissance des organismes tests, et non pas de se contenter seulement de mesures isolées, réalisées à des temps arbitrairement définis. Enfin, ces études devraient être affinées et s'appuyer non seulement sur des données relatives à la biomasse globale, mais de plus en plus, sur des réponses plus particulières, intéressant certaines réactions enzymatiques et les vitesses de certaines transformations métaboliques.

#### Littérature citée

- Antia, N.J., B.R. Berland, D.J. Bonin and S.Y. Maestrini: Comparative evaluation of certain organic and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 55, 519-539 (1975)
- Berland, B.R., D.J. Bonin, R.A. Dumas, P.L. Laborde et S.Y. Maestrini: Variations du comportement physiologique de l'algue *Monallantus salina* (xanthophycée) en culture. *Mar. Biol.* 7, 82-92 (1970)
- , V.I. Kapkov, S.Y. Maestrini et D.P. Arlhac: Action toxique de quatre métaux lourds sur la croissance d'algues unicellulaires marines. *C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci., Paris (Sér. D)* 282, 633-636 (1976)
- , P.L. Laborde et S.Y. Maestrini: Variations de quelques facteurs estimatifs de la biomasse, et en particulier de l'ATP chez plusieurs algues marines planctoniques. *Mar. Biol.* 13, 338-345 (1972)
- et S.Y. Maestrini: Action de quelques antibiotiques sur le développement de cinq diatomées en culture. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 3, 62-75 (1969)
- Chabbert, Y.A.: L'antibiogramme. Sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques, 257 pp. St Mandé, France: Ed. de la Tourelle 1963
- Davies, A.G.: The growth kinetics of *Isochrysis galbana* in cultures containing sublethal concentrations of mercuric chloride. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 54, 157-169 (1974)
- An assessment of the basis of mercury tolerance in *Dunaliella tertiolecta*. *J. mar. biol. Ass. U.K.* 56, 39-57 (1976)
- Doty, M.S. and M. Oguri: Evidence for a photosynthetic daily periodicity. *Limnol. Oceanogr.* 2, 37-40 (1957)
- Eppley, R.W. and P.R. Sloan: Carbon balance experiments with marine phytoplankton. *J. Fish. Res. Bd Can.* 22, 1083-1097 (1965)
- Fleming, R.H.: Composition of plankton and units for reporting populations and production. *Proc. Pacif. Sci. Congr.* 3, 535-540 (1940)
- Fogg, G.E.: Algal cultures and phytoplankton ecology, 126 pp. Madison, Milwaukee: University of Wisconsin Press 1965
- Gächter, R., K. Lum-Shue-Chan and Y.K. Chau: Complexing capacity of the nutrient medium and its relation to inhibition of algal photosynthesis by copper. *Schweiz. Z. Hydrol.* 35, 252-261 (1973)
- Goldman, J.C. and H.I. Stanley: Relative growth of different species of marine algae in wastewater-seawater mixtures. *Mar. Biol.* 28, 17-25 (1974)
- Hellebust, J.A.: Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 10, 192-206 (1965)
- Holm-Hansen, O., W.H. Thomas, D.L.R. Seibert and M. Takahashi: Effects of copper on natural marine phytoplankton communities. Invited contribution to a U.S./U.S.S.R. periodical on marine environmental quality, 13 pp. (1975). (Copies available from Institute of Marine Resources, University of California, Ref. UCSD 10P20-199)
- Ibragim, A.M. and S.A. Patin: Influence of mercury, lead, cadmium and copper on primary production and phytoplankton in some coastal areas of the Mediterranean and the Red Seas [en russe]. *Okeanologija, Mosk.* 15, 886-890 (1975)
- Ignatiades, L. and G.E. Fogg: Studies on the factors affecting the release of organic matter by *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve

- in culture. J. mar. biol. Ass. U.K. 53, 937-956 (1973)
- Jackim, E., J.M. Hamlin and S. Sonis: Effects of metal poisoning on five liver enzymes in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). J. Fish. Res. Bd Can. 27, 383-390 (1970)
- Kayser, H.: Waste-water assay with continuous algal cultures: the effect of mercuric acetate on the growth of some marine dinoflagellates. Mar. Biol. 36, 61-72 (1976)
- Kerambrun, P. et K.H. Szekiéda: Dosage simultané du carbone, de l'hydrogène et de l'azote dans le matériel en suspension dans l'eau de mer. Note technique. Téthys 1, 581-584 (1969)
- Khobotiev, V.G., V.I. Kapkov, E.G. Rukhadze, N. V. Turunina and N.A. Shidlovskaya: Toxicity of copper-containing compounds for algae [en russe]. Hidrobiol. Zh., Kiev 11, 49-55 (1975)
- Lund, J.W.G., C. Kipling and E.D. Le Cren: The inverted microscope method for estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia 11, 143-170 (1958)
- MacLean, F.I., O.J. Lucis, Z.A. Shaikh and E.R. Jansz: The uptake and subcellular distribution of cadmium and zinc in microorganisms. Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol. 31, p. 699 (1972)
- Mandelli, E.F.: The inhibitory effects of copper on marine phytoplankton. Contr. mar. Sci. Univ. Tex. 14, 47-57 (1969)
- Nuzzi, R.: Toxicity of mercury to phytoplankton. Nature, Lond. 237, 38-39 (1972)
- Olafson, R.W. and J.A.J. Thompson: Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. Mar. Biol. 28, 83-86 (1974)
- Pugh, P.R.: Variations in the biochemical composition of the diatom *Coscinodiscus eccentricus* with culture age and salinity. Mar. Biol. 33, 195-205 (1975)
- Rzewuska, E. and A. Wernikowska-Ukleja: Research on the influence of heavy metals on the development of *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Bréb. Part I. Mercury. Polskie Archiwum Hydrobiol. 21, 109-117 (1974)
- Spencer, C.P.: Studies on the culture of a marine diatom. J. mar. biol. Ass. U.K. 33, 265-290 (1954)
- Stemann Nielsen, E.: The use of radioactive carbon ( $C^{14}$ ) for measuring organic production in the sea. J. Cons. perm. int. Explor. Mer 18, 117-140 (1952)
- and L. Kamp-Nielsen: Influence of deleterious concentrations of copper on the growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Physiologia Pl. 23, 828-840 (1970)
- and S. Wiium-Andersen: The effect of deleterious concentrations of copper on the photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. Physiologia Pl. 22, 1121-1133 (1969)
- and S. Wiium-Andersen: The influence of Cu on photosynthesis and growth in diatoms. Physiologia Pl. 24, 480-484 (1971)
- Tingle, L.E., W.A. Pavlat and I.L. Cameron: Sublethal cytotoxic effects of mercuric chloride on the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 20, 301-304 (1973)

Dr. B.R. Berland  
 Station Marine d'Endoume  
 et Centre d'Océanographie  
 Rue de la Batterie-des-Lions  
 F-13007 Marseille  
 France

Date of final manuscript acceptance: February 11, 1977. Communicated by J.M. Pérès, Marseille