

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

**Interactions entre la matière organique dissoute et les
microalgues marines :
rapprochement, adhésion et réaction**

Mémoire présenté

dans le cadre du programme de maîtrise en Océanographie

en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences

PAR
MATHIEU MILLOUR

Décembre 2011

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Composition du jury :

**Pre Suzanne Roy, présidente du jury, Institut des sciences de la mer de Rimouski,
Université du Québec à Rimouski, Rimouski**

**Pr Jean-Pierre Gagné, directeur de recherche, Institut des sciences de la mer de
Rimouski, Université du Québec à Rimouski, Rimouski**

**Pr Peter G.C. Campbell, examinateur externe, Institut national de la recherche
scientifique Centre Eau Terre Environnement, Québec**

Dépôt initial le 9 septembre 2011

Dépôt final le 19 décembre 2011

REMERCIEMENTS

Avant de commencer à parler d'interactions, de sorption, de substances humiques et de microalgues, je me dois de remercier plusieurs personnes pour leurs nombreuses aides et leurs conseils.

Sans le Pr Jean-Pierre Gagné, je ne me serais jamais intéressé autant à la matière organique et à ses interactions avec les différents composés et organismes présents dans le domaine marin. Je le remercie sincèrement de m'avoir offert l'opportunité de faire ma maîtrise au sein du LAEGO. Je le remercie aussi pour son aide, ses conseils et les nombreuses discussions, qui ont fait évoluer mes centres d'intérêt ainsi que ma compréhension du sujet étudié. Mais aussi pour l'autonomie et les responsabilités qu'il m'a données.

Merci à l'ISMER, à Québec-Océan et au CRSNG pour le soutien financier et logistique.

Aux membres du jury, merci d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire de maîtrise. Au Pre Suzanne Roy, merci de présider ce jury, mais aussi de m'avoir conseillé pour obtenir des souches microalgales. Merci au Pr Peter G.C. Campbell d'avoir accepté d'être examinateur externe, mais aussi pour les discussions tenues lors de différents colloques scientifiques.

Un grand merci à Bernadette Lagacé de NutrOcéan, qui m'a aidé en me fournissant des microalgues. Mais aussi à faire mes propres cultures de microalgues.

À Claude Belzile, merci de m'avoir fait découvrir la cytométrie en flux. Merci aussi pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude.

Je remercie aussi Mélanie Simard, Marie-Ève Anglehart, Nathalie Morin, Pascal Rioux, Richard Saint-Louis et Bruno Cayouette pour leurs conseils et leurs nombreuses aides techniques.

Un grand merci à Kim Doiron, qui a bien voulu me conseiller et relire ce mémoire, malgré son emploi du temps chargé.

Merci aux stagiaires Élodie Cocard, René-Paul Debroize, David Bocéno, Samuel Quéméré, Marc Peyregne, Kévin Raimondeau, Julien Schlotter et Frédéric Rochard de m'avoir beaucoup appris sur l'encadrement et pour leur aide. Un merci plus spécialement à Élodie, David et René-Paul pour leur implication dans ce travail.

Un grand merci pour le soutien financier et psychologique que ma famille m'a apporté malgré la grande distance nous séparant. Merci plus particulièrement à mes parents qui m'ont poussé à continuer mes études et sans qui je ne serais pas là où je suis maintenant.

Pour finir, merci à tous mes amis, qui sont en quelque sorte ma deuxième famille. Je les remercie, pour les nombreux bons moments passés, les débats animés et les conseils. Je ne citerai pas leurs noms dans ce mémoire, car ils se reconnaîtront, et de peur d'en oublier.

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu oublier, qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Trugarez vras

RÉSUMÉ

La matière organique dissoute (MOD) est un assemblage diversifié et complexe de composés. Les substances humiques (SH) sont une composante majeure de cette MOD. Les SH sont des substances présentant des caractéristiques amphiphiles et acides. Ces propriétés permettent aux SH d'interagir avec une vaste gamme de composés et de surfaces. Elles modulent le rôle et le devenir de nombreux composés dans l'environnement. Récemment, des données sur la sorption des SH sur des surfaces vivantes ont été rapportées. Le mécanisme d'interaction moléculaire des SH avec des cellules vivantes est mal compris, en particulier pour le phytoplancton marin pour lequel il y a peu d'études.

Le but de cette recherche est d'étudier et de caractériser la sorption de la MOD sur quelques espèces microalgales en utilisant les SH comme composé modèle représentatif du comportement de la MOD. Des expériences de sorption impliquant des SH et des microalgues (*Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis oculata*) ont été réalisées dans des conditions proches de celles trouvées en milieux estuariens et marins. Les données de sorption obtenues montrent une sorption rapide des SH par le phytoplancton. Nos données montrent que la sorption varie avec le pH, la force ionique, la concentration et l'origine des SH et l'espèce microalgale. Les microalgues peuvent sorber jusqu'à 24 mg SH·m⁻² dans les conditions étudiées. Les constantes de sorption (K_d) entre les substances humiques et les microalgues sont comprises entre 0.4 et 20 (mg·m⁻²/mg·L⁻¹). Les interactions physiques, électrostatiques et chimiques régissant la sorption sont complexes et influencées par les conditions physico-chimiques du milieu ce qui module l'intensité de la sorption entre les SH et les microalgues. Afin de mieux comprendre les interactions aboutissant à la sorption, les microalgues et les SH ont été caractérisées chimiquement.

Mots clés : Acides fulviques (AF), acides humiques (AH), microalgues, *Isochrysis galbana* (Iso), matière organique dissoute (MOD), *Nannochloropsis oculata* (Nanno), sorption, substances humiques (SH).

ABSTRACT

Dissolved organic matter (DOM) is an assemblage of diverse and complex compounds. Humic substances (HS) are a major component of this DOM. HS are substances with amphiphilic and acidic characteristics. These properties allow HS to interact with a wide range of compounds and surfaces. They modulate the role and the fate of many compounds in the environment. Recently, data on the sorption of HS on living surfaces have been reported. The molecular mechanism of interaction of HS with living cells is poorly understood, particularly for marine phytoplankton, for which there are no studies.

The purpose of this research is to study and characterize the sorption of DOM on two microalgae species, using HS as a representative model for the behavior of DOM. Sorption experiments involving HS and microalgae (*Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata*) were conducted under estuarine and marine environmental conditions. The sorption data obtained showed a rapid sorption of HS by phytoplankton. Our data show that sorption varies with the pH, the ionic strength, the concentration, the nature and the origin of HS and with microalgal species. Microalgae can sorb as much as 24 mg HS m⁻², under the conditions studied. The sorption constant (K_d) between humic substances and microalgae are between 0.4 and 20 (mg m⁻²/mg L⁻¹). The physical, electrostatic and chemical interactions governing the sorption are complex and are influenced by the physicochemical conditions of the medium which modulate sorption intensity between HS and microalgae. Microalgae and HS were chemically characterized to better understand the interactions leading to the sorption.

Keywords : Dissolved organic matter (DOM), fulvic acids (FA), humic acids (HA), humic substances (HS), microalgae, *Isochrysis galbana* (Iso), *Nannochloropsis oculata* (Nanno), sorption.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ	VII
ABSTRACT	IX
TABLE DES MATIÈRES.....	XI
LISTE DES TABLEAUX.....	XV
LISTE DES FIGURES	XVII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIX
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Les microalgues.....	1
1.1.1 <i>Isochrysis galbana</i>	2
1.1.2 <i>Nannochloropsis oculata</i>	2
1.1.3 Les surfaces microalgales.....	3
1.2 Les substances humiques	5
1.2.1 Caractéristiques chimiques des substances humiques	6
1.2.2 Comportement des substances humiques selon le pH et la salinité	8
1.2.3 La sorption.....	9
1.2.4 Effets sur le vivant.....	11
1.3 Objectifs de cette étude.....	18
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	19
2.1 Les microalgues	19
2.1.1 Les souches microalgales	19
2.1.2 La culture.....	19
2.2 Les substances humiques	20
2.2.1 Échantillonnage	20
2.2.2 Extraction des substances humiques	21
2.3 Caractérisation	22
2.3.1 Taille des microalgues.....	22
2.3.2 Composition élémentaire des substances humiques.....	22
2.3.3 Poids moléculaire des substances humiques	22
2.3.4 Caractérisations chimiques.....	23

2.3.4.1 Matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des substances humiques	23
2.3.4.2 Analyse du carbone organique dissous.....	23
2.3.4.3 Mesure de l'absorbance uv-visible	24
2.3.4.4 Groupements fonctionnels des microalgues et des substances humiques	25
2.4 Sorption.....	26
2.4.1 Expériences préliminaires	26
2.4.2 Expériences de sorption.....	27
2.4.3 Quantification de la sorption	29
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	33
3.1 Cinétique de sorption.....	33
3.2 Effets des microalgues	35
3.2.1 Taille des microalgues.....	35
3.2.2 Caractérisation chimique des microalgues par spectroscopie infrarouge	35
3.2.3 Quantités sorbées.....	39
3.3 Effets de la nature des substances humiques	39
3.3.1 Poids moléculaire	40
3.3.2 Fluorescence 3d des substances humiques.....	40
3.3.3 Absorbance.....	41
3.3.4 Caractérisation des substances humiques par spectroscopie infrarouge	42
3.4 Effets du pH.....	46
3.4.1 Quantités sorbées.....	46
3.4.2 Constante de distribution.....	47
3.5 Effets de la salinité.....	48
3.5.1 Quantités sorbées.....	49
3.5.2 Constante de distribution.....	50
3.6 Effets de la concentration	51
3.6.1 Quantités sorbées.....	51
3.6.2 Constantes de distribution	52
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	55
4.1 Cinétiques de sorption.....	55
4.2 Effets des microalgues.....	56
4.3 Effets de la nature des substances humiques.....	60

4.4 Effets du pH.....	66
4.5 Effets de la salinité	70
4.6 Effets de la concentration.....	71
CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE.....	73
ANNEXE I FABRICATION DU MILIEU DE CULTURE f/2-GUILLARD.....	78
ANNEXE II ENSEMENCEMENT DES MICROALGUES.....	80
ANNEXE III VAISSELLE	82
ANNEXE IV PROTOCOLE POUR LA MESURE DE $\delta^{13}\text{C}$ ET $\delta^{15}\text{N}$.....	83
ANNEXE V PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LE DÉNOMBREMENT CELLULAIRE	85
ANNEXE VI SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR <i>ISOCHRYISIS</i> <i>GALBANA</i> (a) ET <i>NANNOCHLOROPSIS OCULATA</i> (b) À 25 PSU, pH 8 ET À 2.5 mg·L⁻¹	86
ANNEXE VII SORPTION DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES HUMIQUES AFO SUR <i>ISOCHRYISIS GALBANA</i> À pH 6 ET 25 PSU (a), AHA SUR <i>NANNOCHLOROPSIS OCULATA</i> À pH 6 ET 25 PSU (b) ET AHM SUR <i>NANNOCHLOROPSIS OCULATA</i> À pH 8 ET 25 PSU (c).....	87
ANNEXE VIII CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR <i>ISOCHRYISIS GALBANA</i> À 25 PSU ET À DIFFÉRENTS pH AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)	88
ANNEXE IX CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR <i>NANNOCHLOROPSIS OCULATA</i> À 25 PSU ET À DIFFÉRENTS pH AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)	89
ANNEXE X CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR <i>ISOCHRYISIS GALBANA</i> À pH 8 ET À DIFFÉRENTES SALINITÉS AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)	90
ANNEXE XI CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR <i>NANNOCHLOROPSIS OCULATA</i> À pH 8 ET À DIFFÉRENTES SALINITÉS AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)	91
BIBLIOGRAPHIE.....	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Effets des substances humiques sur des microalgues d'eau douce.....	14
Tableau 2 : Effets des substances humiques sur des microalgues marines	17
Tableau 3 : Conditions des mesures en fluorescence 3D.....	23
Tableau 4 : Conditions des mesures en spectrométrie UV-Visible	24
Tableau 5 : Conditions pour les mesures en spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier.....	26
Tableau 6 : Artefacts et solutions.....	27
Tableau 7 : Diamètre et surface d' <i>Isochrysis galbana</i> et de <i>Nannochloropsis oculata</i> et rapport (Iso/Nanno) entre ces surfaces	35
Tableau 8 : Attribution des bandes des spectres infrarouges d' <i>Isochrysis galbana</i> et <i>Nannochloropsis oculata</i> à des fonctions chimiques, des composés et leurs localisations dans la cellule (modifié de : Dean <i>et al.</i> , 2008; Giordano <i>et al.</i> , 2001; Quilès <i>et al.</i> , 2010).....	38
Tableau 9 : Quantité sorbée (mg m^{-2}) à 25 PSU, à pH 8 et à 2.5mg L^{-1} pour les AF, AHA et AHM, mais à 1.25 mg L^{-1} pour AHO et rapport Iso/Nanno des quantités sorbées	39
Tableau 10 : Fluorophores caractéristiques des substances humiques	41
Tableau 11 : Caractérisation des substances humiques par spectrophotométrie UV-Visible	42
Tableau 12 : Attribution des bandes des spectres infrarouges des substances humiques, à des fonctions chimiques, des composés (Madari <i>et al.</i> , 2006; Senesi <i>et al.</i> , 2003; Tatzber <i>et al.</i> , 2007; Vergnoux <i>et al.</i> , 2011).....	45
Tableau 13 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par <i>Isochrysis galbana</i> à différents pH et à 25 PSU.....	46
Tableau 14 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par <i>Nannochloropsis oculata</i> à différents pH et à 25 PSU	47

Tableau 15 : Valeurs de K_d ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) des substances humiques, à 25 PSU, pour <i>Isochrysis galbana</i> et <i>Nannochloropsis oculata</i> , selon le pH.....	48
Tableau 16 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par <i>Isochrysis galbana</i> à différentes salinités et à pH 8.....	49
Tableau 17 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par <i>Nannochloropsis oculata</i> à différentes salinités et à pH 8.....	50
Tableau 18 : Valeurs de K_d ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) de chaque SH, à pH 8, pour <i>Isochrysis galbana</i> et <i>Nannochloropsis oculata</i> , selon la salinité	51
Tableau 19 : Quantités de substances humiques (mg m^{-2}) sorbées par les microalgues <i>Isochrysis galbana</i> et <i>Nannochloropsis oculata</i> selon la concentration initiale en SH dans le milieu, à 25 PSU et à différents pH.....	52
Tableau 20 : Valeurs de K_d ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) moyen pour les deux microalgues selon la concentration et à différents pH, pour une salinité de 25 PSU	53
Tableau 21 : Composition du milieu f/2-Guillard.....	79

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Microalgues <i>Isochrysis galbana</i> (a) et <i>Nannochloropsis oculata</i> (b) (630X) (photo personnelle)	1
Figure 2 : Modèle de la structure d'une surface microalgale (Gualtieri, com. pers.).....	4
Figure 3 : Caractéristiques des substances humiques (adapté de Stevenson, 1994).....	7
Figure 4 : Modèles des acides humiques (Stevenson, 1994) et des acides fulviques (Buffle, 1977).....	8
Figure 5 : Modèle conceptuel des interactions métaux-organismes montrant le rôle possible de la matière organique dissoute adsorbée (Campbell <i>et al.</i> , 1997)	13
Figure 6 : Mécanismes d'ad/absorption entre la matière organique naturelle et des biomembranes à faibles pH suggérée par Elayan <i>et al.</i> (2008).....	15
Figure 7 : Localisation des stations d'échantillonnage.....	21
Figure 8 : Schéma simplifié des manipulations	29
Figure 9 : Sorption des acides humiques Manicouagan (AHM) par <i>Isochrysis galbana</i> (Iso) et <i>Nannochloropsis oculata</i> (Nanno) à 25 PSU, à pH 8 et à 2.5 mg L ⁻¹	34
Figure 10 : Spectres infrarouges par réflectance totale atténuée d' <i>Isochrysis galbana</i> et de <i>Nannochloropsis oculata</i>	37
Figure 11 : Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) caractéristique des substances humiques, présentant les fluorophores F1 et F2	40
Figure 12 : Spectres infrarouges par réflectance totale atténuée des acides fulviques (a) et des acides humiques (b)	44

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AF :	Acides fulviques
AFM :	Acides fulviques de la rivière Manicouagan
AFO :	Acides fulviques de la rivière Aux-Outardes
AH :	Acides humiques
AHA :	Acides humiques Aldrich
AHM :	Acides humiques de la rivière Manicouagan
AHO :	Acides humiques de la rivière Aux-Outardes
ATR :	Réflexion totale atténuée
CCMP :	Center for Culture of Marine Phytoplankton
Da :	Dalton
dCr :	Dénombrement cellulaire
DOC :	Carbone organique dissous
FTIR :	Spectrométrie infrarouge à transformées de Fourier
HU :	Humine
Iso :	<i>Isochrysis galbana</i>
Kd :	Constante de distribution
MEEF :	Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence
MO :	Matière organique
MOD :	Matière organique dissoute
Nanno :	<i>Nannochloropsis oculata</i>
QS :	Quantité sorbée
SH :	Substances humiques
SUVA :	Specific UV Absorbance
UV-Vis :	UV-Visible

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

« L'eau de mer est le résultat du lavage de toute la surface du globe; ce font en quelque façon les rinçures du grand laboratoire de la Nature, on doit donc s'attendre à trouver réunis dans cette eau, tous les sels qui peuvent se rencontrer dans le règne minéral » (Lavoisier, 1772 dans Aminot et Chaussepied, 1983). Durant le lessivage des sols, l'eau de pluie récupère de nombreux composés et éléments présents dans les sols. Les substances humiques, constituants importants de la matière organique dissoute, sont exportées vers les rivières et les estuaires, pour ultimement être transportées jusque dans les océans. Tous les contaminants et nutriments ainsi que tous les organismes sont en contact avec les substances humiques. Les substances humiques sont connues et réputées pour interagir avec de nombreux composés chimiques. Nous pouvons nous interroger sur l'établissement d'interactions possibles entre les substances humiques et les organismes vivants. Cette question est le sujet de ce mémoire.

1.1 Les microalgues

Afin de réaliser cette étude s'intéressant aux interactions entre les microalgues et les substances humiques, deux microalgues ont été utilisées. Les espèces utilisées sont les microalgues *Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis oculata* (figure 1).

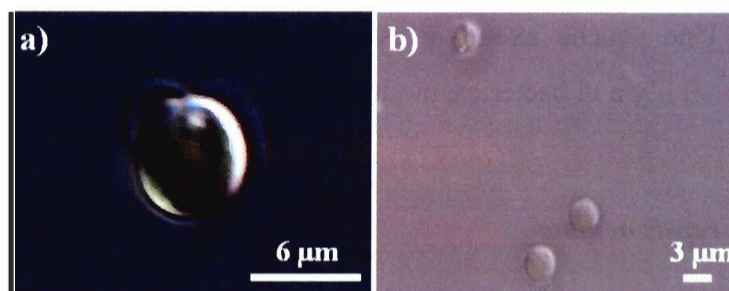


Figure 1 : Microalgues *Isochrysis galbana* (a) et *Nannochloropsis oculata* (b) (630X) (photo personnelle)

1.1.1 *Isochrysis galbana*

Isochrysis galbana, désignée « Iso » dans ce mémoire, est une microalgue jaune-brun, appartenant à l'embranchement des *Prymnésiophyta* (Guiry, 2011a; Lee, 2008a), aussi connu sous le nom d'*Haptophyta* (Guiry, 2011a). Iso appartient à la classe des *Prymnesiophyceae*, à l'ordre des *Isochrysidales*, à la famille des *Isochrysidaceae* et au genre *Isochrysis* (Guiry, 2011a).

Les *Prymnesiophyceae* forment une partie importante du nanophytoplancton (Lee, 2008a). Dans les latitudes moyennes de l'Atlantique Sud, cette classe peut constituer jusqu'à 45 % du phytoplancton (Lee, 2008a). La figure 1a est une observation microscopique, grossie 630 fois, d'une cellule d'Iso. Cette microalgue possède deux flagelles lui permettant une nage rapide (Hibberd, 1976). La cellule, de forme sphéroïde prolate, mesure environ 6 µm (Anonyme, 2011; Hillebrand *et al.*, 1999).

L'optimum de salinité pour la croissance est compris entre 15 PSU et 35 PSU (Abu-Rezq *et al.*, 1999; Kaplan *et al.*, 1986; Renaud et Parry, 1994). Une gamme de pH compris entre 5 et 9 n'a pas d'effets significatifs sur la croissance (Kaplan *et al.*, 1986). Iso s'accommode d'une forte gamme de pH et de salinité, ce qui permet de réaliser de nombreuses expériences à différents pH et salinités. Iso est très utilisé en aquaculture, car elle possède une grande quantité d'acides gras (Lin *et al.*, 2007; Mourente *et al.*, 1990; Renaud et Parry, 1994). Cette microalgue a été choisie pour réaliser les expériences de sorption, car elle est non toxique, ce qui permet de mettre facilement au point le protocole d'étude. De plus, sa culture facile et son fort taux de croissance permettent d'obtenir facilement et rapidement une souche axénique. Une souche axénique est une souche monoclonale ne contenant que l'organisme étudié : il n'y a ni bactéries, ni virus, ni autres organismes.

1.1.2 *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis oculata, nommée « Nanno » dans cette recherche, est une microalgue appartenant à l'embranchement des *Heterokontophyta* (Guiry, 2011b; Lee, 2008b). Nanno fait partie de la classe des *Eustigmatophyceae*, de l'ordre des *Eustigmatales*, de la famille des *Monodopsidaceae* et du genre *Nannochloropsis* (Guiry, 2011b).

Les microalgues appartenant aux *Eustigmatophyceae* sont dites coccoïdales (Barsanti et Gualtieri, 2006). Des cellules algales coccoïdes sont des microalgues dont les cellules sont non mobiles. La figure 1b est une observation microscopique de Nanno à un grossissement de 630X. Les cellules de Nanno, de forme sphérique, mesurent environ 3 μm de diamètre.

L'optimum de salinité pour la croissance de Nanno est compris entre 20 PSU et 40 PSU (Abu-Rezq *et al.*, 1999; Renaud et Parry, 1994). Nanno s'acclimate rapidement et facilement à de fortes variations de salinités, ce qui permet de réaliser aisément des expériences à différentes salinités. De plus, cette microalgue est non toxique, ce qui permet de mettre facilement au point le protocole d'étude de la sorption. Son taux de croissance rapide et sa culture facile permettent d'obtenir facilement et rapidement une souche axénique. La grande quantité d'acides gras présents dans les cellules fait que cette microalgue est régulièrement utilisée en aquaculture (Abu-Rezq *et al.*, 1999; Mourente *et al.*, 1990; Renaud et Parry, 1994).

1.1.3 Les surfaces microalgales

Bien que les cellules soient décrites macroscopiquement par une forme régulière, comme l'indiquent les calculs des surfaces microalgales proposés par Hillebrand *et al.* (1999), la topographie de la surface cellulaire peut présenter de nombreuses irrégularités causées par la complexité des structures (flagelle...) et par les substances chimiques se situant sur la surface cellulaire, comme le montre le modèle présenté dans la figure 2. La figure 2 présente des différences dans la distribution des phospholipides, glycolipides et glycoprotéines dans les membranes cellulaires algales (Barsanti et Gualtieri, 2006). Ces irrégularités, très rarement étudiées dans une perspective environnementale, pourraient conditionner les interactions permettant le rapprochement, l'adhésion et la réaction des substances dissoutes avec les cellules microalgales.

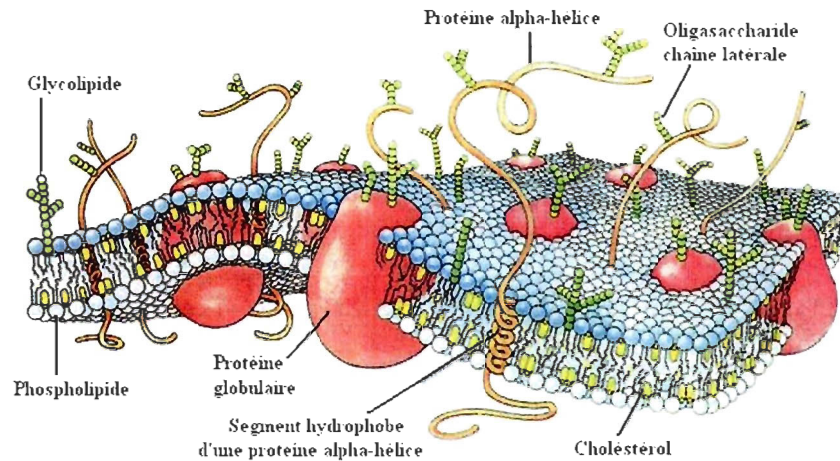


Figure 2 : Modèle de la structure d'une surface microalgale (Gualtieri, com. pers.)

Les microalgues peuvent être considérées comme des particules solides en suspension dans un milieu liquide. De ce milieu, elles puisent les éléments essentiels à leur développement. Toutefois, comme tout solide, ces surfaces microalgales peuvent interagir avec des composés dissous (Sánchez-Marín *et al.*, 2010) par un processus nommé sorption. Ce processus est complexe, il dépend de la nature des composés en interaction avec les surfaces cellulaires, mais aussi de la nature même de la surface cellulaire.

Au sein des microalgues, plusieurs types de surface cellulaire existent (Barsanti et Gualtieri, 2006). Certaines microalgues ont directement leur membrane plasmique en contact avec le milieu (Barsanti et Gualtieri, 2006). Cette surface est riche en lipides, en protéines et en carbohydrates (Alberts *et al.*, 2010; Karp et Bouharmont, 2010). D'autres espèces microalgales possèdent des parois cellulaires formées par du matériel extracellulaire comme les diatomées et les coccolithophoridés (Barsanti et Gualtieri, 2006). D'autres parois cellulaires sont formées par des vésicules contenant du matériel intracellulaire comme les plaques celluloses des dinoflagellés (Barsanti et Gualtieri, 2006). Les *Cryptophyta* et les *Euglenophyta* possèdent des parois cellulaires contenant du matériel intracellulaire et extracellulaire (Barsanti et Gualtieri, 2006). Iso est une microalgue qui aurait sa membrane cellulaire directement en contact avec le milieu (Zhu et Lee, 1997). Nanno est une microalgue recouverte d'une paroi cellulaire constituée de composés résistants nommés algaenans (Gelin *et al.*, 1996; 1997, 1999).

Selon la microalgue, la surface cellulaire diffère pouvant être composée soit de matériaux inorganiques, soit organiques. Cette variation peut influencer les interactions entre les microalgues et leurs milieux.

1.2 Les substances humiques

Chaque année, environ $2.5 \cdot 10^{14}$ g de carbone organique dissous (DOC) sont exportés des continents, par les rivières, dans la zone côtière (Cauwet, 2002; Emerson et Hedges, 2008). Dans les océans, le DOC représente, après le carbone inorganique dissous (DIC), le second plus grand réservoir de carbone, avec $7 \cdot 10^{17}$ g de carbone, alors que le DIC représente $3.8 \cdot 10^{19}$ g de carbone (Emerson et Hedges, 2008; Hansell, 2002).

Dans les domaines aquatiques, 50 à 80 % du DOC est non identifié au niveau moléculaire (Wakeham *et al.*, 1997; Eglinton et Repeta, 2003; Perdue et Ritchie, 2003). Toutefois, la présence de certains groupements fonctionnels permet de définir des classes de composés (Tremblay et Gagné, 2009). L'extraction sur des résines de type XAD/DAX ou d'autres résines de type échangeuses d'ions permet d'extraire quelques-unes de ces familles de composés (Aiken *et al.*, 1979; Thurman *et al.*, 1978).

À un pH inférieur à 2, la résine DAX-8 permet de séparer le DOC en trois fractions : 1) une fraction hydrophile ne sorbant pas sur cette résine (Malcolm et MacCarthy, 1992; Martin-Mousset *et al.*, 1997; Thurman *et al.*, 1978), 2) une fraction appelée substances humiques (SH) sorbant sur la résine à pH acide et désorbant à pH basique (Malcolm et MacCarthy, 1992; Thurman *et al.*, 1978), et 3) une fraction hydrophobe correspondant à une fraction retenue par la résine, mais récupérée par extraction par du méthanol ou de l'acétonitrile, après extraction des SH (Malcolm et MacCarthy, 1992).

Les SH sont une des principales composantes du DOC (Tremblay et Gagné, 2009). Les SH représentent 50 à 80 % du DOC des eaux douces, 15 à 50 % du DOC des estuaires et 10 à 30 % du DOC des eaux marines (Thurman, 1985; Tremblay et Gagné, 2009). Ces substances proviennent de la diagenèse primaire de la matière organique détritique. Durant cette diagenèse, plusieurs types de composés, tels que des lipides, des lignines, des polysaccharides, des protéines, *etc.* sont fractionnés et/ou condensés par de nombreux processus chimiques et biochimiques (MacCarthy, 2001). Ces processus plus

ou moins complexes conduisent à une humification de la matière organique (Gjessing, 1976; Stevenson, 1994).

1.2.1 Caractéristiques chimiques des substances humiques

Les SH sont des composés de couleurs allant du jaune au noir (MacCarthy, 2001). La figure 3 rassemble un ensemble de données sur les différents types de SH. Ces substances sont composées en majorité de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote (Gjessing, 1976; Stevenson, 1994; Thurman et Malcolm, 1981). Elles sont divisées en trois catégories, selon leurs propriétés de solubilité : 1) les humines (HU) insolubles à tous les pH, 2) les acides humiques (AH) insolubles à $\text{pH} < 2$, et 3) les acides fulviques (AF) solubles à tous pH (MacCarthy, 2001; Thurman et Malcolm, 1981).

Dans les environnements aquatiques, les HU et une partie des AH forment majoritairement la fraction particulaire de la matière organique. Les AF et une autre partie des AH composent principalement le DOC des eaux douces. La proportion de carbone tend à augmenter entre les AF et les HU, alors que la quantité d'oxygène a un comportement inverse. Le poids moléculaire des AF est généralement aux environs de 2000 Da. Le poids moléculaire des AH varie selon l'environnement. Il est aux environs de 2000 Da dans les milieux aquatiques alors que pour les AH extraient des sols, il peut atteindre 1.10^6 Da (MacCarthy, 2001). Pour les HU, le poids moléculaire fluctue moins que celui des AH. Les SH sont des composés complexes ayant des structures chimiques mal connues. Les théories récentes suggèrent que les SH sont des agrégats moléculaires formés par des associations de molécules organiques de faibles poids moléculaires (Conte et Piccolo, 1999; Senesi, 1999; Sutton et Sposito, 2005). Les agrégats évoluent selon le milieu et les conditions physico-chimiques du milieu (Conte et Piccolo, 1999; Baalousha *et al.*, 2006).

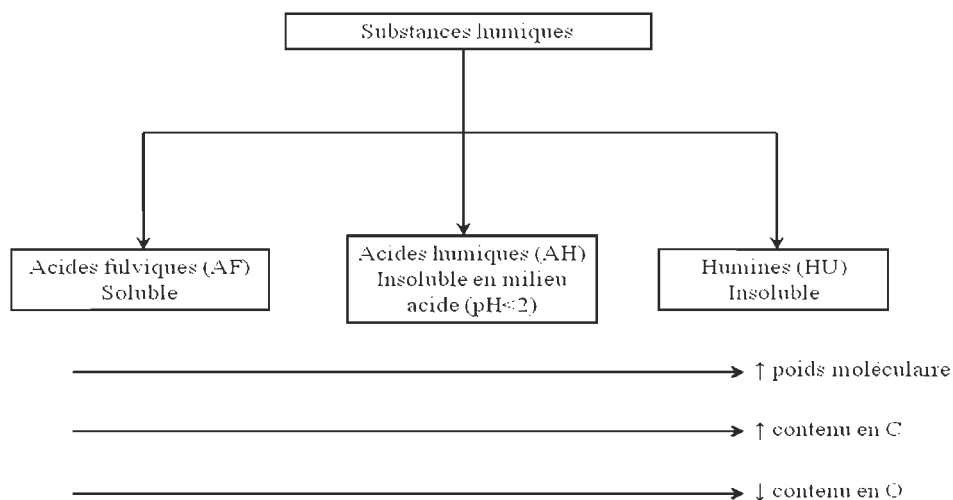


Figure 3 : Caractéristiques des substances humiques (adapté de Stevenson, 1994)

La figure 4 présente des modèles structuraux théoriques de molécules formant les AH et les AF. Les SH sont des assemblages hétérogènes de molécules complexes possédant des caractères amphiphiles (hydrophiles et hydrophobes) et des propriétés acides (Pansu et Gautheyrou, 2003). Les propriétés acides et hydrophiles proviennent majoritairement des groupements carboxyliques et phénoliques et minoritairement des groupements quinones et amines (Gjessing, 1976; Stevenson, 1994). La présence de ces groupements permet la formation de liaisons hydrogène et de liaisons ioniques avec différents composés dissous et particuliers présents dans le milieu (Gagné *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2003; Kah et Brown, 2006; Senesi, 1992). Les SH possèdent aussi des composantes hydrophobes (Gjessing, 1976), qui permettent des interactions avec des composés organiques hydrophobes. Les propriétés amphiphiles font des SH des surfactants qui leur permettent de se sorber sur un grand nombre de surfaces naturelles (argiles, oxyhydroxydes de fer et manganèse...) (Alvarez-Puebla et Garrido, 2005; Chen et Schnitzer, 1978; Gu *et al.*, 1994; Hiemstra *et al.*, 2010; Vigneault *et al.*, 2000; Visser, 1982). Les propriétés amphiphiles des SH peuvent moduler le rapprochement, l'adhésion et les interactions des SH avec des microalgues.

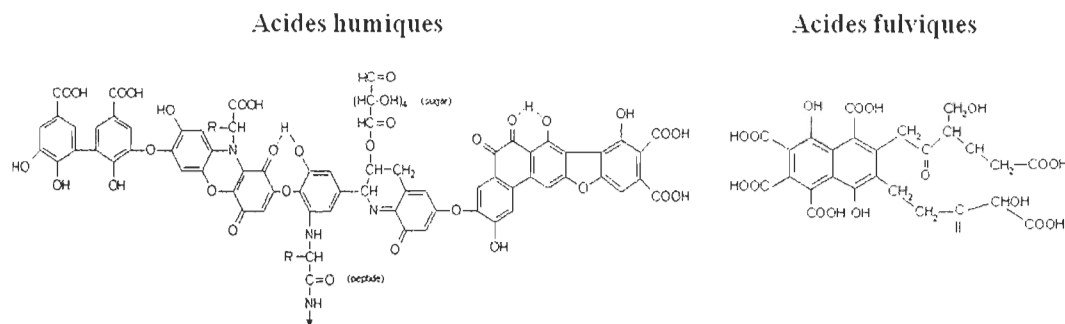


Figure 4 : Modèles des acides humiques (Stevenson, 1994) et des acides fulviques (Buffle, 1977)

1.2.2 Comportement des substances humiques selon le pH et la salinité

Les SH possèdent des groupements carboxyliques qui sont protonés et neutres ($-\text{COOH}$) à pH acide, mais qui sont ionisés ($-\text{COO}^-$) à pH basique. Les groupements phénoliques des SH se comportent de façon similaire. Les parties hydrophobes vont aussi être influencées par le pH (Sutton et Sposito, 2005; 2006) en affectant la conformation spatiale des agrégats en solution (Alvarez-Puebla *et al.*, 2006).

À pH acide, les SH sont peu chargées, ce qui entraîne de faibles répulsions électrostatiques (Alvarez-Puebla *et al.*, 2006). Aussi, les SH ont tendance à se replier, afin de maximiser les énergies permettant la formation de liaisons hydrogène, de liaisons électrostatiques et des interactions de van der Waals (Alvarez-Puebla *et al.*, 2006). Cela conduit à une forte agrégation des SH. Au pH isoélectrique, les SH possèdent des groupements chargés positivement et d'autres négativement, alors que la charge totale est neutre. À ce pH, la molécule est dans un état zwitterionique. Le comportement des SH dans cet état est difficile à prédire, car les agrégats peuvent développer des interactions avec d'autres molécules chargées positivement ou d'autres substances chargées négativement. Lorsque le pH augmente, la charge totale des SH devient négative. À des pH basiques, les SH sont ionisées, car les groupements carboxyliques ($-\text{COOH}$) et hydroxyles ($-\text{OH}$) perdent leur hydrogène, ce qui augmente les répulsions électrostatiques, (Alvarez-Puebla *et al.*, 2006) tout en diminuant le nombre de liaisons hydrogène possibles (Alvarez-Puebla et Garrido, 2005; Alvarez-Puebla *et al.*, 2006). À pH basique, l'agrégation des SH diminue (Alvarez-Puebla et Garrido, 2005). Ainsi, selon le pH, la conformation et la charge globale des SH changent (Alvarez-Puebla et Garrido,

2005 ; Brigante *et al.*, 2007), ainsi que le nombre et la nature des interactions permettant le rapprochement, l'adhésion et les réactions entre les SH et les microalgues.

Dans l'environnement, aux pH usuels compris entre 5 et 8, les groupements carboxyliques sont généralement anioniques et quelques groupements phénoliques peuvent être ionisés (Sutton *et al.*, 2005). Ces groupements vont interagir avec les cations présents dans les milieux possédant différentes forces ioniques. Le pontage des cations, sur les groupements carboxyliques et phénoliques ionisés, diminue les charges négatives des SH. Cela entraîne une diminution des répulsions électrostatiques (Brigante *et al.*, 2007) et augmente l'agrégation des SH et peut même les faire précipiter (Sholkovitz, 1976; Baalousha *et al.*, 2006). Les SH ont une affinité plus forte pour les cations multivalents que les cations monovalents (Baalousha *et al.*, 2006 ; Brigante *et al.*, 2007). Les cations multivalents peuvent former simultanément des liaisons avec plusieurs groupements carboxyliques et phénoliques (Baalousha *et al.*, 2006; Swift 1999). La conformation et la charge totale des SH en sont alors modifiées (Brigante *et al.*, 2007).

Le pH et la force ionique modifient la charge totale, la conformation et l'agrégation des SH. Ainsi, à des forces ioniques élevées ou des conditions acides, les SH peuvent s'agréger plus facilement et précipiter. Ces paramètres jouent un rôle important dans la réactivité physique, chimique et biologique des SH dans l'environnement.

1.2.3 La sorption

La sorption est causée par des interactions se développant entre deux corps. Ces interactions peuvent s'effectuer entre un composé dissous, les SH, et un solide, nommé sorbant, les cellules microalgales. La sorption est un processus complexe pouvant impliquer de l'adsorption, de l'absorption et de la désorption (Weber *et al.*, 1991). L'adsorption se produit lorsque les composés dissous interagissent avec la surface du solide et y sont retenus. L'absorption est un phénomène tridimensionnel, où le composé dissous interagit avec le solide par internalisation. Si le composé ad/absorbé se sépare du sorbant, c'est le phénomène de désorption. La sorption est un phénomène exothermique et spontané (Somorjai, 1994). Cela signifie que tous les solides, aussi bien des particules minérales que des cellules vivantes, pourraient interagir avec les composés dissous comme les SH. D'ailleurs, cela a été rapporté pour des minéraux comme les argiles

(Sutton et Sposito, 2006) ou des cellules microalgales d'eau douce (Campbell *et al.*, 1997; Knauer et Buffle, 2001).

La complexité et l'hétérogénéité des corps interagissant ensemble permettent trois types d'interactions selon Weber *et al.* (1991). Les interactions physiques incluent des interactions de van der Waals et des interactions hydrophobes (Weber *et al.*, 1991; Gagné *et al.*, 2011). Les interactions électrostatiques peuvent être de type complexe de transfert de charge, échange de ligands, liaison ionique ou liaison hydrogène (Weber *et al.*, 1991; Gagné *et al.*, 2011). Enfin, les interactions chimiques impliquent la formation de liaisons covalentes (Weber *et al.*, 1991; Gagné *et al.*, 2011). Toutes ces interactions vont moduler la sorption dépendant de la nature du sorbant, de la nature du composé sorbé et des conditions physico-chimiques du milieu (pH, salinité...).

L'étude de la sorption permet de déterminer plusieurs paramètres importants pour décrire l'effet et le devenir de composés dans l'environnement (Gagné *et al.*, 2011; Kile *et al.*, 1999; Wauchope *et al.*, 2002). Lorsque la sorption est décrite en fonction du temps, on parle de cinétique de sorption. L'étude de la cinétique de sorption permet d'identifier si deux corps peuvent interagir ensemble, puis de déterminer le temps que met le système pour atteindre un état stationnaire (Keller et Staudt, 2004; Sparks, 1989). L'étude de la sorption en fonction du temps permet de qualifier l'évolution de la sorption. Une fois que le système atteint un état stationnaire, il y a autant d'ad/absorption que de désorption. Pour tous les états, il est possible de calculer des quantités sorbées et des constantes de distribution ou K_d . Dans les études portant sur les phénomènes de sorption dans les sols, les valeurs de K_d sont généralement exprimées en faisant le ratio des quantités sorbées par gramme de solide (mg g^{-1}) sur les concentrations demeurant en solution (mg L^{-1}) (Schwarzenback *et al.*, 2002). Toutefois, les microalgues étant des solides hydratés, il est difficile de connaître la masse algale interagissant avec le composé sorbé. Par contre, la surface algale est facilement évaluable en considérant que chaque type de cellule possède une forme régulière. Hillebrand *et al.* (1999), indiquent la façon de déterminer la surface selon les types de cellule : sphère ou sphère prolate. Dans cette étude faisant intervenir des cellules phytoplanctoniques, il est plus facile d'exprimer les K_d en faisant le rapport entre la concentration du composé sorbé par unité de surface (mg m^{-2}) et la concentration du composé en solution (mg L^{-1}). Le K_d ou constante de distribution permet de décrire l'affinité d'un composé pour la surface du sorbant lorsque $K_d > 1$ ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). Quand les valeurs de K_d sont inférieures à 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$), alors

les composés ont plus d'affinité pour le solvant que pour la surface des particules présentes dans le milieu.

La charge de surface des particules montre des valeurs très différentes lorsque les particules sont dans de l'eau de mer contenant ou non de la matière organique dissoute (MOD) (Neihof et Loeb, 1972; Neihof et Loeb, 1974). Dans une eau de mer sans MOD, les charges de surface peuvent être fortement positives ou négatives (Neihof et Loeb, 1972; Neihof et Loeb, 1974). Ces mêmes surfaces dans une eau de mer contenant de la MOD présentent toutes des charges de surface modérément négatives (Neihof et Loeb, 1972; Neihof et Loeb, 1974) signalant que la MOD interagit avec les surfaces (Hunter et Liss, 1979; Muller, 1996). Ceci indique que la MOD présente une affinité pour les particules en suspension dans les milieux naturels. De plus, cette affinité serait modulée par le pH et la salinité ou la force ionique.

La MOD, dont les SH, est reconnue pour se sorber sur les minéraux (Sposito, 2008). La sorption des SH sur des argiles comme la montmorillonite est influencée par la force ionique, la présence de cations monovalents ou divalents et le pH (Sutton et Sposito, 2006). Selon le pH, les interactions intervenant dans la sorption sont différentes. À un pH acide, les SH sorbent sur les argiles par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène (Stevenson, 1994; Sutton et Sposito, 2006). Un complexe SH-argiles est formé (Sutton et Sposito, 2006). À pH basique, les SH sont ionisées, ce qui augmente les répulsions électrostatiques. Une augmentation de la force ionique permet toutefois de diminuer ces répulsions (Neihof et Loeb 1972; Seijo *et al.*, 2009). La présence de cations multivalents, comme Ca^{2+} , permet de faire des pontages entre des groupements ou sites chargés négativement, par formation d'un complexe ternaire SH-Ca-argile (Sutton et Sposito, 2006). La réactivité des SH avec les argiles et avec les contaminants sont assez bien documentées. Mais qu'en est-il avec les organismes vivants?

1.2.4 Effets sur le vivant

Les SH ubiquistes, à la structure chimique mal définie et changeante selon les conditions physico-chimiques du milieu, modulent, à l'échelle du globe, le transport et la dissémination de nombreux composés toxiques dans les sédiments, les sols, les rivières et les océans (Gu *et al.*, 2007; Hirose, 2007; Porcal *et al.*, 2009). Les interactions entre les contaminants organiques ou inorganiques et les SH sont bien reconnues et documentées

(Boullemant *et al.*, 2007; Laglera et Van den Berg, 2009; Murphy *et al.*, 1994; Tremblay *et al.*, 2005a;b). Par contre, les interactions ou les associations entre les SH et les organismes font l'objet de vives discussions (Campbell *et al.*, 1997; Elayan *et al.*, 2008; Findlay et Sinsabaugh, 2003; Steinberg *et al.*, 2008).

Un paradigme classique de la description des SH indique que ces molécules dissoutes sont trop grosses pour être absorbées par les organismes. Par conséquent, les SH n'affecteraient pas le métabolisme (Lutz *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 2006). Cependant, il existe des preuves suggérant que les SH interagissent avec les organismes : 1) maladies chez l'être humain (Cheng *et al.*, 1999; Hseu, 2002), 2) absorption par certains organes du rat (Huang *et al.*, 1995), 3) féminisation de certains poissons (Meinelt *et al.*, 2004), 4) modulation de la reproduction de certains nématodes (Steinberg *et al.*, 2008; Karasyova *et al.*, 2007), 5) effets antimicrobiens (Kupryszewski *et al.*, 2001; Steinberg *et al.*, 2006) ou sources d'énergie pour les bactéries (McKnight *et al.*, 1990), 6) sorption sur des bactéries et cyanobactéries (Abu-Lail *et al.*, 2007; Kulikova *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2007; Zhou et Banks, 1991; 1992), 7) inhibition ou stimulation, selon la provenance des SH, de la croissance de certaines cyanobactéries (Kosakowska *et al.*, 2007), 8) stimulation de la croissance et du développement des végétaux supérieurs (Nardi *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2000) et 9) effets sur la croissance des dinoflagellés (Gagnon *et al.*, 2005; Prakash et Rashid, 1968).

Chez les végétaux inférieurs, on dispose de quelques informations concernant l'action des SH sur les microalgues d'eaux douces. En eau douce, les interactions sont dites indirectes (Matsunaga *et al.*, 1998) quand les SH contrôlent la biodisponibilité en métaux ou nutriments et directes (Campbell *et al.*, 1997; Knauer et Buffle 2001) quand les SH adhèrent aux cellules. Le tableau 1 indique quelques données sur les quantités de SH sorbées et sur les effets produits par les SH sur le phytoplancton d'eau douce. Les quantités de SH sorbées sont comprises entre 0.1 et 31 mg·m⁻² (Campbell *et al.*, 1997; Knauer et Buffle, 2001; Vigneault *et al.*, 2000). Quelle que soit l'origine des SH, la sorption en eau douce est généralement plus forte à des pH acides qu'à des pH basiques, avec généralement un ordre de grandeur de différence. Les SH modifient aussi la biodisponibilité des métaux par exemple le zinc ou le cadmium (Koukal *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009), comme le montre le tableau 1. Les SH permettent aussi d'augmenter le taux de croissance de quelques espèces microalgales (Gagnon *et al.*, 2005; Prakash & Rashid, 1968; Prakash *et al.*, 1973).

Quelques modèles ont été proposés pour décrire les interactions ayant lieu durant la sorption des SH sur les surfaces cellulaires. La figure 5 est un modèle présentant plusieurs sites d'interactions possibles qui a été proposé par Campbell *et al.* (1997). Les symboles Φ représentent des régions hydrophobes. Lorsqu'une région hydrophobe des SH est proche d'une région hydrophobe algale, des interactions hydrophobes peuvent avoir lieu. Les régions algales représentées par le symbole X^- , représentent des sites où les métaux peuvent-être internalisés dans la cellule. Les symboles L^- et LM sont des ligands complexants les cations. Ces deux types de sites peuvent interagir par des interactions électrostatiques, soit des répulsions électrostatiques, soit des liaisons hydrogène. Ce modèle montre que durant la sorption plusieurs types d'interactions peuvent avoir lieu simultanément, permettant le rapprochement, l'adhésion et la réaction des SH avec les microalgues d'eau douce.

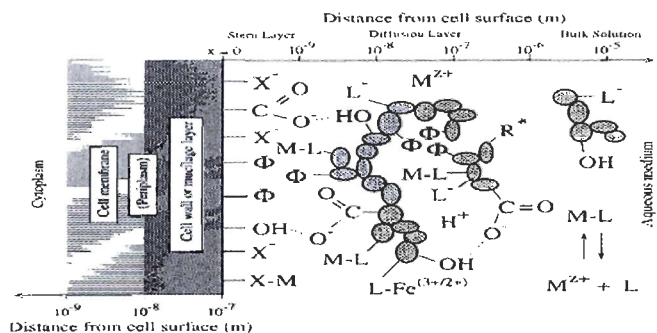


Figure 5 : Modèle conceptuel des interactions métaux-organismes montrant le rôle possible de la matière organique dissoute adsorbée (Campbell *et al.*, 1997)

Tableau 1 : Effets des substances humiques sur des microalgues d'eau douce

Microorganismes	Embranchement	pH	Substances humiques ¹	[SH] mg·L ⁻¹	Effets	Quantité sorbée mg·m ⁻²	Référence
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	<i>Cyanophyta</i>	4	SRAH	5	Sorption	27	Campbell <i>et al.</i> , 1997
		7				10	
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	<i>Cyanophyta</i>	4	SAF			20	
		8				2	
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Chlorophyta</i>	4	SAF			22	
		9				9	
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	<i>Chlorophyta</i>	4	SRAF	10	Sorption	1.1±0.070	Knauer et Buffle, 2001
		7				<0.008	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		4				30.9±2.06	
		7				<0.44	
<i>Chlorella sp.</i>		4				4.96±1.71	
		7				<0.01	
<i>Selenastrum capricornutum</i> ²	<i>Chlorophyta</i>	7.5	ES, ET, SRAF	1 et 5	AH ↓ ⁴ l'effet toxique du Zn et Cd	nd	Koukal <i>et al.</i> , 2003
<i>Chlorella kesslerii</i>	<i>Chlorophyte</i>	6	SRAH	10	Sorption, Contrôle la biodisponibilité du Cu, Cd et Pb	8	Lamelas <i>et al.</i> , 2009
<i>Selenastrum capricornutum</i> ²	<i>Chlorophyta</i>	7 à 8	SHC	0-50 ³	Contrôle la biodisponibilité du Fer. Influence le taux de croissance	nd	Lee <i>et al.</i> , 2009
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Chlorophyta</i>	2	SAF	14	Sorption, Perméabilité membranaire ↑ ⁴ , Effet négatif de l'Al sur la croissance ↓ ⁴	60	Parent <i>et al.</i> , 1996
		7				10	
<i>Chlorella sp.</i>	<i>Chlorophyta</i>	nd ⁵	AHB	4	Taux de croissance ↑ ⁴	nd	Toledo et Tundisi, 1980
<i>Melosira italica</i>	<i>Heterokontophyta</i>	3 à 8	AHB	13-65	Taux de croissance ↑ ⁴	nd	Toledo <i>et al.</i> , 1982
<i>Selenastrum capricornutum</i> ²	<i>Chlorophyta</i>	5	SRAF	5	Sorption, Affecte la perméabilité membranaire	0.61	Vigneault <i>et al.</i> , 2000
		7				<0.1	
		5	SRAH			0.78	
		7				0.1	

¹SRAF : acides fulviques de la rivière Suwannee; SRAH : acides humiques de la rivière Suwannee; SAF : acides fulviques d'un podzol de l'île du Prince Édouard; SHC : substances humiques extraites de 5 lacs de Corée du Sud; ES : extrait de sols; ET : extrait de tourbe; AHB : acides humiques extraits de sédiments du réservoir Broa au Brésil.

² appelé aussi *Pseudokirchneriella subcapitata*.

³ en équivalent substances humiques.

⁴ ↑ Augmenté. ↓ Diminué

⁵ nd : non déterminé

La figure 6 présente un modèle de mécanisme de sorption des SH sur les cellules algales, suggéré par Elayan *et al.* (2008). Ce modèle décrit les interactions des SH avec des microalgues en deux étapes. Durant la première étape, les SH se rapprochent des cellules puis adhèrent à la surface des parois. Durant le phénomène d'adsorption, le modèle décrit des mécanismes d'interactions de surface entre les SH et les microalgues. Quand le pH du milieu est acide, les SH se rapprochent et sorbent sur les parois cellulaires par des liaisons hydrogène (Elayan *et al.*, 2008). En milieu neutre ou basique, les SH sont ionisées, la formation des liaisons hydrogène est plus faible (Elayan *et al.*, 2008). La sorption se fait alors par formation d'interactions de type cellule-cation-SH (Elayan *et al.*, 2008). Dans la deuxième étape, les SH s'absorbent dans la membrane cellulaire. L'absorption se produit majoritairement par des interactions hydrophobes. Ces interactions sont facilitées par la neutralisation des groupements fonctionnels ionisés par des ions (Elayan *et al.*, 2008). Durant cette étape, les SH et les biomembranes réagissent, ce qui entraîne une perturbation de la bicouche lipidique (Elayan *et al.*, 2008). La modification de la bicouche lipidique pourrait entraîner la formation de vésicules contenant des SH et des phospholipides des membranes cellulaires.

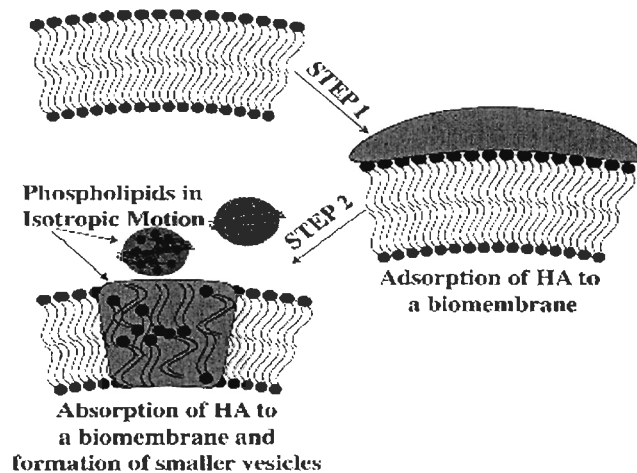


Figure 6 : Mécanismes d'ad/absorption entre la matière organique naturelle et des biomembranes à faibles pH suggérés par Elayan *et al.* (2008)

Ces deux modèles suggèrent que les interactions SH-microalgues sont diversifiées et très complexes et que plusieurs interactions peuvent avoir lieu. Dans les milieux marins, des études (tableau 2) montrent des effets indirects des SH sur les

microalgues, dont un contrôle des SH sur la biodisponibilité des métaux. On remarque aussi que les dinoflagellés et les diatomées présentent un taux de croissance plus élevé en présence des SH (Gagnon *et al.*, 2005; Prakash et Rashid, 1968; Prakash *et al.*, 1973). Il est suggéré que les SH favoriseraient les efflorescences d'algues toxiques (Heil, 2005; Paerl, 1988), comme cela a été mis en évidence dans l'estuaire du Saint-Laurent, tout près de la rivière Manicouagan (Gagnon *et al.*, 2005; Weise *et al.*, 2002). En se basant sur la littérature, seulement deux études (Sánchez-Marín *et al.*, 2010 ; Sánchez-Marín et Beiras, 2011) décrivent une sorption des SH sur les cellules microalgales en milieu marin, mais sans fournir de données sur les quantités sorbées. Dans le but d'améliorer les connaissances sur la réactivité des SH envers les microalgues marines, des expériences de sorption ont été entreprises et sont présentées dans ce mémoire.

Tableau 2 : Effets des substances humiques sur des microalgues marines

Microorganismes	Embranchement	pH	Substances humiques ¹	[SH] mg L ⁻¹	Effets	Quantités sorbées (mg m ⁻²)	Référence
<i>Gymnodinium catenatum</i>	<i>Dinophyta</i>	nd ⁵	SRAH, HRAF, HRAH	3.23 ²	Taux de croissance et la biomasse ↑ ³	nd ⁴	Doblin <i>et al.</i> , 1999
<i>Alexandrium tamarense</i>	<i>Dinophyta</i>	nd ⁵	SRAH, RMAF, RMAH, ES	0.5-10.9	Taux de croissance ↑ ³	nd ⁴	Gagnon <i>et al.</i> , 2005
<i>Prorocentrum minimum</i>	<i>Dinophyta</i>	nd ⁵	RPAF, RPAH	10-11	Taux de croissance ↑ ³ et affecte la photosynthèse	nd ⁴	Heil, 2005
<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Cyanophyta</i>	7.5	MS	4	Contrôle la biodisponibilité du Fer	nd ⁴	Kosakowska <i>et al.</i> , 2007
<i>Dunaliella salina</i> <i>Nannochloropsis salina</i>	<i>Chlorophyta</i> <i>Heterokontophyta</i>	nd ⁵	ESA	0.2	Atténue la toxicité du Ni ²⁺	nd ⁴	Mohammady et Fathy, 2007
<i>Alexandrium tamarense</i> <i>Alexandrium catenella</i> <i>Alexandrium acatenella</i>	<i>Dinophyta</i>	nd ⁵	EZB, MS	6-32	Taux de croissance et la biomasse ↑ ³	nd ⁴	Prakash et Rashid, 1968
<i>Skeletonema costatum</i> <i>Thalassiosira nordenskiöldii</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Heterokontophyta</i>	nd ⁵	LM, EAB	2.6-25	Taux de croissance et la biomasse ↑ ³	nd ⁴	Prakash <i>et al.</i> , 1973
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	<i>Heterokontophyta</i>	8	AHA	2.5-30	Sorption ⁴ , l'accumulation et de l'internalisation du Cu ↓ ³ , internalisation Pb ↓ ³ , accumulation Pb à la surface	nd ⁴	Sánchez-Marín <i>et al.</i> , 2010
<i>Isochrysis galbana</i> <i>Thalassiosira weissflogii</i>	<i>Prymnesiophyta</i> <i>Heterokontophyta</i>	nd ⁵	AHA, AHA, AFR, SRDOM	0-20	Sorption ⁴	nd ⁴	Sánchez-Marín et Beiras, 2011

¹SRAH : acides humiques de la rivière Suwannee, HRAF : acides fulviques de la rivière Huon, HRAH : acides humiques de la rivière Huon, RMAF : acides fulviques de la rivière Manicouagan, RMAH : acides humiques de la rivière Manicouagan, ES : extrait de sols, RPAF : acides fulviques de la rivière Pettaquamscutt, RPAH : acides humiques de la rivière Pettaquamscutt, MS : extrait de sédiment marin ; ESA : extrait de sols de l'université d'Alexandrie, EZB : extrait de zone boisée du Nouveau-Brunswick et de la Nouvelle-Écosse, LM : lixiviat de mangrove ; EAB : extrait d'algue brune, AHA : acides humiques Aldrich, AFR : acides fulviques Frediks research products SRDOM : matière organique dissoute de la rivière Suwannee.

² en équivalent substances humiques.

³ ↑ Augmenté. ↓ Diminué

⁴ nd : non déterminé

1.3 Objectifs de cette étude

L'objectif général de cette recherche est de caractériser la sorption des SH sur des microalgues marines et de comprendre l'évolution de ce phénomène dans un système estuarien.

Plus précisément, six objectifs spécifiques sont poursuivis :

- 1) caractériser les cinétiques de sorption entre les microalgues et les SH,
- 2) étudier les effets des microalgues sur la sorption des SH,
- 3) étudier les effets de la nature des SH sur la sorption par les microalgues,
- 4) déterminer l'évolution de la sorption des SH par les microalgues à plusieurs pH,
- 5) déterminer l'évolution de la sorption des SH par les microalgues en fonction de la salinité,
- 6) étudier les effets de la concentration en SH sur la sorption par les microalgues.

L'étude de tous ces effets permet d'introspecter sur la nature de la sorption entre les SH et les microalgues. De plus, cela va permettre d'étudier l'évolution du rapprochement, de l'adhésion et de la réaction des SH avec les microalgues durant un changement des conditions physico-chimiques du milieu, comme cela se produit dans les estuaires.

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Les microalgues

2.1.1 Les souches microalgales

Des souches microalgales axéniques ont été utilisées afin d'éviter les artefacts pouvant être induits par la présence d'autres organismes (bactéries, virus...) en interférant avec les processus étudiés. Les souches axéniques utilisées proviennent de la phytothèque Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP) de Bigelow (Maine, É.-U.). Elles ont été fournies par la compagnie NutrOcéan de Rimouski. La souche *Isochrysis galbana* utilisée pour ces expériences est la souche CCMP 1324. La souche *Nannochloropsis oculata* est la souche CCMP 525.

2.1.2 La culture

Les deux microalgues ont été cultivées à l'aide du milieu f/2-Guillard correspondant au milieu f-Guillard (Guillard et Ryther, 1962) dont la concentration en nutriment est divisée par deux (Guillard, 1975 tiré d'Andersen *et al.*, 2005). Ce milieu est de l'eau de mer naturelle enrichie avec des nutriments. L'eau de mer utilisée, prélevée à la station aquicole de Pointe-au-Père, a été filtrée à 0.2 µm sur un filtre en polyéthersulfone (filtre en cartouche SuporLife Pall). La composition des différentes solutions de nutriments nécessaires à la préparation du milieu ainsi que le protocole utilisé pour repiquer les microalgues sont décrits en annexe (cf. Annexe I et Annexe II). Les milieux ont été autoclavés (à 110°C pendant 25 min) puis manipulés sous une hotte à flux laminaire stérilisée par de l'alcool isopropylique et par une lampe UV, afin d'éviter les contaminations bactériennes. Des cultures contenant 75 mL de milieu f/2 ont été utilisées pour conserver et pour s'assurer de l'axénicité de la souche. L'axénicité des cultures a été vérifiée par cytométrie en flux. Des volumes de 4 L de culture ont servi pour les expériences de sorption.

Les cultures de 75 mL ou cultures souches ont été placées pendant une semaine dans un incubateur artisanal avec un cycle lumineux de 14:10 (jour/nuit) et une température de 25°C. Au bout d'une semaine, elles ont été transférées dans un incubateur de cycle lumineux identique, mais à 15°C; le taux de division a été réduit, ce qui a permis de repiquer moins souvent les cultures.

Les cultures de 4 L ont été placées dans l'incubateur artisanal à 25°C avec un cycle lumineux 14:10 (jour/nuit). Deux semaines après l'inoculation, les cultures avaient une concentration algale supérieure à $1 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹, ce qui a permis de réaliser les expériences de sorption.

2.2 Les substances humiques

2.2.1 Échantillonnage

Des acides humiques Aldrich, désignés AHA, et des substances humiques naturelles extraites des eaux des rivières Aux-Outardes et Manicouagan ont été utilisés dans cette étude. Les acides humiques Manicouagan et Aux-Outardes sont nommés AHM et AHO respectivement. Les acides fulviques Manicouagan et Aux-Outardes sont désignés AFM et AFO respectivement. Les rivières Aux-Outardes et Manicouagan (figure 7) ont été choisies, car leurs embouchures se situent dans une zone reconnue pour présenter une forte récurrence d'efflorescences toxiques (Gagnon *et al.*, 2005; Weise *et al.*, 2002). L'utilisation de SH naturelles provenant de ces rivières est une des forces de cette étude, car elles permettent une meilleure compréhension des processus se déroulant dans les eaux de l'estuaire du Saint-Laurent. L'échantillonnage des eaux des rivières a été privilégié par rapport aux eaux estuariennes, car cela a permis d'obtenir des échantillons plus concentrés en SH contenant moins de sels. Dans cette étude, 660 L d'eau par rivière ont été échantillonnés dans des bidons de 220 L. Ces bidons en polyéthylène à haute densité ont été soigneusement nettoyés pour éviter les contaminations (annexe III). L'extraction et la purification des SH dans 2000 L (3*660 L) d'eau sont des étapes assez longues. Elles ont été réalisées en moins de 3 mois.



Figure 7 : Localisation des stations d'échantillonnage

2.2.2 Extraction des substances humiques

L'extraction des SH a été réalisée selon le protocole de Thurman et Malcolm (1981), comportant sept étapes. Tous les filtres en fibre de verre utilisés ont été prébrûlés pendant 8 h à 450°C. Des acides et des bases de grade A.C.S. dilués dans de l'eau nanopure ont été utilisés pour l'extraction et la purification des SH.

Protocole :

- 1) Filtration des échantillons avec des préfiltres en fibre de verre de 3.1 μm de porosité (A/D Glass Fiber Filter de 142 mm, Pall) et des filtres en fibre de verre de 0.5 μm (PreSen de 142 mm, General Electric).
- 2) Acidification des échantillons filtrés à $\text{pH} < 2$ par ajout d'acide chlorhydrique.
- 3) Extraction des SH sur une colonne semi-préparative DAX-8 (Supelco, 40 à 60 mesh) de 51 cm*5 cm. Éluion des SH avec de la soude à 0.1 M.
- 4) Reconcentration des SH sur une colonne semi-préparative DAX-8 (Supelco, 40 à 60 mesh) de 51 cm*5 cm à $\text{pH} < 2$. Éluion des SH avec de la soude à 0.1 M.
- 5) Séparation des SH en AF et en AH par acidification à $\text{pH} < 2$ et filtration sur des filtres GF/F de 0.7 μm (Whatman de 47 mm).
- 6) Protonation des AF et des AH sur une résine échangeuse de cations de type IR-120 (Amberlite, 16 à 50 mesh) 51 cm*5 cm
- 7) Lyophilisation des AF et des AH.

2.3 Caractérisation

Afin de comprendre les interactions entre les SH et les microalgues, plusieurs paramètres ont été analysés. La taille des cellules et la composition en groupements fonctionnels des microalgues ont été mesurées. La composition élémentaire, le poids moléculaire et la composition en groupements fonctionnels des SH ont été déterminés.

2.3.1 Taille des microalgues

La taille des cellules a été mesurée à l'aide d'un microscope confocal (Zeiss LSM700). Le diamètre moyen de Nanno ainsi que la hauteur et la largeur moyennes d'Iso ont été calculées à partir de 10 cellules.

2.3.2 Composition élémentaire des substances humiques

Afin de déterminer la composition en carbone et en azote, 1 à 3 mg d'échantillon ont été pesés sur une microbalance MX5 de la compagnie Mettler Toledo, puis encapsulés dans une capsule en étain. Cette capsule a été analysée à l'aide d'un analyseur élémentaire COSTECH ECS, selon le protocole en vigueur à l'ISMER (cf. Annexe IV).

Ces mesures ont servi à déterminer la pureté et les masses de SH nécessaires pour faire les différentes solutions contenant des SH. Les résultats de la composition élémentaire de chaque SH utilisés n'ont été ni décrits ni discutés dans les résultats.

2.3.3 Poids moléculaire des substances humiques

Le poids moléculaire a été déterminé par chromatographie d'exclusion (HPSEC) selon la méthode de Chin *et al.* (1994). Pour les analyses, des solutions de SH à une concentration de 2.5 mg L^{-1} ont été préparées dans un tampon phosphate à pH 6.8 avec 0.1 M de NaCl. Entre 20 et 100 μL d'échantillon de SH ont été injectés dans une colonne Protein-Pak 125 (Waters) thermostatée à 20°C. Le débit dans la colonne était de 1 mL min^{-1} . La calibration de la colonne a été réalisée avec du polystyrène sulfonate (18 kDa, 8 kDa, 5.4 kDa et 1.8 kDa) et de l'acétone (Chin *et al.*, 1994). La détection a été

réalisée par spectroscopie UV-Visible à 254 nm. Le logiciel « Breeze » (Waters) a permis de déterminer les masses molaires.

2.3.4 Caractérisations chimiques

2.3.4.1 Matrices d'excitation et d'émission de fluorescence des substances humiques

Les matrices d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) ou fluorescence 3D ont été réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluoromax-4 de la compagnie Horiba Jobin Yvon. Des solutions de SH à 2.5 mg L^{-1} ont été préparées puis filtrées à $0.2 \mu\text{m}$ sur un filtre en polyéthersulfone (Kowalczyk *et al.*, 2009) pour limiter l'effet Tyndall causé par la présence de particules en suspension. Pour éviter l'effet de filtre interne, résultant d'une concentration trop élevée des échantillons, les échantillons ont préalablement été analysés en spectroscopie UV-Visible. Pour éviter l'effet de filtre interne, l'absorbance doit être inférieure à 0.02 UA (Kowalczyk *et al.*, 2005).

Des spectres d'excitation et d'émission ont été acquis et assemblés par le logiciel « Fluorescence » (Horiba Jobin Yvon), pour former une MEEF. Le tableau 3 compile les conditions utilisées pour obtenir les MEEF. Des cuvettes en quartz de 1 cm ont été utilisées.

Tableau 3 : Conditions des mesures en fluorescence 3D

Spectre	Longueurs d'onde	Fente optique	Pas du balayage
Excitation	250 à 500 nm	5 nm	5 nm
Emission	250 à 600 nm	5 nm	2 nm

2.3.4.2 Analyse du carbone organique dissous

Les analyses de DOC ont été effectuées avec un analyseur Shimatzu TOC V_{CPN} sur des échantillons acidifiés (HCl, pH 2), conservés dans des vials de verre prébrulés

(450°C pendant 12 h). Ces données ne servant que pour le calcul des indices SUVA (Specific UV Absorbance, cf. section 2.3.4.3) n'ont été ni décrites ni discutées.

2.3.4.3 Mesure de l'absorbance UV-Visible

Les analyses en UV-Visible ont été effectuées sur un spectrophotomètre Lambda 35 (Perkin Elmer), avec des cuvettes en quartz de 1 cm, selon les conditions d'analyses décrites dans le tableau 4. Le spectrophotomètre Lambda 35 est un spectrophotomètre à double faisceaux.

Tableau 4 : Conditions des mesures en spectrométrie UV-Visible

Spectre	700 à 200 nm
Fente optique	5 nm
Pas du balayage	1 nm

L'absorbance dans l'UV et le visible a permis de déterminer plusieurs paramètres décrivant brièvement la composition de la MOD. Les échantillons utilisés pour caractériser les SH ont une concentration de 10 mgL⁻¹. À partir des spectres UV-Visible, la pente spectrale entre 305 et 265 nm a été déterminée (Bricaud *et al.*, 1981; Brown, 1977; Galgani *et al.*, 2011). Une relation inverse existe entre l'absorbance et les longueurs d'onde, ce qui indique que les pentes spectrales sont négatives. Toutefois, les pentes de cette étude sont exprimées de la même manière que dans la littérature, c'est-à-dire en valeur absolue. Par la suite, les coefficients d'absorption (a_λ) ont été calculés selon la relation (1), en multipliant un facteur de 2.303 à un ratio entre l'absorbance (A_λ) à 375 nm (Bricaud, *et al.*, 1981; Green et Blough, 1994) ou à 280 nm (Silverstein *et al.*, 1998) et le parcours optique (L) exprimé en mètre.

$$a_\lambda = 2.303 * \frac{A_\lambda}{L} \quad (1)$$

Un indice de l'aromaticité des SH a été déterminé à l'aide de la relation (2), qui correspond au ratio (E4/E6) entre les absorbances à 465 nm (A_{465}) et 665 nm (A_{665}) (Chen *et al.*, 1977; Pansu et Gautheyrou, 2003; Weishaar *et al.*, 2003).

$$\frac{E4}{E6} = \frac{A_{465}}{A_{665}} \quad (2)$$

L'aromaticité a aussi été évaluée à partir de l'indice SUVA (Specific UV Absorbance) (Weishaar *et al.*, 2003). L'indice SUVA est un ratio entre l'absorbance à 254 nm (A_{254}) et la concentration en DOC multipliée par le parcours optique (L) exprimé en mètre comme le montre la relation (3). L'indice SUVA permet de calculer un pourcentage d'aromaticité (%arom) à l'aide de la relation (4) développée par Weishaar *et al.* (2003).

$$SUVA = \frac{A_{254}}{DOC * L} \quad (3)$$

$$\%_{arom} = SUVA * 6.5 + 3.6 \quad (4)$$

2.3.4.4 Groupements fonctionnels des microalgues et des substances humiques

La spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier (FTIR) a récemment été utilisée pour caractériser la composition en groupements chimiques des microalgues (Dean *et al.*, 2008; Giordano *et al.*, 2001; Quilès *et al.*, 2010) et des SH (Alaoui *et al.*, 2011; Madari *et al.*, 2006; Senesi *et al.*, 2003; Tatzber *et al.*, 2007; Tremblay et Gagné, 2002; 2007; 2009; Vergnoux *et al.*, 2011). Les mesures en spectroscopie FTIR ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre Spectrum 400 (Perkin Elmer) avec un accessoire de réflexion totale atténuée (ATR). Deux cents balayages par échantillon ont été réalisés selon les conditions décrites dans le tableau 5.

Tableau 5 : Conditions pour les mesures en spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier

Spectre	4000 à 650 cm ⁻¹
Résolution	4.00 cm ⁻¹

Pour les mesures, les échantillons de microalgues ont été centrifugés, lavés avec un mélange isotonique de formiate d'ammonium, congelés à -80°C et lyophilisés. Les SH ont été broyées dans un mortier en agate, avant les mesures en spectroscopie FTIR.

Les bandes d'intensité les plus importantes dans les spectres infrarouges ont été traitées. Une ligne de base a été tracée sur le spectre, puis l'intensité du signal de chaque bande a été mesurée par rapport à la ligne de base. L'intensité totale des signaux recueillis (I_{tot}) a été calculée selon l'équation (5) où I_1 désigne l'intensité de la bande 1, I_2 désigne l'intensité de la bande 2 et I_n désigne l'intensité de la nième bande. Ensuite, l'intensité relative (I_{nN}) de chaque bande (I_n) a été déterminée par la relation (6).

$$I_{\text{tot}} = I_1 + I_2 + \dots + I_n \quad (5)$$

$$I_{nN} = \frac{I_n}{I_{\text{tot}}} * 100 \quad (6)$$

Cette approche présente des limites, car chaque bande infrarouge peut être associée à un groupement chimique, possédant un coefficient d'absorptivité molaire qui peut varier d'une bande à une autre (Skoog *et al.*, 2003). Toutefois, cette approche vise à mettre en évidence des différences spectroscopiques entre les microalgues et entre les SH étudiées.

2.4 Sorption

2.4.1 Expériences préliminaires

Dans cette étude, la production d'artefacts et leurs effets ont été minimisés par la réalisation de travaux préliminaires, qui ont permis d'identifier des conditions permettant l'amélioration de la méthodologie. Le tableau 6 compile les artefacts observés et les solutions trouvées pour les prévenir.

Tableau 6 : Artefacts et solutions

Étapes	Nature des artefacts	Solutions
1	Sorption des SH sur différents matériaux (plastiques, verres...)	Utilisation du matériel en verre
2	Contamination par les gants	Utilisation de gants en polynitriles lavés à l'eau osmosée
3	Effets des filtres	Utilisation de filtres GF/F (Whatman, de 47 mm de diamètre) prébrulés pendant 8 h à 450°C et prélavés avec 200 mL d'eau osmosée
4	Présence possible de bactéries	Travail en milieu stérile. Utilisation d'une hotte biologique à flux laminaire. Stérilisation du matériel en verre.
5	Contaminations métalliques et organiques	Voir le protocole de lavage de la vaisselle (cf. annexe IV)
6	Contaminations organiques	Brûler pendant 12 h à 450°C les pipettes Pasteur, les tubes d'échantillonnages et les filtres en verre

Avant de réaliser les expériences de sorption, différentes solutions ont été réalisées. Des solutions de soude (NaOH) (Lab Mat) et d'acide chlorhydrique (HCl) (Lab Mat) à 0.1 M, servant à réguler le pH, ont été stérilisées (110°C pendant 25 min). La régulation de la salinité a été faite par ajout d'une saumure concentrée (210 mgL⁻¹), stérilisée à 110°C pendant 25 min, contenant du NaCl (Lab Mat), du MgSO₄ (Baker Analyzed) et du NaHCO₃ (Sigma) ou par ajout d'eau nanopure prélevée le jour même. Les sels servant à faire la saumure ont été brulés à 450°C pour le NaCl et le MgSO₄ et à 210°C pour le NaHCO₃, puis la saumure a été autoclavée (110°C pendant 25 min). Des solutions mères de SH à 200 mgL⁻¹ ont été préparées et laissées au repos pendant au moins 24 h avant toutes utilisations. Ces solutions n'ont pas été stérilisées afin d'éviter une modification de la structure des SH.

2.4.2 Expériences de sorption

Les expériences de sorption réalisées en batch ont été effectuées sur plusieurs jours, comme le montre la figure 8. Le jour 1 a servi à préparer des solutions à pH et salinité connus et à laisser les solutions s'équilibrer. Trois types de solutions ont été

préparés afin de réaliser les expériences de sorption 1) une solution contenant de l'eau de mer stérile, 2) une solution contenant des SH dans de l'eau de mer stérile et 3) une solution contenant des microalgues.

Durant le jour 2, les solutions contenant des SH et des microalgues ont été mises en contact pour étudier la sorption en fonction du temps. Avant la mise en contact, le pH et la salinité des solutions préparées la veille ont été mesurés et ajustés si nécessaire. Les différentes solutions ont été fractionnées en deux pour faire des solutions servant aux mesures de calibration et des solutions pour les mesures de sorption. Les solutions avec les microalgues et les SH servant à la sorption ont été mises en contact et agitées doucement à la main pendant 1 min. Des prélèvements ont été effectués après 5, 30, 60, 90 et 120 minutes de contact. Les prélèvements ont servi à faire des mesures d'UV-Visible (UV-Vis) et de dénombrement cellulaire (dCr). Les échantillons UV-Vis ont été filtrés sur un filtre GF/F de 0.7 μm (prébrulés à 450°C pendant 8 h et prélavés avec 200 mL d'eau osmosée). Le filtrat a été récupéré dans des vials ambrées (de 40 mL, prébrulées à 450°C pendant 12 h), puis conservé à 4°C. Les échantillons pour le dénombrement cellulaire ont été réalisés selon le protocole décrit en annexe V.

Le jour 3 a servi à analyser les échantillons pour l'UV-Vis et le dCr. Les conditions d'analyse des échantillons UV-Vis sont décrites dans la section 2.3.4.3. Les échantillons de dCr ont été analysés en cytométrie en flux par un cytomètre Epic Altra (Beckman Coulter).

Plusieurs paramètres influençant la sorption ont été étudiés, tels les effets du pH, les effets de la salinité et les effets de la concentration. Pour les effets du pH, les pH étudiés sont : 4, 6 et 8 à une salinité de 25 PSU et une concentration en SH de 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Pour les effets de la salinité, des salinités de 15, 25 et 35 PSU ont été utilisées avec une concentration en SH de 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ et à un pH de 8. Pour les effets de la concentration en SH, trois concentrations : 2.5, 5 et 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ont été étudiées à 25 PSU et à des pH de 6 ou de 8.

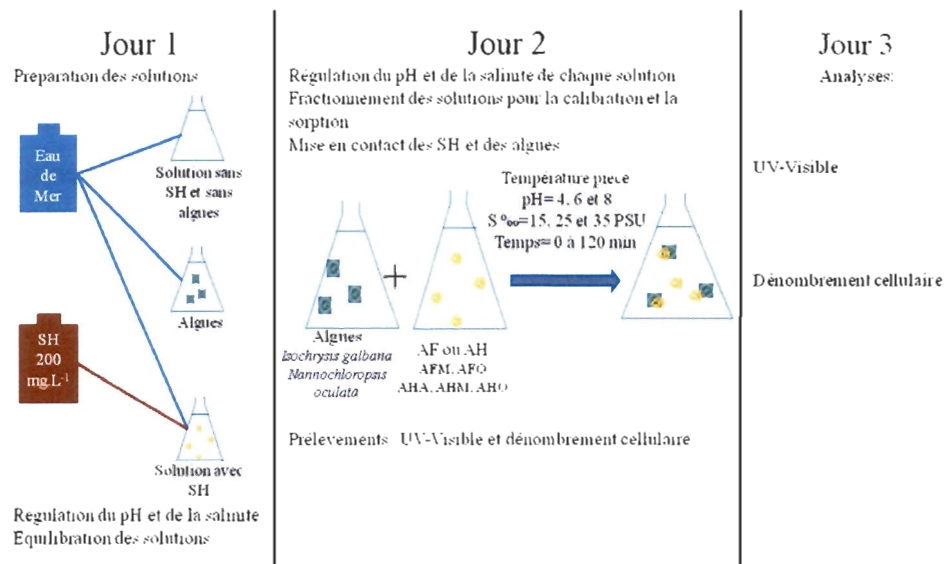


Figure 8 : Schéma simplifié des manipulations

2.4.3 Quantification de la sorption

Le spectrophotomètre UV-Vis, utilisé pour faire les mesures d'absorbance, est un spectrophotomètre à double faisceaux (Lambda 35, Perkin Elmer), ce qui a permis d'effectuer immédiatement les corrections pour le blanc. Pour quantifier la sorption, il a fallu compiler 1) les absorbances à 280 nm, 2) les équations des droites de calibration pour les solutions de SH à différentes concentrations, à différents pH ou à différentes salinités, 3) les dénombrements cellulaires, 4) la taille et les surfaces totales des microalgues et 5) les volumes des solutions utilisés. Des duplicatas/triplicatas ont été réalisés.

La concentration des SH dans la solution a été calculée à l'aide de la relation (7), où A_{280} représente l'absorbance à 280 nm, a est la pente de la droite de calibration à 280 nm, $[SH]$ est la concentration en SH et b désigne l'ordonnée à l'origine.

$$A_{280} = a[SH] - b \quad (7)$$

À partir de la concentration en SH, la quantité de SH (Q_{SH}) en solution est calculée en tenant compte du volume de solution utilisé (V_f), comme l'indique la relation (8). La quantité sorbée (Q_m) est calculée, selon la relation (9), en faisant la différence entre la quantité de SH initiale en solution (Q_{SHt1}), et la quantité de SH finale en solution après un temps donné (Q_{SHt2}).

$$Q_{SH} = [SH] * V_f \quad (8)$$

$$Q_m = Q_{SHt1} - Q_{SHt2} \quad (9)$$

Pour comparer les résultats, il faut tenir compte des surfaces sorbantes totales, qui sont déterminées par la surface de chaque microalgue et la concentration cellulaire totale, afin d'exprimer les quantités sorbées par unité de surface (mg m^{-2}). La surface d'une cellule est calculée, selon les équations (10) pour Iso et (11) pour Nanno (Hillebrand *et al.*, 1999), où S représente la surface d'une cellule microalgale (m^2), d est le diamètre de la cellule (m) et h désigne la hauteur de la cellule (m).

$$S = \frac{\pi * d}{2} * \left(d + \frac{h^2}{\sqrt{h^2 - d^2}} * \sin^{-1} \left(\frac{\sqrt{h^2 - d^2}}{h} \right) \right) \quad (10)$$

$$S = \pi * d^2 \quad (11)$$

La quantité de microalgues totale est déterminée selon la relation (12) où le terme dCr_{tot} désigne la quantité totale de microalgues, dCr est la concentration cellulaire exprimée en cellules.mL^{-1} et V_f représente le volume de solution utilisé.

$$dCr_{tot} = dCr * V_f \quad (12)$$

La surface microalgale totale est calculée à partir de la relation (13) où S_{tot} représente la surface microalgale totale (m^2), dCr_{tot} désigne la quantité totale de microalgues et S est la surface d'une cellule microalgale (m^2).

$$S_{tot} = dCr_{tot} * S \quad (13)$$

La quantité sorbée par unité de surface, à un temps donné, peut alors être calculée à partir de la relation (14), où Q_M représente la quantité sorbée par unité de surface à un temps donné (mg m^{-2}), Q_m est la quantité sorbée à un temps donné (mg) et

S_{tot} représente la surface microalgale totale (m^2). Les mesures ayant été effectuées en duplicatas/triplicatas, les Q_M à un même temps donné de chaque duplicata/triplicatas ont pu être moyennées.

$$Q_M = \frac{Q_m}{S_{\text{tot}}} \quad (14)$$

Une constante de sorption ou constante de distribution, K_d , a été calculée, selon la relation (15), où le terme K_d désigne la constante de distribution, $Q_{S_{\text{moy}}}$ est la concentration sorbée moyenne (mg m^{-2}) et $[SH]_{\text{liqmoy}}$ représente la concentration moyenne en SH demeurant en solution (mg L^{-1}).

$$K_d = \frac{Q_{S_{\text{moy}}}}{[SH]_{\text{liqmoy}}} \quad (15)$$

Afin de calculer les quantités sorbées moyennes ($Q_{S_{\text{moy}}}$), les Q_M mesurés à l'état stationnaire ont été moyennées. Les K_d et les coefficients de variation (CV %) ont été calculés de la même manière.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Dans cette recherche, des expériences de sorption « batch » ont été réalisées afin de caractériser et de quantifier les interactions entre les SH et les microalgues. De plus, pour comprendre les phénomènes de rapprochement, d'adhésion et de réactions conduisant à la sorption des SH par les microalgues, les cellules microalgales ont été caractérisées selon leur taille et la présence de certains groupements fonctionnels. Pour les SH, des travaux de caractérisation du poids moléculaire, de la proportion de fluorophores caractéristiques des SH, de l'absorbance et de la présence de certains groupements fonctionnels ont été effectuées. Une des forces de ce projet est d'avoir utilisé des SH naturelles et de les avoir caractérisées pour mieux comprendre les interactions observées.

Durant les expériences de sorption, qui ont duré jusqu'à deux heures, la concentration cellulaire dans les milieux réactionnels est demeurée constante. De plus, aucun exsudat microalgal sous forme de gel ou de particules n'a été observé ni visuellement, ni par spectrophotométrie UV-Visible, ni par analyse du carbone organique dissous, ni par MEEF. Ces observations suggèrent que cette recherche a permis de quantifier la sorption, plutôt que la consommation des SH par les microalgues. De plus, les cultures utilisées pour réaliser les expériences n'ont pas présenté de contaminations bactériennes (vérifiées par cytométrie en flux) ce qui indique que les phénomènes de sorption observés ne sont dus qu'aux microalgues. Les résultats obtenus montrent de nombreuses variations causées par la complexité des milieux réactionnels et par la diversité des microalgues et des conditions physico-chimiques étudiées. Dans ce chapitre, les tendances nettes dans les résultats sont présentées. En ce qui concerne les variations plus légères, seules celles semblant posséder une explication sont présentées.

3.1 Cinétique de sorption

Lorsque les quantités sorbées sont étudiées en fonction du temps, les variations observées décrivent la cinétique de sorption des SH en présence de microalgues. La figure 9 présente les cinétiques de sorption obtenues pour les AHM mis en contact avec Iso et Nanno à pH 8 et 25 PSU. Cette figure présente les deux tendances principales observables dans les cinétiques de sorption lors de la mise en contact des SH avec les microalgues. Dans le cas

d'Iso, une augmentation rapide des quantités sorbées est observée entre 0 et 5 min. Par la suite, les quantités sorbées présentent peu de variations dans le temps, montrant l'atteinte d'un état stationnaire. Dans le cas de Nanno, l'atteinte de cet état peut prendre jusqu'à 60 min. Dans cette étude, la sorption est un phénomène rapide (60 min), voire très rapide (5 min). On remarque aussi la grande différence des quantités d'AHM sorbées par Iso et Nanno. Elles sont respectivement de 24 mg m^{-2} et 5.9 mg m^{-2} pour Iso et Nanno. Les différences dans les cinétiques de sorption et dans les quantités sorbées suggèrent que les mécanismes de sorption peuvent différer selon la microalgue considérée. La surface exposée par les cellules et la composition des surfaces cellulaires des microalgues pourraient jouer un rôle. D'autres résultats obtenus montrent que la nature des SH, le pH et la salinité interviennent aussi pour moduler la cinétique de sorption et les quantités sorbées. Les autres résultats obtenus sont présentés aux annexes VI à XI.

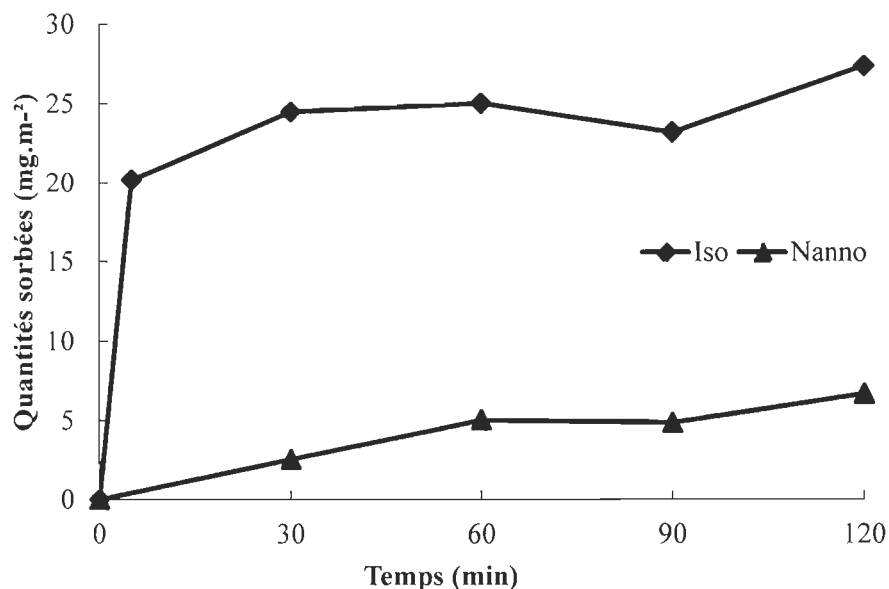


Figure 9 : Sorption des acides humiques Manicouagan (AHM) par *Isochrysis galbana* (Iso) et *Nannochloropsis oculata* (Nanno) à 25 PSU, à pH 8 et à 2.5 mg L^{-1}

3.2 Effets des microalgues

La surface des microalgues est susceptible d'affecter la sorption des SH, soit par un simple effet physique, soit par un effet chimique. L'effet physique est relié à la superficie exposée et devrait dépendre de la taille des microalgues. L'effet chimique, pour sa part, est lié à la composition chimique des surfaces microalgales exposées aux SH.

3.2.1 Taille des microalgues

Le tableau 7 présente le diamètre et la surface des microalgues étudiées. En considérant que les microalgues sont des surfaces lisses, alors Iso avec son diamètre de 6 μm , présente une surface de 104 μm^2 . Nanno avec un diamètre de 3 μm présente une surface de 29 μm^2 . En considérant que les deux microalgues aient des surfaces de même composition chimique, le rapport des surfaces serait un bon indicateur pour comprendre les différences dans les quantités de SH sorbées par les microalgues. Comme le montre le tableau 7, Iso a une surface 3.7 fois plus grande que Nanno. La différence des surfaces suggère que la sorption par Iso serait 3.7 fois plus importante que pour Nanno. La figure 9 indique, qu'à pH 8 et 25 PSU, Iso sorbe 4.1 fois plus d'AHM que Nanno.

Tableau 7 : Diamètre et surface d'*Isochrysis galbana* et de *Nannochloropsis oculata* et rapport (Iso/Nanno) entre ces surfaces

	Diamètre (μm)	Surface (μm^2)
<i>Isochrysis galbana</i>	6	104
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3	29
	Iso/Nanno	3.7

3.2.2 Caractérisation chimique des microalgues par spectroscopie infrarouge

La figure 10 présente les spectres infrarouges obtenus pour les microalgues. En excluant la large bande située dans la région 3000-3650 cm^{-1} , causée par les liaisons hydrogènes (Lide, 1994), 10 bandes dominantes sont observées. Bien que les spectres montrent de grandes ressemblances, l'intensité de chaque bande diffère selon la microalgue. Les bandes localisées à 2930 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} sont associées à des élongations

respectivement asymétriques et symétriques des groupements CH_2 . L'élongation des groupements $\text{C}=\text{O}$ induit une bande vers 1735 cm^{-1} . La bande à 1650 cm^{-1} provient de l'élongation des groupements $\text{C}=\text{O}$ associés aux NH et aux OH . La déformation des groupements NH provoque une bande à 1530 cm^{-1} . La bande à 1460 cm^{-1} est due au cisaillement des groupements CH_2 et CH_3 des protéines. L'élongation des groupements COO , CH_2 et CH_3 forme une bande à 1390 cm^{-1} . La bande à 1235 cm^{-1} correspondrait à l'élongation asymétrique des groupements $\text{P}=\text{O}$. L'élongation des groupements C-O-C forme une bande à 1150 cm^{-1} . La bande à 1035 cm^{-1} est due à l'élongation des groupements $-\text{OH}$ couplé à des groupements CO , CH_2OH et C-O-C . Ces données montrent que les microalgues possèdent de nombreux groupements chimiques susceptibles d'interagir en présence de SH .

Le tableau 8 compile l'attribution des bandes des spectres FTIR-ATR à des fonctions chimiques, à des familles de composés et leurs localisations dans les cellules microalgales. Les deux bandes situées à 2930 et 2850 cm^{-1} sont caractéristiques des alkyles, présents dans les deux microalgues étudiées. L'intensité des deux bandes des alkyles représente 56 % (37 et 15 %) de l'intensité totale pour Iso et 40 % (28 et 12 %) pour Nanno. Le tableau 8 indique que les deux microalgues sont riches en esters. Nanno en possède plus qu'Iso, respectivement de 8 % et 4 %. Pour obtenir l'intensité totale des protéines, les deux bandes à 1650 cm^{-1} et à 1530 cm^{-1} peuvent être additionnées. Les protéines sont plus importantes pour Nanno avec 34 % (24 et 10 %), alors qu'Iso n'en possède que 25 % (17 et 8 %). Les groupements associés aux carboxyles, aux éthers, aux cétones, aux aldéhydes et au phosphore organique (peu présent) seraient plus importants pour Nanno que pour Iso. Nanno possède légèrement plus de sucre, environ 10 % (3 % et 7 %), qu'Iso avec 8 % (3 % et 5 %). Les microalgues présentent des proportions de groupements chimiques différentes, ce qui suggère que la composition cellulaire n'est pas la même et que les microalgues sont susceptibles d'interagir différemment en présence de SH . Toutefois, les mesures en FTIR donnent un signal global de la composition chimique de la matrice microalgue et ne permettent pas une localisation précise de ces groupements chimiques dans les cellules microalgales de cette étude.

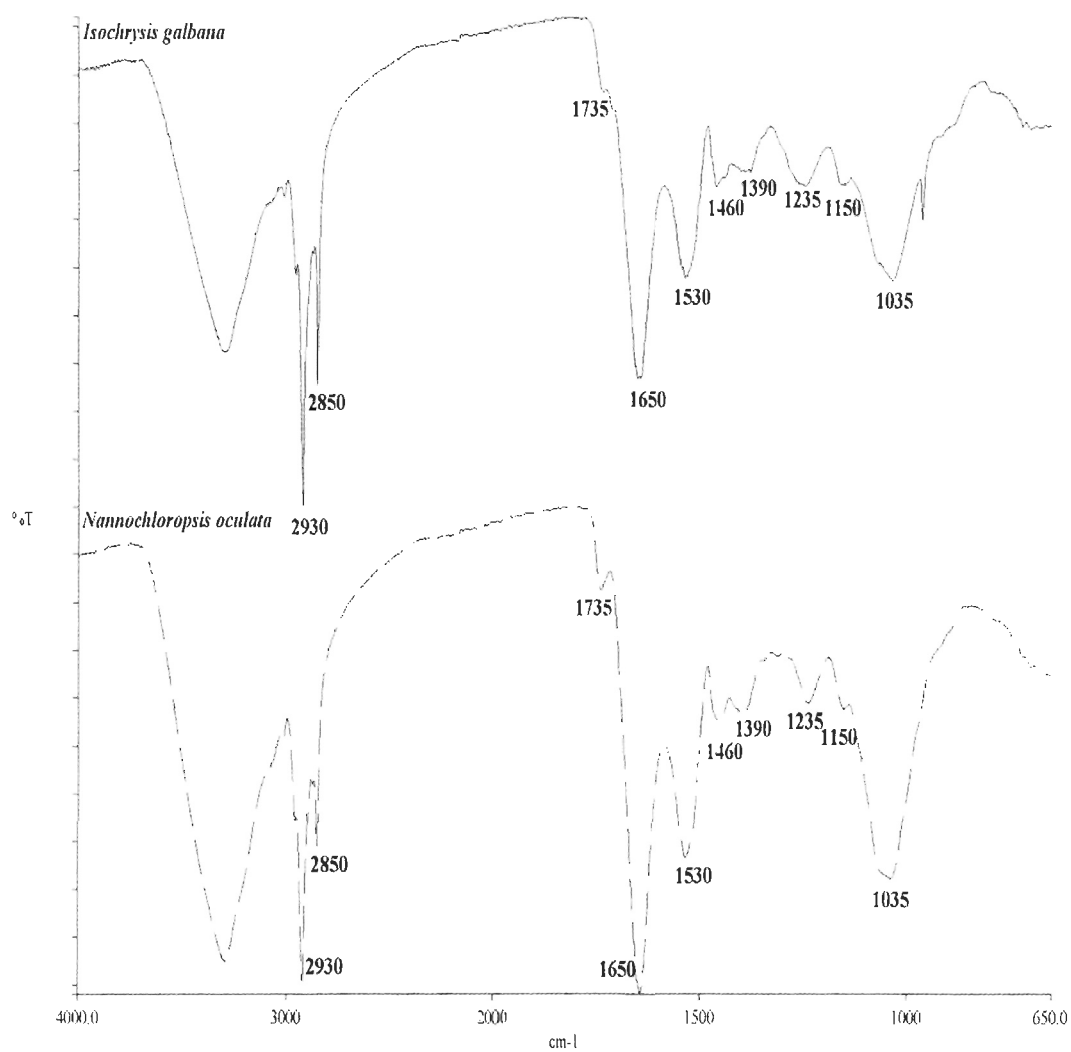


Figure 10 : Spectres infrarouges par réflectance totale atténuée d'*Isochrysis galbana* et de *Nannochloropsis oculata*

Tableau 8 : Attribution des bandes des spectres infrarouges d'*Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis oculata* à des fonctions chimiques, des composés et leurs localisations dans la cellule (modifié de : Dean *et al.*, 2008; Giordano *et al.*, 2001; Quilès *et al.*, 2010)

Longueur d'onde cm ⁻¹	Fonction chimique	Groupe chimique	Composé chimique	Localisation dans la cellule	Iso en % ¹	Nanno en % ¹
2930 (2995-2875)	Élongation asymétrique CH ₂	Alkyle	Lipide, Acide gras	Membrane	37	28
2850 (2875-2840)	Élongation symétrique CH ₂	Alkyle	Lipide, Acide gras	Membrane	19	12
1735 (1760-1715)	Élongation C=O	Ester	Ester des lipides, Algaenans	Membrane	4	8
1650 (1715-1585)	Élongation C=O associé -NH H ₂ O	Amide I	Protéine	Membrane, cytoplasme, flagelle, ribosome	17	24
1530 (1585-1480)	Déformation NH	Amide II	Protéine	Membrane, cytoplasme, flagelle, ribosome	8	10
1460 (1480-1425)	Cisaillement CH ₂ et CH ₃ <i>Des protéines</i>	Alkyle	Protéines	Membrane, cytoplasme, flagelle, ribosome	3	3
1390 (1425-1330)	Élongation COO, Élongation CH ₃ et CH ₂	Carboxyles Acides aminés CH ₃ et CH ₂ des protéines	Acide gras, Protéine	Membrane	1	2
1235 (1330-1190)	Élongation asymétrique P=O	Phosphore organique	Phospholipide, Phosphodiester, Acide nucléique	Membrane, nucléotide, ribosome	2	3
1150 (1180-1120)	Élongation C-O-C	Éther	Carbohydrates, Algaenans	Membrane Paroi cellulaire	3	3
1035 (1135-970)	Élongation OH couplé dans CO, CH ₂ OH, COC	Cétone, aldéhyde Hydroxyle, éther	Polysaccharides, Carbohydrates, Algaenans	Membrane Paroi cellulaire Inclusion de stockage	5	7

¹ : % calculés en faisant la somme des intensités et sans tenir compte du coefficient d'adsorptivité molaire de chaque groupement fonctionnel

3.2.3 Quantités sorbées

Afin de comprendre les effets des microalgues sur la sorption, des expériences à 25 PSU et à pH 8 ont été réalisées à des concentrations en SH comprises entre 1.25 à 2.5 mg L⁻¹. Ces concentrations correspondent aux concentrations naturelles en DOC retrouvées dans les zones estuariennes, comprises entre 0.7 et 1.5 mg C L⁻¹. Le tableau 9 montre que les quantités de SH sorbées varient entre 5.0 et 24 mg m⁻² pour Iso et entre 4.1 et 8.0 mg m⁻² pour Nanno. La variation des rapports des quantités sorbées, présentée dans le tableau 9, est plus marquée pour les AH que pour les AF. Il est de 1.3 pour AFM et de 0.7 pour les AFO. Pour les AH, ce rapport varie plus. Il est respectivement de 2.5, 4.1 et 2.6 pour les AHA, les AHM et les AHO. Les rapports Iso/Nanno des SH sorbées sont généralement différents du rapport des surfaces calculé qui est de 3.7 si les microalgues étaient des surfaces lisses de même composition chimique. Il semble que l'effet chimique domine les effets physiques lors des processus de sorption. Les résultats compilés dans le tableau 9 suggèrent que la composition de la surface des microalgues exposées aux SH en solution a un effet sur la sorption. Les conditions de salinité et de pH pourraient aussi moduler les effets chimiques.

Tableau 9 : Quantité sorbée (mg m⁻²) à 25 PSU, à pH 8 et à 2.5 mg L⁻¹ pour les AF, AHA et AHM, mais à 1.25 mg L⁻¹ pour AHO et rapport Iso/Nanno des quantités sorbées

SH	Iso	Nanno	Iso/Nanno
AFM	5.5	4.1	1.3
AFO	5.0	6.8	0.7
AHA	20	8.0	2.5
AHM	24	5.9	4.1
AHO	18	7.1	2.6

3.3 Effets de la nature des substances humiques

Comme le montre le tableau 9, pour une microalgue, les quantités sorbées diffèrent selon les SH étudiées. Les SH possèderaient des caractéristiques différentes selon leur nature AF ou AH, mais aussi selon leur origine. Cette hétérogénéité peut moduler la sorption et mérite que certaines caractéristiques chimiques des SH soient mesurées.

3.3.1 Poids moléculaire

Le poids moléculaire, mesuré par chromatographie d'exclusion, des AFM est de 1349 Da et celui des AFO de 1369 Da. Pour les AHA, il est de 1630 Da, de 1521 Da pour les AHM et de 1609 Da pour AHO. Les poids moléculaires des AF sont légèrement plus faibles que ceux des AH. Considérant la faible gamme de poids moléculaire des SH utilisées, ce paramètre ne permet pas d'expliquer les variations observées dans la sorption. On ne sait pas si des effets seraient possibles avec l'utilisation de SH possédant des poids moléculaires beaucoup plus importants.

3.3.2 Fluorescence 3D des substances humiques

La figure 11 présente une MEEF caractéristique des SH utilisées dans cette étude. Dans les SH, il existe deux fluorophores majeurs identifiés F1 et F2.

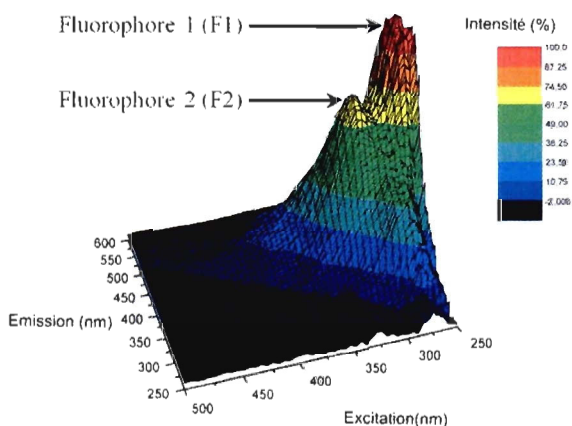


Figure 11 : Matrice d'excitation et d'émission de fluorescence (MEEF) caractéristique des substances humiques, présentant les fluorophores F1 et F2

Le tableau 10 compile les longueurs d'onde (λ) d'excitation et d'émission de chaque fluorophore, et les ratios des intensités de fluorescence F2/F1. Quelle que soit la nature ou l'origine des SH, le fluorophore F1 se situe vers une longueur d'onde d'excitation de 260 nm et présente une longueur d'onde d'émission de 450 nm. Pour le fluorophore F2, la longueur d'onde d'excitation est d'environ 320 nm et d'émission de 440 nm. Pour AHO, la longueur

d'onde d'excitation est vers 305 nm et la longueur d'onde d'émission vers 434 nm. Le ratio des intensités de fluorescence (F2/F1) possède la même valeur, 0.6, pour toutes les SH sauf pour les AHO où il est de 0.8. La fluorescence 3D des SH présente peu de données permettant de discriminer la composition chimique des SH utilisées. Il semble que les AHO soient légèrement différents des autres SH.

Tableau 10 : Fluorophores caractéristiques des substances humiques

	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
Fluorophore F1					
λ_{exc} (nm)	260	260	260	260	260
$\lambda_{ém}$ (nm)	450	450	450	450	450
Fluorophore F2					
λ_{exc} (nm)	315	320	320	320	305
$\lambda_{ém}$ (nm)	440	440	440	440	434
F2/F1					
Ratio de fluorescence	0.6	0.6	0.6	0.6	0.8

3.3.3 Absorbance

La mesure de l'absorbance des SH par spectrophotométrie UV-Visible permet de déterminer plusieurs éléments caractéristiques des SH. Le tableau 11 regroupe certains paramètres mesurés par spectrophotométrie UV-Visible. Les solutions utilisées pour obtenir ces paramètres ont la même concentration en SH (10 mg·L⁻¹).

La pente spectrale entre 305 nm et 265 nm des AFO et AFM est de 0.0127 nm⁻¹. Pour les AHM et des AHO, la pente spectrale est identique avec une valeur de 0.0099 nm⁻¹, tandis que pour les AHA, elle est de 0.0070 nm⁻¹. Ces données montrent que la composition chimique des SH est différente. Les mesures de poids moléculaires et de fluorescences n'ont pas permis de mettre cela en évidence. Le coefficient d'absorption à 375 nm (a_{375}) montre des valeurs très proches entre AFM et AFO et entre AHM et AHO. Pour les AF des rivières de la Côte-Nord, il est proche de 10 m⁻¹, tandis que pour les AH, il est aux alentours de 19 m⁻¹. La valeur du coefficient a_{375} des AHA est de 34 m⁻¹, soit le plus fort. À 280 nm, les AHA ont un coefficient d'absorption (a_{280}) de 81 m⁻¹, alors que pour les AHM il est de 56 m⁻¹ et de 59 m⁻¹ pour les AHO. Pour les AFM, il est de 36 m⁻¹ et de 39 m⁻¹ pour les AFO. Les différences de coefficients d'absorption (a_{280}) montrent que le contenu en composés aromatiques et

phénoliques varie selon les SH étudiées. Les AHA présentent le ratio E4/E6 le plus faible, soit de 4. Les ratios des AHM et AHO sont identiques avec une valeur de 8. Les AF possèdent les ratios les plus forts. Elles sont respectivement de 12 et 14 pour AFM et AFO. Ces données indiquent que la proportion de noyaux aromatiques est plus importante dans les AH que dans les AF. Les AHA ont l'indice SUVA le plus élevé avec une valeur de $10 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{C}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$. AHM et AHO ont un indice proche de $8 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{C}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$ et les AF de $5 \text{ L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{C}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$. Comme observé précédemment, ce sont les AHA qui ont le pourcentage d'aromaticité (%_{arom}) le plus élevé, évalué à 66 %. Les AHO sont légèrement plus aromatiques que les AHM. Les AHO ont un pourcentage d'aromaticité de 58 % et les AHM de 53 %. Les AFM et AFO ont un pourcentage d'aromaticité identique. Il est de 38 %. Les données de E4/E6, de SUVA et de %_{arom} indiquent une proportion importante de structures phénoliques et aromatiques dans les AH qui pourraient être susceptibles d'interagir avec les surfaces des microalgues.

Tableau 11 : Caractérisation des substances humiques par spectrophotométrie UV-Visible

	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
Pente spectrale nm^{-1} (305 à 265 nm)	0.0127	0.0127	0.0070	0.0099	0.0099
coefficient d'absorption à 375 nm (m^{-1})	9	10	34	18	20
coefficient d'absorption à 280 nm (m^{-1})	36	39	81	56	59
E4/E6 ¹	12	14	4	8	8
SUVA ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{C}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) ²	5	5	10	8	8
% aromaticité ³	38	38	66	53	58

¹E4/E6 : ratio de l'absorbance à 465 nm sur l'absorbance à 665 nm

²SUVA : Specific UV Absorbance : absorbance à 254 nm divisée par la concentration en DOC de l'échantillon

³relation provenant de Weishaar et al., 2003

3.3.4 Caractérisation des substances humiques par spectroscopie infrarouge

La figure 12 présente les spectres infrarouges des AF et des AH. En excluant la bande évasée dans la région $3000\text{-}3650 \text{ cm}^{-1}$, la figure 12 montre 11 bandes dominantes. Les bandes à 2930 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} sont associées à des élongations asymétriques et symétriques des liaisons CH_2 . Les groupements carboxyliques forment 3 bandes caractéristiques selon leurs formes chimiques : à 2600 cm^{-1} et 1710 cm^{-1} pour la forme acide ($-\text{COOH}$) et à 1610 cm^{-1} , pour la forme ionisée ($-\text{COO}^-$). Le cisaillement des CH_2 et CH_3 induit une bande vers 1460 cm^{-1} . La bande à 1380 cm^{-1} est due à la déformation des OH et à l'élongation des C-O, des CH_2 et des CH_3 . L'élongation des C-O provoque aussi une bande à 1200 cm^{-1} . La bande à

1030 cm^{-1} est due à la présence de polysaccharides et de carbohydrates. Les bandes à 830 cm^{-1} et 770 cm^{-1} correspondent à la déformation des groupements $=\text{CH}-$ présent dans les cycles aromatiques. Les AF, les AHA et les AHM ont des spectres assez semblables, toutefois, les proportions des différents groupements changent. Le spectre des AHO présente des différences dans la région comprise entre $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$.

Les onze bandes dominantes étudiées sont identifiées et leurs intensités compilées dans le tableau 12. Les AH possèdent plus de groupements alkyles que les AF. Ce sont les AHA qui présentent la plus forte proportion en alkyle, 31 % en intensité relative (20 % et 11 %). Pour les autres AH, l'intensité des alkyles est de 10 % (5 % et 5 %) pour les AHM et de 13 % (10 % et 3 %) pour les AHO. Pour AFM, l'intensité est de 3 % et pour les AFO, elle est de 6 %. Les groupements carboxyliques forment 3 bandes caractéristiques selon leurs formes chimiques, à 2600 et 1710 cm^{-1} , pour la forme acide ($-\text{COOH}$) et 1610 cm^{-1} , pour la forme basique ($-\text{COO}^-$). Afin d'estimer la quantité totale en groupements carboxyliques, les intensités relatives de ces bandes ont été additionnées. Les AF et les AH provenant de la Côte-Nord ont la plus grande proportion de ce groupement, avec 53 %, 60 %, 55 % et 52 % respectivement pour AFM, AFO, AHM et AHO. La proportion dans les AHA est nettement plus faible. L'intensité relative est de 34 %. Plusieurs groupements possédant de l'oxygène forment des bandes à 1380 cm^{-1} . Leurs proportions sont légèrement plus importantes dans les AF que dans les AH. Les SH sont aussi composées de polysaccharides et de carbohydrates. Ces composés forment deux bandes à 1200 cm^{-1} et 1030 cm^{-1} et la proportion de ces composés dans les SH est très semblable avec des valeurs proches de 25 %.

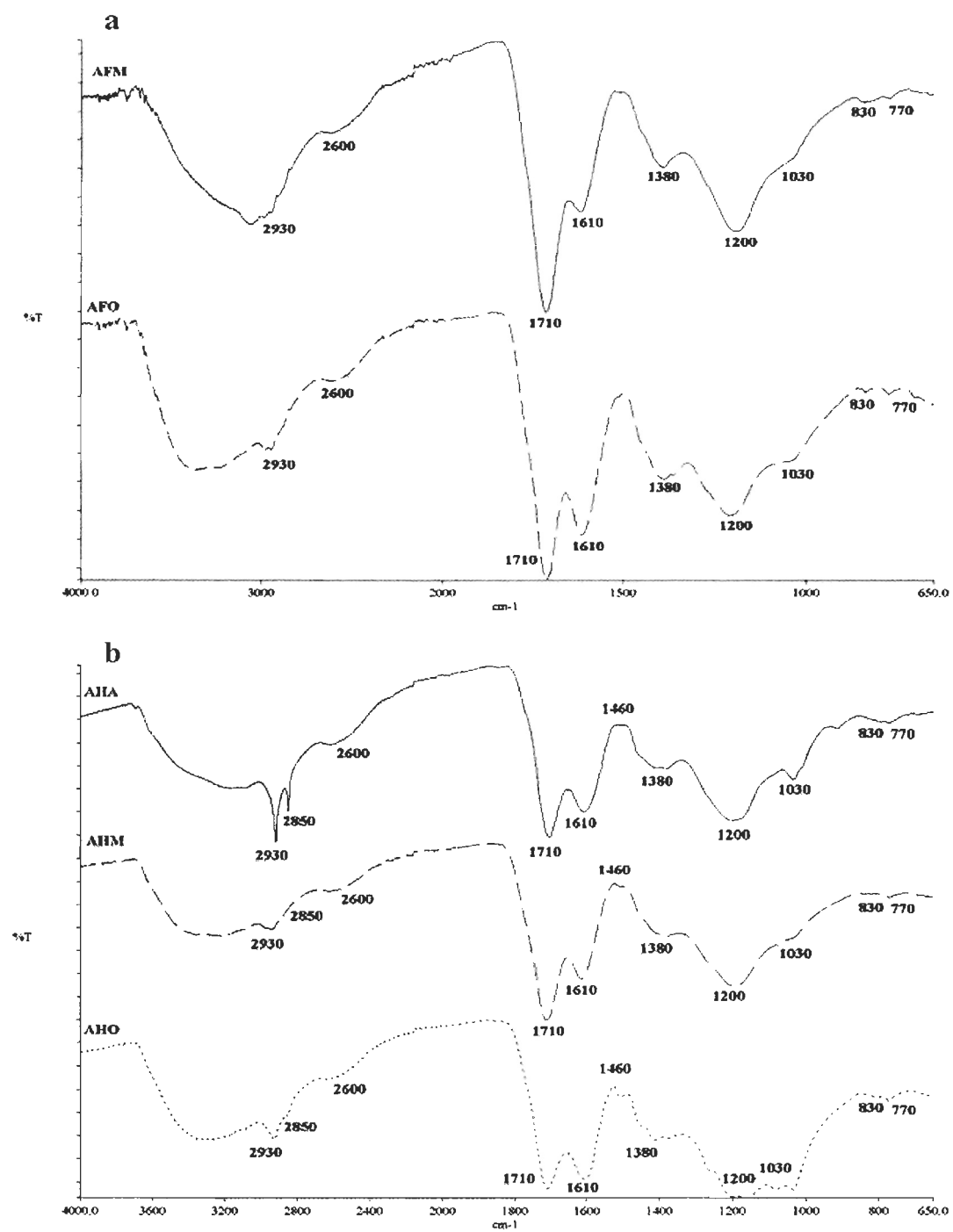


Figure 12 : Spectres infrarouges par réflectance totale atténuée des acides fulviques (a) et des acides humiques (b)

Tableau 12 : Attribution des bandes des spectres infrarouges des substances humiques, à des fonctions chimiques, des composés (Madari *et al.*, 2006; Senesi *et al.*, 2003; Tatzber *et al.*, 2007; Vergnoux *et al.*, 2011)

Longueur d'onde cm ⁻¹	Vibration impliquée	Groupe chimique	Composé chimique	AFM en % ³	AFO en % ³	AHA en % ³	AHM en % ³	AHO en % ³
2930 (2995-2875)	Élongation asymétrique CH ₂	Alkyles	Lipides, Acides gras	3	6	20	5	10
2850 (2875-2840)	Élongation symétrique CH ₂	Alkyles	Lipides, Acides gras	nd	nd	11	5	3
2600 (2675-2460)	Élongation –OH Des COOH	Carboxyles	Acides gras, Protéines	3	3	2	3	3
1710 (1750-1660)	Élongation –COOH ¹	Carboxyles	Acides gras, Protéines	36	32	20	30	26
1610 (1660-1550)	Élongation –COO ⁻²	Carboxylates	Acides gras, Protéines	16	26	10	22	21
1460 (1480-1440)	Cisaillement CH ₂ et CH ₃	Alkyles	Lipides, Acides gras	1	2	4	3	5
1380 (1440-1340)	Déformation OH et élongation C–O, CH ₃ et CH ₂	Carboxyles, Alcools, Phénols,	Acides gras, Protéines, Lignine	7	7	3	4	4
1200 (1340-1060)	Élongation C–O	Alcool Éther Phénol	Polysaccharide, Carbohydate, Lignine	27	18	20	23	17
1030 (1060-1000)	nd	nd	Polysaccharide, Carbohydate	2	2	5	3	7
830 (860-710)	Déformation =CH– des aromatiques	Cycle aromatique	Lignine, Lipides	2	2	2	nd	nd
770 (860-710)	Déformation =CH– des aromatiques	Cycle aromatique	Lignine, Lipides	3	2	3	2	4

¹ vibration des groupements carboxyliques protonés.

² vibration des groupements carboxyliques ionisés.

³ : % calculés en faisant la somme des intensités et sans tenir compte du coefficient d'adsorptivité molaire de chaque groupement fonctionnel

3.4 Effets du pH

Dans les sections précédentes, la caractérisation chimique des microalgues et des SH a montré la présence de nombreux groupements chimiques pouvant interagir entre eux. Selon le pH, certains de ces groupements chimiques présents chez les microalgues et chez les SH vont être chargés ou non. Cette différence peut moduler la sorption.

3.4.1 Quantités sorbées

Les tableaux 13 et 14 présentent les valeurs moyennes des quantités sorbées par Iso (tableau 13) et par Nanno (tableau 14) selon le pH, à 25 PSU et à une concentration de 2.5 mg L^{-1} pour toutes les SH sauf AHO à 1.25 mg L^{-1} .

Les quantités d'AF sorbées par Iso sont très semblables à pH 4 et à pH 8 (tableau 13), avec des valeurs comprises entre 5.0 et 6.7 mg m^{-2} . À pH 6, les quantités sorbées, comprises entre 10 et 16 mg m^{-2} , sont beaucoup plus fortes. Pour les AH, l'effet du pH est très marqué, avec des quantités sorbées variant de 0.7 mg m^{-2} , à pH 6, à 24 mg m^{-2} à pH 8. Les AF sorbent le plus à pH 6 alors qu'à pH 8 la sorption est minimale, tandis que pour les AH c'est inversé.

Tableau 13 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par *Isochrysis galbana* à différents pH et à 25 PSU

	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] mg L^{-1}	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
pH 4	$6.7 \pm 41 \%$	$6.7 \pm 34 \%$	$5.3 \pm 24 \%$	$15 \pm 15 \%$	$4.9 \pm 34 \%$
pH 6	$16 \pm 25 \%$	$10 \pm 27 \%$	$0.7 \pm 72 \%$	$4.0 \pm 55 \%$	$0.8 \pm 38 \%$
pH 8	$5.5 \pm 21 \%$	$5.0 \pm 28 \%$	$20 \pm 29 \%$	$24 \pm 10 \%$	$18 \pm 19 \%$

Les quantités d'AF et d'AH sorbées par Nanno varient de 1.3 à 16 mg m^{-2} (tableau 14). En considérant les coefficients de variation, les quantités d'AFM sorbées par Nanno à pH 4 et 8 sont semblables. La sorption des AFM est maximale à pH 6 alors que pour les AFO c'est à pH 8. Pour les AH, les quantités sorbées maximales sont à pH 4 et sont minimales à pH 6. Seuls les AHO présentent des quantités sorbées semblables à pH 4

et 8. L'ensemble des données sur les quantités sorbées montre que le pH, à 25 PSU, affecte significativement la sorption, et cela d'une façon très complexe.

Tableau 14 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par *Nannochloropsis oculata* à différents pH et à 25 PSU

	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] mg L^{-1}	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
pH 4	$1.3 \pm 49 \%$	$1.5 \pm 31 \%$	$13 \pm 17 \%$	$16 \pm 21 \%$	$6.3 \pm 13 \%$
pH 6	$14 \pm 43 \%$	$4.4 \pm 28 \%$	$3.0 \pm 23 \%$	$4.9 \pm 17 \%$	$1.6 \pm 59 \%$
pH 8	$4.1 \pm 56 \%$	$6.8 \pm 12 \%$	$8.0 \pm 40 \%$	$5.9 \pm 45 \%$	$7.1 \pm 33 \%$

3.4.2 Constante de distribution

La constante de distribution, K_d , est le rapport entre les concentrations sorbées par les microalgues et les concentrations de SH dissoutes demeurant en solution. Le K_d permet de quantifier l'équilibre chimique, car si les valeurs sont inférieures à 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) les SH ont une forte affinité pour le solvant ou le milieu réactionnel alors que si les valeurs sont supérieures à 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$), les SH ont une affinité pour la surface du sorbant constitué de microalgues dans cette étude. Comme le montre le tableau 15, les valeurs de K_d mesurées pour les AH présentent des différences plus importantes pour Iso que pour Nanno. Pour les AF, les variations sont plus élevées pour Nanno que pour Iso.

Pour Iso, les K_d des AF les plus faibles sont à pH 8, avec des valeurs proches de 2 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). Les K_d les plus élevées sont à pH 6 avec des valeurs comprises entre 4.2 et 6.3 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). Les affinités des AF pour Iso semblent présenter un schéma du type : $\text{pH } 8 < \text{pH } 4 \leq \text{pH } 6$. Pour les AH, les K_d à pH 6 sont proches de 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$), alors qu'à pH 8, elles sont supérieures à 10 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$), et présentent la tendance suivante : $\text{pH } 6 < \text{pH } 4 < \text{pH } 8$. Les valeurs des K_d montrent que les affinités des AH, envers Iso, sont fortement influencées par le pH, alors que pour les AF l'influence du pH semble moins marquée.

Pour Nanno, les valeurs de K_d des AF sont inférieures à 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) à pH 4, mais supérieures à 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) aux autres pH. Les valeurs des K_d les plus élevées se situent à pH 6 pour AFM et à pH 8 pour AFO respectivement de 6.6 et

3.0 ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Il semble que les AFM aient une affinité plus marquée pour Nanno que les AFO. Pour les AH, les K_d à pH 6 et à pH 8 sont assez proches, avec des valeurs comprises entre 1.5 et 3.7 ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). À pH 4, les valeurs de K_d sont maximales et varient entre 5.4 à 8.0 ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) selon les AH étudiés.

Tableau 15 : Valeurs de K_d ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-2}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) des substances humiques, à 25 PSU, pour *Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis oculata*, selon le pH

<i>Isochrysis galbana</i>					
	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
pH 4	3.6±13 %	3.7±15 %	6.2±28 %	7.1±11 %	4.7±29 %
pH 6	6.3±38 %	4.2±39 %	0.7±62 %	1.6±15 %	1.0±39 %
pH 8	2.2±17 %	1.8±12 %	17±32 %	11±3 %	20±15 %
<i>Nannochloropsis oculata</i>					
	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
pH 4	0.6±10 %	0.7±20 %	8.0±20 %	6.7±28 %	5.4±17 %
pH 6	6.6±36 %	1.7±24 %	1.6±24 %	2.3±18 %	1.5±49 %
pH 8	2.5±27 %	3.0±12 %	2.2±26 %	1.5±26 %	3.7±20 %

Les affinités des AF présentent de plus grandes variations pour Nanno que pour Iso. Pour les AH, des milieux acides (pH 4) ou basiques (pH 8) augmentent les affinités pour les microalgues, alors que des pH proches de 6 diminuent cette affinité pour le sorbant.

3.5 Effets de la salinité

Un changement de salinité induit un changement de force ionique et de concentrations en ions. Ces fluctuations peuvent modifier la charge de certains groupements chimiques présents chez les microalgues et les SH et modifier la conformation spatiale des SH, il est probable que cela ait un effet sur la sorption.

3.5.1 Quantités sorbées

Les tableaux 16 et 17 présentent les valeurs moyennes des quantités sorbées par Iso (tableau 16) et par Nanno (tableau 17) selon la salinité, à pH 8 et à une concentration de 2.5 mg L^{-1} pour toutes les SH sauf AHO à 1.25 mg L^{-1} .

Lorsque les salinités passent de 15 à 35 PSU, les quantités d'AF sorbées sur Iso varient entre 2.1 et 6.4 mg m^{-2} (tableau 16). En considérant les coefficients de variation, les quantités d'AF sorbées à 15 et 25 PSU sont semblables. Lorsque la salinité passe de 25 à 35 PSU, les quantités sorbées sont presque divisées par 2, aussi bien pour les AFM que pour les AFO. Les quantités d'acides humiques accumulées sur Iso sont comprises entre 2.2 et 24 mg m^{-2} pour des salinités variant de 15 à 35 PSU. À 15 et 35 PSU, les quantités d'AH sorbées sont inférieures à 10 mg m^{-2} , sauf pour les AHM à 15 PSU. La salinité de 25 PSU présente une sorption des AH substantiellement plus forte, environ 2 fois plus de quantités sorbées qu'aux autres salinités. Cette tendance nette est indépendante de la source des AH.

Tableau 16 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par *Isochrysis galbana* à différentes salinités et à pH 8

	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] mg L^{-1}	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
15 PSU	$6.4 \pm 22 \%$	$5.5 \pm 43 \%$	$2.2 \pm 47 \%$	$14 \pm 7 \%$	$3.9 \pm 16 \%$
25 PSU	$5.5 \pm 21 \%$	$5.0 \pm 28 \%$	$20 \pm 29 \%$	$24 \pm 10 \%$	$18 \pm 19 \%$
35 PSU	$2.1 \pm 44 \%$	$2.5 \pm 51 \%$	$8.3 \pm 58 \%$	$9.5 \pm 54 \%$	$5.6 \pm 70 \%$

Les quantités d'AF sorbées par Nanno à 15 et 25 PSU sont comprises entre 3.3 mg m^{-2} et 6.8 mg m^{-2} (tableau 17). À 35 PSU, les quantités sorbées sont inférieures à 1 mg m^{-2} . En prenant en compte les coefficients de variation, les quantités d'AFM sorbées à 15 et 25 PSU sont semblables, alors que pour les AFO, elles semblent différentes. Les quantités d'AH sorbées varient avec la salinité. Elles sont comprises entre un minimum de 1.6 mg m^{-2} pour AHO et un maximum de 9.4 mg m^{-2} pour AHM. Les valeurs maximales sont comprises entre 7.1 et 9.4 mg m^{-2} . Pour les différents AH, la sorption maximale se situe à 25 PSU pour les AHA et les AHO, mais à 35 PSU pour les AHM.

Tableau 17 : Quantités moyennes sorbées (mg m^{-2}) par *Nannochloropsis oculata* à différentes salinités et à pH 8

	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] mg L^{-1}	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
15 PSU	$3.3 \pm 13 \%$	$3.9 \pm 10 \%$	$5.1 \pm 30 \%$	$8.1 \pm 46 \%$	$1.6 \pm 73 \%$
25 PSU	$4.1 \pm 56 \%$	$6.8 \pm 12 \%$	$8.0 \pm 28 \%$	$5.9 \pm 45 \%$	$7.1 \pm 33 \%$
35 PSU	$0.8 \pm 39 \%$	$1.0 \pm 40 \%$	$2.3 \pm 17 \%$	$9.4 \pm 5 \%$	$2.9 \pm 37 \%$

3.5.2 Constante de distribution

Comme pour l'effet du pH, Iso présente des K_d plus élevées et des écarts dans les valeurs de K_d plus importants que pour Nanno, comme le décrit le tableau 18. Les AF présentent des affinités assez faibles pour Iso, avec une variation des K_d de 0.8 à 2.5 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). Les K_d des AF pour Iso sont maximales et du même ordre de grandeur à 15 et 25 PSU, mais proche de 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) à 35 PSU. La salinité ne semble pas avoir d'effets très importants sur les affinités des AFO pour Iso, car les K_d mesurées aux différentes salinités sont similaires en tenant compte des coefficients de variation. Les AH ont une affinité très nette pour Iso à 25 PSU avec des valeurs de K_d comprises entre 11 et 20 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). Les K_d les plus faibles sont à 15 PSU pour AHA et AHO, les valeurs varient de 1.7 à 3.1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). Pour les AHM, les K_d à 15 et 35 PSU sont semblables, avec des valeurs proches de 6 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$).

Les K_d obtenues pour Nanno présentent des valeurs montrant moins de variations que les valeurs observées pour Iso. Les affinités les plus fortes des AF pour Nanno se situent à 25 PSU, avec des valeurs proches de 3 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). À 35 PSU, les AF ont plus d'affinité avec le solvant qu'avec Nanno, car les K_d sont inférieures à 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). Selon l'origine des AH, les affinités maximales ne sont pas à la même salinité, mais présentent des valeurs proches de 4 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$). L'affinité la plus forte se situe à 15 PSU pour les AHA, mais à 35 PSU pour les AHO. Les AHM ont l'affinité la plus forte pour Nanno à 15 et 35 PSU. Les valeurs de K_d les plus faibles varient entre 0.7 et 1.7 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$), mais ne sont pas aux mêmes salinités selon les SH. Pour les AHA c'est à 35 PSU, pour les AHM à 25 PSU et pour les AHO à 15 PSU. Il semblerait que la salinité et l'origine des AH influencent les affinités.

Tableau 18 : Valeurs de K_d ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) de chaque SH, à pH 8, pour *Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis oculata*, selon la salinité

<i>Isochrysis galbana</i>					
	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] mg L^{-1}	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
15 PSU	2.5±30 %	1.6±48 %	1.7±26 %	6.2±9 %	3.1±20 %
25 PSU	2.2±17 %	1.8±12 %	17±32 %	11±3 %	20±15 %
35 PSU	0.8±57 %	1.1±23 %	8.8±63 %	5.9±51 %	8.6±71 %
<i>Nannochloropsis oculata</i>					
	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
[SH] mg L^{-1}	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25
15 PSU	1.4±12 %	1.7±9 %	3.6±15 %	4.0±4 %	0.7±63 %
25 PSU	2.5±27 %	3.0±12 %	2.2±26 %	1.5±26 %	3.7±20 %
35 PSU	0.4±29 %	0.6±17 %	1.7±14 %	4.3±4 %	3.1±16 %

Généralement, les K_d des AF présentent des valeurs semblables à 15 et 25 PSU, ce qui se traduit en une affinité plus marquée pour les cellules microalgales, à ces salinités qu'à 35 PSU. À 35 PSU, les valeurs de K_d sont inférieures à 1 ($\text{mg m}^{-2}/\text{mg L}^{-1}$) aussi bien pour Iso que pour Nanno. Chez les AH, l'affinité est maximale à 25 PSU pour Iso, alors que pour Nanno l'affinité maximale ne se situe pas à la même salinité selon leurs origines.

3.6 Effets de la concentration

3.6.1 Quantités sorbées

Une série limitée d'expériences a été réalisée pour étudier la variation des quantités sorbées en fonction de la concentration en SH. Le tableau 19 compile les quantités sorbées en fonction de la concentration en SH selon le type de microalgues et selon le pH. À pH 6, l'étude des effets de la concentration en AF sur la sorption par Iso montre que plus la concentration augmente moins la sorption semble être forte. Toutefois, en considérant les coefficients de variation, une augmentation de la concentration en AFM ne semble pas influencer les quantités sorbées, qui sont comprises entre 12 mg m^{-2} et 16 mg m^{-2} . Pour les AFO, les quantités sorbées diminuent de 10 mg m^{-2} à 4.0 mg m^{-2} .

Pour des concentrations de 5 et 10 mg L⁻¹, les quantités sorbées sont du même ordre de grandeur.

Tableau 19 : Quantités de substances humiques (mg m⁻²) sorbées par les microalgues *Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis oculata* selon la concentration initiale en SH dans le milieu, à 25 PSU et à différents pH

[SH] mg L ⁻¹	<i>Isochrysis galbana</i>		<i>Nannochloropsis oculata</i>				
	pH 6		pH 6			pH 8	
	AFM	AFO	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
1.25	nd ¹	nd ¹	nd ¹	nd ¹	nd ¹	nd ¹	7.1±33 %
2.5	16±25 %	10±27 %	14±43 %	4.4±28 %	3.0±23 %	5.9±45 %	1.4±38 %
5	16±53 %	4.0±56 %	30±42 %	5.7±37 %	4.2±57 %	1.3±45 %	1.2±73 %
10	12±49 %	5.9±32 %	39±53 %	8.4±25 %	6.1±35 %	3.2±19 %	nd ¹

¹nd : non déterminé

Pour Nanno, l'effet de la concentration est différent à pH 6, par rapport à Iso (tableau 19). Une augmentation de la concentration de 2.5 à 10 mg L⁻¹ entraîne une augmentation des quantités sorbées. Elles varient entre 14 à 39 mg m⁻² pour les AFM, entre 4.4 à 8.4 mg m⁻² pour les AFO et pour les AHA, entre 3.0 à 6.1 mg m⁻². À pH 8, ce phénomène est inversé pour les AH.

3.6.2 Constantes de distribution

Le tableau 20 présente les valeurs de la constante de distribution observées pour Iso et Nanno à une salinité de 25 PSU, à différentes concentrations et plusieurs pH. À pH 6, les K_d pour Iso ont tendance à diminuer lorsque la concentration en AF augmente. La même tendance est observée pour Nanno aussi bien à pH 6 qu'à pH 8. Plus la concentration en SH augmente, plus les K_d diminuent et peuvent même atteindre des valeurs inférieures à 1 (mg m⁻²/mg L⁻¹) montrant que les SH demeurent préférentiellement en solution. Ainsi, les SH présentent de fortes affinités (K_d>1 (mg m⁻²/mg L⁻¹)) pour les

microalgues, lorsque les concentrations sont de l'ordre de 1 à 2.5 mg·L⁻¹ soit des concentrations naturellement observées dans les estuaires.

Tableau 20 : Valeurs de Kd (mg·m⁻²/mg·L⁻¹) moyen pour les deux microalgues selon la concentration et à différents pH, pour une salinité de 25 PSU

SH mg·L ⁻¹	<i>Isochrysis galbana</i>		<i>Nannochloropsis oculata</i>				
	pH6		pH6			pH8	
	AFM	AFO	AFM	AFO	AHA	AHM	AHO
1.25	nd ¹	nd ¹	nd ¹	nd ¹	nd ¹	nd ¹	3.7±20 %
2.5	6.3±38 %	4.2±39 %	6.6±36 %	1.7±36 %	1.6±24 %	1.5±26 %	0.8±30 %
5	2.2±40 %	1.1±17 %	5.6±42 %	0.8±30 %	1.0±49 %	0.3±44 %	0.4±29 %
10	1.1±13 %	0.8±26 %	4.1±54 %	0.6±26 %	0.7±45 %	0.4±12 %	nd ¹

¹nd : non déterminé

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1 Cinétiques de sorption

L'analyse des cinétiques de sorption montre que les quantités sorbées évoluent dans le temps. Comme l'illustre la figure 9, les quantités sorbées augmentent, puis au bout d'un certain temps, les quantités sorbées demeurent stables, ce qui traduit l'atteinte d'un état stationnaire. Dans toutes les expériences de sorption, il s'est développé un état stationnaire. Une fois l'état stationnaire atteint, pour simplifier la description du système, il est considéré comme étant en pseudoéquilibre (Calvet *et al.*, 2005; Limousin *et al.*, 2007), ce qui permet de calculer des quantités sorbées moyennes et des coefficients de distribution. Selon la microalgue étudiée, le temps pour atteindre l'état stationnaire diffère, il est de 5 min pour Iso, mais d'environ 60 min pour Nanno. La sorption est un phénomène thermodynamiquement favorisé (Somorjai, 1994). Cela indique qu'elle devrait être spontanée autant pour Iso que pour Nanno. Les variations de temps observées pour atteindre l'état stationnaire indiquent que l'accessibilité et/ou la facilité qu'ont les composés dissous à s'approcher des sites de sorption peuvent différer selon la microalgue étudiée. Pour comprendre les variations, il faut examiner la nature des surfaces des microalgues afin de mieux concevoir les mécanismes permettant le rapprochement, l'adhésion et la réaction des SH avec les microalgues.

À l'état stationnaire, à 25 PSU et pH 8, Iso sorbe plus que Nanno avec respectivement $24 \pm 10 \text{ \% mg m}^{-2}$ et $5.9 \pm 45 \text{ \% mg m}^{-2}$ d'AHM sorbé. Les quantités de SH sorbées dans cette étude présentent des valeurs similaires aux données de sorption publiées pour des microalgues de milieux dulcicoles. Quelques données connues sont comprises entre 9 et 27 mg m^{-2} (Campbell *et al.*, 1997) ou entre 0.6 et 31 mg m^{-2} (Knauer et Buffle, 2001). Les variations observées dans les quantités sorbées d'AHM peuvent résulter de plusieurs causes. Le nombre total de sites de sorption peut varier d'une microalgue à une autre. Ainsi Iso aurait plus de sites de sorption de même nature que Nanno. Une explication alternative serait que les deux microalgues aient différents sites d'interactions n'ayant pas la même affinité de sorption. Ainsi, les microalgues auraient des sites de natures différentes.

La figure 9 présente spécifiquement la sorption des AHM, à une concentration de 2.5 mg L^{-1} , un pH de 8 et une salinité de 25 PSU. Les annexes VI à XI présentent l'ensemble des autres résultats expérimentaux pour toutes les SH étudiées à différents pH et salinités. Tous les résultats obtenus présentent les mêmes tendances que celles présentées à la figure 9. Pour une même microalgue, l'état stationnaire n'est pas toujours atteint au même moment. Selon les SH étudiées, le pH et la salinité, les quantités sorbées fluctuent, mais les valeurs sont toujours comprises dans les gammes indiquées précédemment.

Les différences observées dans les cinétiques de sorption suggèrent que les interactions entre les microalgues et les SH varient. Dans le domaine marin, cela signifie que selon les communautés microalgales présentes, ainsi que l'origine et la nature des SH et les conditions physico-chimiques du milieu, la sorption variera. Il est important de comprendre les causes de ces fluctuations et de découvrir s'il existe des tendances qui peuvent être expliquées par des mécanismes physico-chimiques simples.

4.2 Effets des microalgues

La taille des microalgues pourrait affecter le processus de sorption. Si l'on considère la surface des cellules microalgales, Iso est plus grande que Nanno avec des surfaces respectivement de $104 \mu\text{m}^2$ et de $29 \mu\text{m}^2$. Iso a une surface 3.7 fois plus grande que Nanno. Si les surfaces des microalgues étudiées sont considérées comme lisses et de composition chimique identique, alors la taille des microalgues est un paramètre important à étudier. En effet, la surface déterminerait le nombre total de sites d'interactions possibles entre une microalgue et des substances dissoutes se rapprochant de cette surface. Si la taille, et donc la surface exposée, est un facteur influençant fortement la sorption, la différence de sorption entre les deux microalgues serait d'environ 3.7, quelles que soient les SH étudiées et les conditions physico-chimiques du milieu. Cela signifie qu'Iso pourrait avoir 3.7 fois plus de sites d'interaction où l'adhésion des SH et des composés organiques dissous s'effectuerait.

Pour que la sorption soit gouvernée par la surface des cellules, il faudrait que cette surface soit lisse et qu'elle possède, proportionnellement, le même nombre de sites d'interactions ou encore que les surfaces soient irrégulières, mais similaires en toute

proportion. Ces hypothèses sont peu probables, car chez les microalgues quatre types de surface cellulaire existent selon Barsanti et Gualtieri (2006). Certaines microalgues ont une membrane cellulaire directement en contact avec le milieu, ce qui indique que la bicouche lipidique est directement en contact avec le milieu, alors que d'autres possèdent une paroi cellulaire (Barsanti et Gualtieri, 2006). Certaines parois cellulaires peuvent être composées de vésicules contenant du matériel intracellulaire comme les plaques cellulotiques des dinoflagellés (Barsanti et Gualtieri, 2006) ou les algaenans présents chez Nanno (Gelin *et al.*, 1997). D'autres parois cellulaires sont composées de matériels extracellulaires comme les frustules de diatomées ou les plaques calcaires des coccolithophoridés (Barsanti et Gualtieri, 2006). Un dernier type de paroi cellulaire composé de matériels intracellulaires et extracellulaires existe, surtout chez les *Euglenophyta* et les *Cryptophyta* (Barsanti et Gualtieri, 2006). Ces différences de composition chimique des surfaces microalgales exposées au milieu réactionnel peuvent influencer sur la sorption. Il y a donc un effet chimique participant à la régulation de la sorption.

Pour rechercher un effet chimique, les microalgues ont été caractérisées par spectrométrie FTIR. Afin de pouvoir comparer les spectres infrarouges, les données ont été traitées et normalisées pour les groupements fonctionnels associés aux dix bandes présentées dans la figure 10. L'étude des spectres infrarouges montre que les microalgues sont composées des mêmes groupements chimiques (Dean *et al.*, 2008; Domenighini et Giordano, 2009; Giordano *et al.*, 2001; 2009), comme l'indique la figure 10, mais leurs proportions varient, comme le montre le tableau 8. Les bandes caractéristiques de certains groupements fonctionnels permettent de suggérer la présence de certains composés (Dean *et al.*, 2008; Giordano *et al.*, 2001; Quilès *et al.*, 2010) de même que leurs localisations dans les cellules (Quilès *et al.*, 2010), comme l'indique le tableau 8. Les deux microalgues possèdent des groupements alkyles, indiqués par les deux bandes à 2930 et 2850 cm^{-1} caractéristiques des lipides et des acides gras composant les membranes (Dean *et al.*, 2008; Quilès *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent qu'Iso possède plus de lipides que Nanno, avec respectivement 56 % et 40 % de l'intensité totale des signaux infrarouges. Cela suggère un plus grand nombre de sites de sorption hydrophobes associés à la présence de lipides et d'acides gras. Le tableau 8 indique que les deux microalgues possèdent des groupements esters dans leurs membranes, car la présence de ces groupements produit une bande à 1735 cm^{-1} . Nanno (8 %) en possède plus qu'Iso

(4 %). Ceci suggère que Nanno possède plus de sites de sorption polaires liés aux esters. Iso et Nanno présentent aussi une grande quantité de groupements associés à des protéines que l'on peut relier aux bandes à 1650, 1530 et 1460 cm^{-1} . Ces bandes représentent 37 % de l'intensité totale des bandes infrarouges étudiées chez Nanno et 28 % chez Iso. Ces composés seraient localisés dans les membranes, le cytoplasme, les flagelles et les ribosomes (Quilès *et al.*, 2010). Si les protéines sont des sites d'interactions accessibles pour des SH se situant à proximité des surfaces microalgales, elles pourraient interagir par la formation de liaisons hydrogène et des interactions polaires. Des interactions ioniques seraient même possibles si le pH du milieu réactionnel permet l'ionisation des protéines et/ou des SH. Le tableau 8 indique que les groupements associés aux carboxyles, aux éthers et au phosphore organique (peu présent) seraient en proportion semblables chez les deux microalgues. Ces groupements peuvent former des liaisons hydrogène avec d'autres molécules ou interagir par des interactions électrostatiques impliquant le doublet d'électrons libres des atomes d'oxygène. Les groupements cétones, des groupements aldéhydes et des groupements éthers présents dans les membranes, les parois cellulaires et les inclusions de stockage forment une bande à 1035 cm^{-1} et seraient légèrement plus important pour Nanno que pour Iso, avec respectivement 10 % et 8 %. La proportion exacte de chaque type de groupement composant cette bande n'est pas connue. Toutefois, certaines classes microalgales, comme les *Eustigmatophyceae* dont la microalgue Nanno fait partie, produisent des algaenans (Gelin *et al.*, 1997). Ces substances présentent des structures composées de chaînes alkyles contenant 28 à 34 atomes de carbones liés par des groupements éthers (Gelin *et al.*, 1996; 1997, 1999; Leeuw *et al.*, 2006). Ces composés se situent dans des structures en feuilles trilamellaires de 10 à 30 nm d'épaisseur (Derenne *et al.*, 1992; Gelin *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 1996; 1999) et se retrouvent à la périphérie des parois cellulaires (Allard et Templier, 2000). Ces substances contribuent à rendre résistantes les parois cellulaires à la dégradation (Gelin *et al.*, 1997; Largeau *et al.*, 1986; de Leeuw et Largeau, 1993; de Leeuw *et al.*, 2006). Ainsi, la présence d'algaenans dans la paroi cellulaire de Nanno pourrait conditionner la sorption des SH sur cette microalgue. Les algaenans sont des composés peu polaires, car elles possèdent de longues chaînes alkyles (Gelin *et al.*, 1996; 1997; 1999; de Leeuw *et al.*, 2006), ce qui favoriserait le développement d'interactions hydrophobes entre la paroi cellulaire de Nanno et les SH. Par ailleurs, la composition chimique de ces composés hydrophobes les rend peu sensibles aux changements de pH ou de salinité. La présence de groupements éthers dans

les algaenans (Gelin *et al.*, 1997; de Leeuw *et al.*, 2006), permet la formation de liaisons hydrogène. Des interactions de van der Waals, des interactions hydrophobes, des interactions électrostatiques et des liaisons hydrogènes pourraient se former lors de la sorption des SH par les cellules de Nanno.

L'utilisation de la spectroscopie FTIR présente des limites pour caractériser les surfaces cellulaires. En effet, les rayons infrarouges pénètrent dans les premiers micromètres de l'échantillon (Skoog *et al.*, 2003). Pour des cellules microalgales de quelques micromètres de diamètre comme Nanno ou Iso, les rayons infrarouges interagissent avec les parois ou les membranes cellulaires, mais peuvent aussi interagir avec une partie du contenu cellulaire. Les informations obtenues par la spectroscopie FTIR concernent alors les substances constituant les parois, mais aussi les substances présentes à l'intérieur des cellules. Ceci limite l'interprétation des signaux infrarouges concernant la composition précise des surfaces cellulaires. Toutefois, les données de FTIR permettent tout de même une introspection de la nature des surfaces cellulaires.

D'après Zhu et Lee (1997), Iso ne possède pas de paroi cellulaire, ce qui signifie que la membrane cellulaire d'Iso serait directement en contact avec le milieu. Les composants de la membrane plasmique : les phospholipides, les protéines et les sucres présents dans la bicouche lipidique (Alberts *et al.*, 2010; Karp et Bouharmont, 2010) pourraient servir de sites d'interactions avec les SH. Les composés de la membrane cellulaire d'Iso (tableau 8) possèdent des groupements alkyles ($-CH_2$), hydroxyles ($-OH$), carboxyles ($-COOH$) et amines ($-NH_n$). La présence des groupements alkyles associés aux phospholipides permettrait la formation d'interactions hydrophobes entre les SH et les surfaces des cellules d'Iso. Les groupements carboxyles, hydroxyles et amines sont des groupements polaires susceptibles de s'ioniser selon le pH, car ils peuvent perdre ou accepter un proton (H^+). De plus, les ions présents dans le milieu peuvent interagir avec ces groupements. Ces groupements pourraient permettre la formation d'interactions de van der Waals, d'interactions électrostatiques et la formation de liaisons hydrogène tandis que les alkyles permettraient la formation d'interactions hydrophobes et de van der Waals entre les SH et les cellules d'Iso. La présence de protéines sur les surfaces cellulaires d'Iso pourrait permettre des interactions entre les SH et les microalgues, car selon Wootton *et al.* (2007), les lectines, qui sont des glycoprotéines présentes sur les surfaces cellulaires microalgales, sont connues pour être des sites de sorption de certains sucres comme le mannose.

L'analyse des quantités sorbées montre qu'Iso sorbe généralement plus que Nanno, comme à 25 PSU et pH 8, où Iso sorbe 24 mg m^{-2} d'AHM alors que Nanno n'en sorbe que 5.9 mg m^{-2} . En faisant un ratio des quantités d'AHM sorbées d'Iso sur celles de Nanno, une valeur de 4.1 est obtenue, comme le montre le tableau 9. Cette valeur est très proche du ratio des surfaces (3.7). Toutefois, l'analyse de ce ratio pour les autres SH, à 25 PSU et pH 8, présente des valeurs nettement différentes du ratio des surfaces, comme le montre le tableau 9. Des valeurs proches de 1 sont même observées, ce qui signifie que Nanno peut sorber autant qu'Iso sous certaines conditions. Ces variations indiquent que l'effet physique, dû à la différence de taille, n'est pas le facteur influençant le plus la sorption. D'autres facteurs interviennent. Les données de FTIR ont montré que les microalgues étudiées possèdent des groupements chimiques en différentes proportions. Ces groupements pourraient interagir différemment selon les conditions physico-chimiques du milieu réactionnel. De plus, le tableau 9 montre que pour une même microalgue des variations du ratio sont observées si la nature des SH change. Les rapports des AF sont différents de ceux des AH, ce qui suggère que la nature chimique des agrégats qui approchent les surfaces microalgales pourrait affecter l'adhésion des SH sur les microalgues. Ces données montrent l'importance de facteurs chimiques dans les phénomènes de sorption.

4.3 Effets de la nature des substances humiques

Il est clair que des effets chimiques peuvent moduler le rapprochement, l'adhésion et les réactions des SH proches des surfaces cellulaires comme les données de spectroscopie FTIR sur les microalgues le laissent croire. En effet, la présence de divers groupements chimiques dans les parois ou membranes cellulaires des microalgues peut produire des interactions variées avec les molécules organiques (Campbell *et al.*, 1997; Knauer et Buffle, 2001; Vigneault *et al.*, 2000; Wootton *et al.*, 2007). Toutefois, quelles caractéristiques structurales et chimiques des SH pourraient être utiles pour comprendre les interactions qui se développent entre les microalgues et les SH?

Les poids moléculaires mesurés montrent peu de différences entre les AF et entre les AH (section 3.3.1) et sont autour de 1350 Da pour les AF et autour de 1600 Da pour les AH. Ces poids moléculaires sont dans la gamme des masses rapportées pour les SH des eaux douces (MacCarthy, 2001; Perdue et Ritchie, 2003) et sont similaires aux

poids moléculaires des AF et des AH isolés de la rivière Suwannee (Chin *et al.*, 1994; Leenheer, 2009) utilisés dans les expériences de sorption des SH sur des microalgues d'eau douce (Campbell *et al.*, 1997; Knauer et Buffle, 2001; Vigneault *et al.*, 2000). Un paradigme courant dans la description des SH indique que ces agrégats dissous sont trop gros pour interagir et adhérer sur les organismes (Lutz *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*, 2008). Les données de cette recherche montrent que les SH interagissent et sont sorbées sur les cellules microalgales. Ce phénomène permet de retenir jusqu'à $24 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ d'AH. La similitude des poids moléculaires des AF et des AH suggère que ce paramètre n'est pas un descripteur important et utile pour expliquer les différences de sorption des AF et des AH sur les microalgues. Toutefois, un poids moléculaire similaire ne signifie pas que les SH présentent la même composition chimique, comme les mesures des autres paramètres chimiques le montrent. Les conceptions récentes de la nature des SH les décrivent comme des agrégats moléculaires de molécules de petite taille (Conte et Piccolo, 1999; Piccolo, 2001; Sutton et Sposito, 2005). Cela signifie que le poids moléculaire des SH évolue selon le milieu, le pH et la salinité (Conte et Piccolo, 1999). Le poids moléculaire n'est pas le meilleur paramètre pour étudier les interactions se développant entre les SH et les microalgues. Des mesures de composition chimique des SH apparaissent plus pertinentes.

Les travaux en fluorescence ont montré la présence de deux fluorophores dominants dans les MEEF des SH. La position des maximums d'excitation et d'émission de fluorescence de chaque fluorophore montre peu de différences pour les SH étudiées. Seuls les AHO sembleraient avoir une structure légèrement différente des autres SH. En effet, le fluorophore F2 n'est pas excité à la même longueur d'onde que celui des autres SH. Le rapport des fluorophores F2/F1 des AHO présente aussi une valeur légèrement plus forte. Toutefois, cette technique ne peut être utilisée dans cette étude pour décrire la sorption des SH, car aucune corrélation avec les quantités sorbées n'a été mise en évidence à partir des données de fluorescence. Par ailleurs, les MEEF ne permettent pas de déterminer des groupements fonctionnels spécifiques. La technique permet plutôt d'identifier des fluorophores à partir des MEEF (Coble, 2007; Stedmon et Markager, 2005). Les fluorophores de la matière organique naturelle sont mal définis et sont généralement désignés sous des appellations génériques comme « Protein like substances » ou encore « Humic like substances » (Coble, 1996; 2007). Les deux fluorophores présentés dans cette étude correspondent aux fluorophores désignés « Humic

like substances » par Coble (1996 ; 2007). Pour la matière organique dissoute naturelle jusqu'à 11 fluorophores peuvent être identifiables (Coble, 2007; Stedmon et Markager, 2005). Selon Cory et McKnight (2005), les signaux de fluorescences des SH seraient en partie causés par des groupements quinones.

Contrairement à la fluorescence, les analyses de l'absorbance dans l'UV-Visible ont permis une certaine caractérisation des SH. L'absorbance dans l'UV-Vis est fonction de l'absorptivité molaire, de la concentration et du parcours optique (Silverstein *et al.*, 1998), comme le montre la loi de Beer-Lambert. Les analyses UV-Vis ont été réalisées sur des échantillons ayant la même concentration et ayant un parcours optique identique. Ceci permet d'associer les résultats obtenus à l'absorptivité molaire. L'absorptivité molaire est une propriété intrinsèque de la matière liée à la facilité qu'ont certains groupements chimiques, comme des doublets électroniques ou des doubles liaisons, à effectuer des transitions électroniques (Herzberg et Spinks, 1944).

L'utilisation de la pente spectrale (S) caractérisant l'atténuation de l'absorption de la lumière par les composés organiques dissous présents dans les eaux naturelles a été proposée par Bricaud *et al.* (1981). Ce paramètre très utilisé en télédétection (Sathyendranath, 2000) définit la dépendance spectrale du coefficient d'absorption et procure une information générale sur la nature des chromophores présents dans la matière organique dissoute chromophorique (CDOM), dont les SH font partie (Blough et Del Vecchio, 2002). Selon Blough et Del Vecchio (2002), il y a trois informations accessibles à partir des pentes spectrales : 1) S est plus élevé pour les AF, 2) S augmente avec une diminution du poids moléculaire et 3) S augmente avec une diminution du contenu aromatique dans la CDOM. Les pentes spectrales observées pour les AF et les AH utilisés dans cette étude ont des valeurs de 0.0127 pour les AF et de 0.0070 à 0.0099 pour les AH. Ces valeurs sont comparables aux valeurs rapportées pour les eaux douces et les eaux marines (Blough et Del Vecchio, 2002; Galgani *et al.*, 2011; Helms *et al.*, 2008). Toutefois, elles sont plus faibles que les valeurs récemment mesurées pour la CDOM des eaux de la Baie d'Hudson (Guéguen *et al.*, 2011). Les données de pente spectrale présentées dans cette étude concordent avec les trois informations accessibles par ce paramètre (Blough et Del Vecchio, 2002). Les AF ont la pente la plus forte comparée aux AH, ce qui correspond à la relation inverse existant entre S et le poids moléculaire. Les AH et en particulier les AHA possèdent une pente spectrale plus faible, ce qui est aussi corroboré par les teneurs en composés aromatiques décrits dans le tableau 11.

Dans la CDOM, une grande proportion des chromophores qui absorbent la lumière à des longueurs d'onde inférieures à 400 nm sont des groupements aromatiques ayant divers degrés de substitution, ce qui inclut des composés phénoliques simples ou polysubstitués et aussi des acides phénoliques (Chin *et al.*, 1997; Korshin *et al.*, 1997; Novak *et al.*, 1992; Traina *et al.*, 1990). La mesure des coefficients d'absorption à 280 nm permet de comparer les SH selon leur contenu total en composé aromatique substitué comme les phénols, les acides benzoïques, les dérivés des anilines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Chin *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 1994; Peuravuori, 1997). Plus le coefficient d'absorption est élevé, plus la proportion de composés aromatiques substitués augmente dans les SH. Les résultats présentés dans le tableau 11, montrent que les AF, avec des valeurs de a_{280} de l'ordre de 36 m^{-1} contiennent moins de structures aromatiques et de composés insaturés que les AH, car les coefficients d'absorption à 280 nm des AH sont de l'ordre de 60 m^{-1} . Ces données, montrant des compositions chimiques variées pour les SH, suggèrent que cela affectera les interactions permettant le rapprochement, l'adhésion et la sorption des SH par les microalgues.

Le ratio des absorbances à 465 et 665 nm ($E4/E6$) a été corrélé avec le poids moléculaire des SH (Chen *et al.*, 1977). Un rapport faible indique que les composés ont un poids moléculaire élevé (Chen *et al.*, 1977). Les ratios $E4/E6$ des AH sont plus faibles que ceux des AF, ce qui est en accord avec les mesures de poids moléculaires obtenus pour ces substances (cf. section 3.3.1). Kononova (1966) a suggéré que ce ratio est en relation avec le degré de condensation du réseau de carbones aromatiques des SH des sols. Un faible ratio indiquerait un degré de condensation élevé (Kononova, 1966; Pansu et Gautheyrou, 2003). Chen *et al.* (1977), ont toutefois infirmé cette hypothèse et ont montré des corrélations positives entre des ratios $E4/E6$ élevés et des valeurs élevées d'acidité totale et du contenu en groupements carboxyliques ($-\text{COOH}$). Les données présentées dans cette étude (tableau 11) ne permettent pas d'indiquer si les AF et les AH utilisés possèdent un degré élevé en constituants aromatiques. Toutefois, les rapports élevés observés pour les AF seraient indicateurs de l'acidité des AF et de la présence de groupements carboxyliques plus nombreux chez les AF que chez les AH.

Les mesures d'absorbance à 254 nm peuvent être utiles pour discuter de l'aromaticité des SH (Leenheer, 2009). Korshin *et al.* (1997) ont proposé de modéliser les spectres UV-Vis d'absorption de la MOD comme un composite de trois chromophores aromatiques issus de la molécule de benzène, qui sont actifs à 180, 203 et 254 nm. Les

chromophores à 254 nm correspondent à des transitions électroniques de type transfert de charge associées aux électrons des liaisons π ($C=C$) du benzène (Korshin *et al.*, 1997). Le ratio de l'absorbance à 254 nm sur la concentration en DOC permet de déterminer l'indice SUVA (Specific UV Absorbance), qui peut être utilisé pour estimer la teneur en carbone aromatique de la DOM (Chin *et al.*, 1994; Traina *et al.*, 1990; Weishaar *et al.*, 2003). Les valeurs SUVA obtenues dans cette étude sont comprises entre 5 et 10 ($L\ mg\ C^{-1}\ m^{-1}$). Les AF ont les SUVA les plus faibles (tableau 11). Selon la littérature scientifique, des valeurs de SUVA supérieures à 4 ($L\ mg\ C^{-1}\ m^{-1}$) indiquent la présence de composés hydrophobes, aromatiques et de poids moléculaire élevé (Ates *et al.*, 2007; Edzwald et Tobiason, 1999; Edzwald et Van Benschoten, 1990; White *et al.*, 1997) et plus le SUVA augmente, plus le poids moléculaire et la proportion de ces composés augmentent. Parmi les AH utilisés dans cette étude, les AHA sont les plus hydrophobes et les plus aromatiques, mais sont aussi les SH qui ont le poids moléculaire le plus élevé. Les caractéristiques hydrophobes et aromatiques marquées des AHA sont cohérentes avec leur origine plutôt terrestre (Malcolm et MacCarthy, 1986; Mal'tseva *et al.*, 2009). Pour les SH des rivières de la Côte-Nord du Québec, les AH sont plus aromatiques et hydrophobes que les AF.

Les données obtenues en spectrométrie UV-Vis indiquent que les SH utilisées dans cette recherche montrent des différences de composition chimique. Afin de caractériser certains groupements chimiques, les SH ont été analysées par spectroscopie FTIR. Pour comparer les spectres infrarouges et mettre en lumière des tendances dans la composition des SH, les données ont été traitées et normalisées en considérant les onze bandes d'absorption identifiées dans la figure 12. L'étude des spectres infrarouges montre que les SH sont composées du même ensemble de groupements chimiques. Toutefois, les proportions des éléments individuels de cet ensemble varient. Seuls les AHO présentent une légère différence entre 1300-1000 cm^{-1} , où plusieurs bandes de faibles intensités sont présentes, mais pas pour les autres SH.

Les onze bandes infrarouges retenues et compilées dans le tableau 12 sont reliées à des groupements fonctionnels pouvant être associés à diverses familles de composés chimiques (Madari *et al.*, 2006; Senesi *et al.*, 2003; Tatzber *et al.*, 2007; Vergnoux *et al.*, 2011). Il est à remarquer que les bandes infrarouges observées pour les SH sont plus larges que celles notées pour les microalgues. En général, des bandes de plus en plus larges sont indicatrice de molécules organiques de plus en plus complexes

ayant des structures chimiques mal définies (Neporent, 1974; Sandorfy et Theophanides, 1984). Ces données infrarouges suggèrent que les microalgues possèdent des structures chimiques plus homogènes et plus localisées alors que celles se trouvant dans les SH semblent être distribuées plus aléatoirement dans des agrégats complexes.

Les alkyles, formant deux bandes à 2930 et 2850 cm^{-1} , sont en plus grande proportion dans les AH que dans les AF. Les alkyles sont associés aux lipides et acides gras présents dans les SH (Madari *et al.*, 2006; Senesi *et al.*, 2003; Tatzber *et al.*, 2007; Vergnoux *et al.*, 2011). Les AHA sont les SH contenant le plus d'alkyles avec 31 % suivie des autres AH avec des valeurs aux alentours de 10 %, tandis que les AF en sont plus pauvres avec des valeurs comprises entre 3 et 6 %. La présence de lipides et d'acides gras confère aux SH des parties hydrophobes. Considérant les données de FTIR et de SUVA, l'hydrophobicité des SH provient de la présence de groupements alkyles et de groupements aromatiques. Ces groupements étant peu polaires, ils seront peu sensibles aux variations de pH ou de salinité. Trois bandes ont été observées à 2600, à 1710 cm^{-1} et à 1610 cm^{-1} . Ces bandes seraient produites par des groupements carboxyliques provenant des acides gras et des protéines (Madari *et al.*, 2006; Senesi *et al.*, 2003; Tatzber *et al.*, 2007; Vergnoux *et al.*, 2011). Les AF et les AH naturels ont des proportions semblables en groupements carboxyliques, soit 53 %, 60 %, 55 % et 52 % pour AFM, AFO, AHM et AHO. La proportion dans les AHA est nettement plus faible, avec une valeur de 34 %. Les protéines, les acides gras et les lignines possèdent des groupements contenant de l'oxygène et forment des pics à 1380 cm^{-1} . Leurs proportions sont légèrement plus importantes dans les AF, 7 %, que dans les AH, 4 % (Stevenson, 1994; Visser, 1983). La présence de ces groupements en plus grande quantité, par rapport aux groupements alkyles et aux groupements aromatiques, dans les AF expliquent en partie la plus grande solubilité des AF par rapport aux AH (Buffle, 1977; Stevenson, 1994). Les SH sont aussi composées de polysaccharides et de carbohydrates. Ces composés forment deux bandes à 1200 cm^{-1} et 1030 cm^{-1} . La proportion de ces composés dans les SH est très semblable avec des valeurs comprises entre 20 et 29 %. La présence de ces composés est intéressante, car il est reconnu que les sucres peuvent interagir avec les cations en solution (Alexeev *et al.*, 2004; Camci-Unal et Pohl, 2009; Eriksson *et al.*, 2008; Hasegawa, 2009; Wells, 2002).

La FTIR est une technique très utile pour mettre en évidence la présence d'alkyles et de groupements chimiques contenant des atomes d'oxygène afin d'évaluer

leurs proportions dans les SH. Elle n'est toutefois pas recommandée pour l'étude plus précise des cycles aromatiques, car ces derniers ne donnent pas de pics intenses dans le spectre de FTIR (Leenheer, 2009; Silverstein *et al.*, 1998b). La résonance magnétique nucléaire (RMN) du C^{13} (Mao *et al.*, 2007; Weishaar *et al.*, 2003) et la spectrométrie Raman (Francioso *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 1999) sont plus appropriées pour l'étude de ces composés. Ces techniques n'ont toutefois pas été utilisées dans cette étude.

4.4 Effets du pH

Les expériences préliminaires de sorption des SH par les microalgues réalisées dans des conditions estuariennes (pH 8 et 25 PSU) ont montré que les SH sont accumulées ou sorbées par les surfaces cellulaires. L'accumulation des SH par les microalgues s'effectue toujours en moins de 60 min avant l'atteinte de l'état stationnaire où les quantités sorbées demeurent constantes. La taille des cellules microalgales aurait pu être une explication physique simple pour expliquer ces résultats, mais des travaux de caractérisations chimiques ont montré que des effets chimiques interviennent et permettent d'expliquer en partie les différences observées. Les effets chimiques sont liés à la composition des surfaces cellulaires des microalgues et à celle des SH. Iso est plus riche en composés alkyles que Nanno. Toutefois, Nanno possède une paroi cellulaire rigide formée d'algaénans (Gelin *et al.*, 1997), un composé peu polaire, alors qu'Iso ne possède qu'une membrane cellulaire (Zhu et Lee, 1997b) riche en acides gras et lipides complexes, qui sont des composés présentant des parties polaires. En plus de ces caractéristiques reliées aux surfaces cellulaires, les deux microalgues possèdent des groupements hydroxyles, carboxyles et amines en différentes proportions susceptibles d'interagir avec les SH et modulant la sorption. D'autres travaux ont montré que les AF et les AH contiennent de nombreux groupements fonctionnels. Les AF seraient plus riches en groupements polaires hydrophiles de types carboxyliques (COOH) que les AH alors que ces derniers contiendraient plus de groupements hydrophobes peu polaires de types alkyles et aromatiques que les AF. Ces groupements fonctionnels peuvent se comporter différemment selon le pH.

Afin d'approfondir la description sur le rapprochement, l'adhésion et la réaction des SH avec les microalgues, des séries d'expériences à différents pH, mais à une salinité constante de 25 PSU ont été effectuées. Les résultats montrent que la sorption varie

grandement en fonction du pH, des microalgues étudiées et des AF ou AH utilisés. Iso et Nanno sorbent généralement des quantités maximales d'AF à pH 6 alors que pour les AH, les quantités sorbées par les cellules sont maximales à pH 8 pour Iso, mais à pH 4 pour Nanno. Ces données sont contradictoires avec ce qui est connu pour les microalgues d'eaux douces, car les quantités sorbées sont généralement fortes à des pH acides et tendent vers des valeurs très faibles à des pH basiques (Campbell *et al.*, 1997; Knauer et Buffe, 2001; Parent *et al.*, 1996; Vigneault *et al.*, 2000). Campbell *et al.* (1997) fournissent les explications les plus élaborées pour la sorption maximale des SH à pH 4. À faibles pH, les groupements acides (COOH) des SH sont protonés. La conformation des molécules change et elles ont tendance à former des agrégats. Parallèlement, les groupements carboxyliques des surfaces cellulaires sont protonés. Sous ces conditions acides, les répulsions électrostatiques entre les SH et les surfaces cellulaires diminuent, ce qui favorise le développement d'attractions hydrophobes et la formation de liaisons hydrogène entre les SH et les surfaces microalgales. La sorption maximale des AH à pH 4 pour Nanno pourrait correspondre au mécanisme proposé par Campbell *et al.* (1997). En effet, le fait que les groupements acides (COOH) des SH et des microalgues soient protonés pourrait favoriser les rapprochements et l'adhésion des SH sur la paroi cellulaire de Nanno constituée d'algaénans. Ces molécules peu polaires sont susceptibles de développer de fortes interactions hydrophobes et d'autres interactions de type van der Waals, avec les AH situés près de cette paroi, d'autant plus que les AH utilisés dans cette étude montrent une grande aromaticité. Toutefois, le mécanisme proposé ne permet pas d'expliquer l'ensemble de nos résultats.

Il y a au moins deux autres processus qui peuvent être impliqués pour expliquer les quantités de SH sorbées par les microalgues. Un processus impliquant l'internalisation des SH dans les cellules pourrait exister. Récemment, Kulikova *et al.* (2010) ont montré que les SH pouvaient pénétrer à l'intérieur de cellules bactériennes et que ce processus serait grandement accentué sous un stress salin. Ce processus s'est-il produit dans nos expériences ? Une quantité substantielle de SH quantifiée comme sorbée se retrouverait-elle dans les cellules ? Malheureusement, nous ne disposons pas de données pour discuter de cet effet. Des travaux supplémentaires devraient être réalisés pour valider cette explication des résultats obtenus. L'autre processus pouvant être évoqué est la sorption des SH sur les surfaces cellulaires. Le mécanisme proposé par Campbell *et al.* (1997) entre dans cette catégorie. Une variante de ce mécanisme peut être suggérée en

considérant que les expériences réalisées dans cette étude ont été effectuées dans des milieux réactionnels contenant de l'eau de mer à différentes salinités.

Dans les eaux naturelles où les pH sont compris entre 5 et 8, la surface des microalgues est chargée négativement, car les groupements carboxyliques sont ionisés (COO^-). Cette charge peut générer des attractions électrostatiques avec des surfaces chargées positivement ou avec des cations présents dans le milieu (Crist *et al.*, 1981; 1988; Knauer et Buffle, 2001). Dans des conditions naturelles, la sorption d'agrégats polyélectrolites chargés négativement comme les SH (Steelink, 2002; Stevenson, 1994) ne peut se produire que si les répulsions électrostatiques entre les composés anioniques et les surfaces cellulaires sont atténuées et/ou compensées par la formation d'interactions hydrophobes ou de liaisons hydrogène (Campbell *et al.*, 1997; Knauer et Buffle, 2001). Toutefois, comme l'ont montré les travaux de caractérisation FTIR, les cellules microalgales et les SH possèdent une grande diversité de groupements chimiques capables de développer des interactions variées (Gagné *et al.*, 2011). Ces interactions sont susceptibles de compenser les répulsions électrostatiques et de conduire à un rapprochement et une adhésion des SH sur les surfaces cellulaires. De fortes interactions de van der Waals et des interactions hydrophobes peuvent se développer et seront d'autant plus importantes que les groupements apolaires seront nombreux à interagir ou encore que les surfaces en interaction seront proches et de grandes superficies. Des complexes de transfert de charge pourraient également se développer entre des sites riches en électrons (noyaux aromatiques) et d'autres déficients en électrons (Gagné *et al.*, 2011). La présence de groupements hydroxyles, amines, amides et carboxyliques est susceptible de favoriser le développement de multiples liaisons hydrogène et peut aussi développer de fortes attractions électrostatiques entre des molécules et des surfaces possédant de forts dipôles électriques de charges opposées. Par ailleurs, des cations polyvalents, comme le calcium, peuvent intervenir pour faciliter l'adhésion sur des surfaces solides lorsque le milieu présente une forte force ionique comme c'est le cas en milieu estuarien ou marin. Les cations divalents facilitent le pontage entre deux surfaces négatives (Baalousha *et al.*, 2006; Swift, 1999).

À notre connaissance, il n'existe pas d'études spécifiques publiées sur le rôle des ions multivalents dans le mécanisme de sorption des SH par des microalgues. Toutefois, des travaux ont été publiés sur le rôle du calcium dans l'absorption des SH sur des particules minérales (Vermeer *et al.*, 1998; Vermeer et Koopal, 1998; Weng *et al.*, 2005).

Ces travaux suggèrent que les ions calcium se lient aux SH, réduisant leurs charges négatives. Cela faciliterait l'approche des SH vers les surfaces cellulaires chargées négativement et pourrait favoriser la sorption. Pour nos résultats, cela impliquerait que la surface cellulaire d'Iso contiendrait un nombre plus important de sites chargés négativement, tels les groupements carboxyliques déprotonés aux conditions de pH et de salinité utilisées. Considérant que la surface cellulaire d'Iso est constituée d'une membrane plasmique riche en acides gras, cette hypothèse peut être invoquée pour expliquer la forte sorption des AF sur cette microalgue. Ce mécanisme pourrait même se produire pour les AF en présence de Nanno pour laquelle on observe une accumulation plus importante des AF à un pH supérieur à 4. Par ailleurs, les AF étant plus riches en groupements carboxyliques que les AH, l'effet du pontage par les ions calcium serait plus marqué pour les AF que les AH, comme nous l'observons. Nos données montrent que la sorption des AF est plus accentuée à pH 6 qu'à pH 8 pour Iso alors que les AH sont plus sorbées à pH 8. Nous disposons de peu de données pour expliquer ces nuances. Néanmoins, il est possible de suggérer que des effets hydrophobes et de pontages cationiques puissent intervenir simultanément dans le cas des AH pour amplifier la sorption des AH, du moins dans le cas d'Iso. Ceci suggère que les caractéristiques de la surface microalgale d'Iso (riche en acides gras) auraient un effet très important, car pour Nanno (paroi d'algaenans) le mécanisme postulé par Campbell *et al.* (1997) est vraisemblable alors qu'il n'explique pas les résultats obtenus entre les AH et les cellules d'Iso. L'amplification des effets hydrophobes par des effets de pontage cationique est plausible, car les données de coefficient de distribution (tableau 15) montrent que les AH adhérant sur Iso ont les plus fortes valeurs de K_d , ce qui traduit une plus grande affinité des AH pour Iso sous les conditions d'étude.

Dans un milieu aussi complexe que celui utilisé dans cette étude, la détermination du mécanisme de sorption entre les SH et les microalgues est une opération difficile. En effet, l'eau de mer contient une multitude de cations et d'anions capables de réagir et de modifier certains sites actifs des cellules ou des SH. Dans le cas des SH, des changements de pH affectent directement la conformation spatiale des molécules et leur capacité à former des agrégats (Baalousha *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Ghosh et Schnitzer, 1980; Nebbioso, 2009; Yuan et Zydney, 1999). Par exemple, Baalousha *et al.* (2006) ont montré que la taille des SH augmente avec une augmentation du pH ou de la force ionique. Si nos expériences visant à quantifier l'effet de la salinité sur la sorption

avaient été réalisées dans de l'eau douce à pH 8, on peut croire que les SH auraient été présentes sous forme d'agrégats relativement peu volumineux. Dans l'eau de mer, il est possible que ces agrégats soient encore plus volumineux, car comme le montrent Baalousha *et al.* (2006), la présence d'ions calcium favorise le rapprochement des molécules de SH qui forment des agrégats plus volumineux altérant les caractéristiques des molécules individuelles.

4.5 Effets de la salinité

La complexité du milieu réactionnel rend difficile l'interprétation des effets de la salinité. Dans les expériences menées pour étudier les effets de la salinité, le pH de travail était de 8, ce qui indique que les groupements carboxyliques étaient dans un état ionisé. Dans cette situation, une augmentation de la concentration en cations multivalents permet de diminuer les répulsions électrostatiques (Brigante *et al.*, 2007), voire même permettre des attractions électrostatiques entre les SH et les surfaces microalgales par la formation de pontages cationiques. Ce mécanisme pourrait expliquer l'augmentation des affinités des SH pour les microalgues à 15 et 25 PSU pour la sorption des AF et des AH sur les surfaces d'Iso et pour la sorption des AF sur Nanno. Les AH contiennent peu de groupements carboxyliques comparés aux AF, tout comme Nanno. La plus faible proportion de groupements carboxyliques pourrait limiter les pontages cationiques entre les AH et les parois de Nanno. L'augmentation de la salinité permet aussi d'accentuer les pontages de type SH-cation-SH (Baalousha *et al.*, 2006; Swift, 1999). À 35 PSU, des phénomènes de compétition peuvent avoir lieu entre la sorption des SH par les microalgues et l'augmentation de la taille des agrégats des SH, car une augmentation de la salinité entraîne une augmentation de la taille des agrégats (Baalousha *et al.*, 2006; Senesi *et al.*, 2003). La compétition entre la sorption et l'agrégation pourrait expliquer que lorsque la salinité passe de 25 PSU à 35 PSU, les quantités de SH sorbée par les surfaces d'Iso et de Nanno et les affinités diminuent. Selon la salinité, la conformation spatiale des SH peut changer (Baalousha *et al.*, 2006; Conte et Piccolo, 1999; Ghosh et Schnitzer, 1980). Ce changement de conformation peut influencer les interactions hydrophobes entre les SH et les microalgues. Ceci expliquerait les différences de sorption observées entre les AF et les AH. Pour affiner la compréhension des effets de salinité, il faudrait mener d'autres expériences.

4.6 Effets de la concentration

Quelques travaux ont été effectués afin d'étudier les effets de la concentration en SH sur la sorption par les microalgues. Les résultats obtenus ont montré que les quantités sorbées pouvaient varier considérablement. Pour les AF, à pH 6 en présence d'Iso, les quantités sorbées diminuent avec une augmentation de concentration. Pour Nanno, on observe des tendances à la hausse pour les AFM, AFO et AHA à pH 6, mais des tendances à la baisse pour AHM et AHO à pH 8. Ces variations semblent aléatoires. Toutefois en examinant les affinités des SH selon la concentration, une tendance nette est observée. Pour tous les pH, les affinités (K_d) des SH pour les microalgues diminuent lorsque la concentration en SH augmente. Ce phénomène est couramment observé dans l'étude de la sorption des contaminants sur les sols ou sédiments (Luthy *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 2005a; b). Il résulterait de la présence d'au moins deux types de sites de sorption ayant des affinités différentes (Luthy *et al.*, 1997; Tremblay *et al.*, 2005a; b). Un type de sites serait plutôt polaire et présenterait de très fortes affinités alors que l'autre type de sites serait de nature non polaire et aurait des affinités moindres (Luthy *et al.*, 1997). L'explication de la diminution des K_d provient d'un processus en deux temps. D'abord, les sites de très fortes affinités interagissent rapidement jusqu'à saturation (K_d élevé) puis les sites moins réactifs ou plus difficilement accessibles sont occupés plus lentement (Luthy *et al.*, 1997). Dans le cas de nos expériences, on peut suggérer que les sites associés à la présence de groupements carboxyliques seraient des sites de fortes affinités, car ils impliquent des interactions fortes de natures électrostatiques ou ioniques. L'autre type de sites importants serait associé à des régions montrant des interactions hydrophobes ou de van der Waals. Nous ne pouvons préciser si ces sites sont préférentiellement situés sur les microalgues ou sur les SH. Les données de FTIR et SUVA montrent que des groupements carboxyliques et des structures peu polaires (alkyles, aromatiques, éthers) permettant le développement d'interactions hydrophobes ou de van der Waals sont présents à la fois sur les SH et sur les microalgues.

Les résultats de cette étude indiquent qu'au moins deux types de sites interviennent pour expliquer la sorption des SH par les microalgues. Cela n'exclut pas la présence de sites secondaires moins importants ou spécifiques qui causeraient des nuances et des variations dans les mécanismes de sorption participant à l'adhésion et la rétention des SH par les microalgues.

Il y a une conséquence environnementale importante à nos observations qui montrent que les SH ont de plus fortes affinités pour les microalgues lorsque la concentration en SH diminue. Dans les domaines côtiers et océaniques, la concentration en MOD varie de 0.5 à 2.5 mg C L⁻¹ (Cauwet, 2002; Hansell, 2002; Hansell et Carlson, 2001), soit 1 à 5 mg MO L⁻¹. Les interactions entre la MOD, et plus particulièrement les SH, peuvent donc être ubiquistes et très importantes. Les données présentées dans cette étude suggèrent que les microalgues présentes dans l'océan auraient un recouvrement important de substances humiques, car les océans contiennent peu de matière organique dissoute.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE

Le but de cette recherche était de caractériser la sorption des SH sur des cellules phytoplanctoniques marines et de comprendre l'évolution de ce phénomène dans un système estuarien. Pour cela, plusieurs paramètres pouvant influencer le phénomène de sorption ont été déterminés et analysés. Les résultats de ce projet sont les premiers résultats qui étudient l'évolution temporelle de la sorption des SH sur les microalgues marines. De plus, l'originalité et la force de cette étude sont l'utilisation de substances humiques d'origine naturelle et l'étude de la sorption à des concentrations en SH proche des concentrations naturelles.

Le premier objectif spécifique de cette étude était d'étudier les cinétiques de sorption entre les microalgues et les SH, afin de décrire l'évolution des quantités sorbées dans le temps. Après la mise en contact des SH avec les microalgues, les quantités sorbées augmentent jusqu'à l'atteinte d'un état stationnaire. Toutefois, cet état n'apparaît pas au même moment selon la microalgue étudiée. De plus, l'atteinte d'un état stationnaire varie avec les SH étudiées et selon les conditions de pH et de salinité du milieu.

Le deuxième objectif spécifique de cette étude était d'étudier les effets des microalgues sur la sorption des SH. Afin de comprendre les effets des microalgues sur la sorption, ces dernières ont été caractérisées afin d'évaluer l'existence d'effets physiques et chimiques qui moduleraient la sorption. Un effet physique possible était relié à la taille des cellules. Les résultats de cette étude ont montré que cet effet n'était pas très important. Par contre, les caractérisations chimiques des microalgues ont montré qu'une composante chimique pouvait affecter fortement la sorption. L'étude des spectres FTIR montre que les deux microalgues possèdent des groupements alkyles associés aux lipides et aux acides gras, des groupements esters, des protéines, des groupements carboxyliques, des groupements esters, des groupements éthers, aldéhydes et cétones. L'étude des intensités des bandes infrarouges indique que les microalgues possèdent ces groupements en proportions différentes. Ces groupements permettent la formation de liaisons hydrogène et des interactions de van der Waals, hydrophobes, polaires, électrostatiques ou encore ioniques selon le pH et la force ionique du milieu.

Un autre objectif spécifique était d'étudier les effets de la nature des SH sur la sorption par les microalgues. Pour cela, les AF et les AH ont été caractérisés chimiquement. Les poids moléculaires des SH et les MEEF ne permettent pas d'expliquer les variations des quantités sorbées observées entre les AF et les AH. Les données d'UV-Vis ont permis de déterminer que les AH possèdent des caractéristiques hydrophobes et aromatiques, mais aussi plus de composés aromatiques substitués que les AF. Ces données indiquent aussi que les AF possèdent plus de groupements carboxyliques que les AH. Les spectres infrarouges indiquent que les AF et les AH possèdent des groupements chimiques en proportions différentes. Les AH possèdent plus de groupements alkyles, mais moins de protéines que les AF. Les AH et les AF possèdent autant de groupements carboxyliques, de carbohydrates et de polysaccharides. La présence de tous ces groupements hydrophiles et hydrophobes permettent la formation de liaisons hydrogène et d'interactions de van der Waals, hydrophobes, polaires, électrostatiques ou encore ioniques selon le pH et la force ionique du milieu. Selon le pH et la salinité du milieu, la proportion des sites d'interaction fluctue.

Un des objectifs spécifiques était de déterminer l'évolution de la sorption des SH par les microalgues à plusieurs pH. Les expériences ont été réalisées dans un milieu réactionnel complexe, ce qui rend très difficile l'interprétation des résultats des effets du pH. Toutefois, à des pH acides, les groupements carboxyliques présents dans les SH et sur les surfaces microalgales sont protonés, ce qui permet le développement d'attractions hydrophobes, d'interactions de van der Waals et la formation de liaisons hydrogène, quelque soit la microalgue étudiée. Plus le pH du milieu réactionnel augmente, plus les groupements carboxyliques s'ionisent ce qui augmenterait les répulsions électrostatiques. La présence d'ion calcium dans le milieu permet de diminuer les répulsions électrostatiques en interagissant avec les groupements carboxyliques. Cela permettrait d'expliquer les différences d'affinités entre les AF et les AH observées pour Iso, car les AF possèdent plus de groupements carboxyliques que les AH. Le développement de pontages cationiques modifie la nature et l'équilibre des interactions se développant entre les SH et les microalgues. Il en résulte que les variations de sorption sont difficiles à prédire.

Le cinquième objectif spécifique de cette étude était de déterminer l'évolution de la sorption des SH par les microalgues à plusieurs salinités. Le milieu réactionnel utilisé est complexe, ce qui rend très difficile l'interprétation des résultats des effets de la

salinité. Durant la réalisation des expériences faites pour étudier cet effet, le pH du milieu était de 8, ce qui indique que les groupements carboxyliques des SH et des microalgues étaient sous formes ionisées. Ces groupements ont pu interagir fortement avec les cations présents. Les cations permettent de diminuer les répulsions électrostatiques voire même de favoriser des attractions électrostatiques. La formation de ces attractions permet un pontage cationique entre les SH et les microalgues. La présence de cations permet aussi d'accroître les pontages cationiques entre les SH, ce qui augmente la taille des agrégats. Cela affecterait la nature et l'équilibre des interactions se développant entre les SH et les microalgues

Le dernier objectif spécifique de cette étude était d'étudier les effets de la concentration en SH sur la sorption par les microalgues. L'effet de la concentration sur la sorption semble aléatoire si on considère les quantités sorbées. Toutefois, si on considère les concentrations sorbées et les concentrations de SH dissoutes pour déterminer les constantes des distributions, on remarque une tendance nette. L'affinité des SH pour les microalgues, quel que soit le pH, tend à diminuer lorsque la concentration augmente. Cette tendance serait due à la présence d'au moins deux types de sites de sorption ayant des affinités différentes. Ces sites de sorption seraient dus à la présence de groupements carboxyliques qui seraient des sites de fortes affinités et à la présence de régions présentant des interactions hydrophobes ou de van der Waals qui serait des sites de moins fortes affinités.

L'objectif principal de cette étude était de caractériser la sorption des SH sur des microalgues marines et comprendre l'évolution de ce phénomène dans un système estuarien. L'accumulation des SH par les microalgues s'effectue toujours rapidement. Toutefois, les quantités sorbées varient selon les SH étudiées, le pH et la salinité. Durant une transition estuarienne, des masses d'eaux douces concentrées en SH et d'eaux salées peu concentrées en SH se rencontrent et se mélangent. En amont d'un estuaire, les masses d'eau sont peu salées et concentrées en SH. Elles peuvent présenter des pH proches de 5. Plus on va vers l'aval d'un estuaire, plus la salinité et le pH augmentent alors que la concentration en SH diminue. Les données de cette étude indiquent qu'en amont d'un estuaire, les SH vont interagir avec les microalgues en développant préférentiellement des attractions hydrophobes, des interactions de van der Waals et en formant des liaisons hydrogène. Plus on se déplace vers l'aval des estuaires, plus le pH et la salinité augmentent. Les cellules microalgales et les SH sont de plus en plus chargées

négativement. Toutefois, la présence de cations dans le milieu permet de limiter les répulsions électrostatiques voir de faciliter des attractions électrostatiques entre les SH et les microalgues. Ces attractions permettent un pontage cationique entre les SH et les microalgues. Selon la composition chimique des microalgues et selon la nature des SH, les affinités entre les SH et les microalgues peuvent être modulées durant la transition estuarienne. Les concentrations en DOC et en SH ont tendance à diminuer de l'amont vers l'aval. Ceci indique que vers l'amont de l'estuaire, les affinités des SH pour les microalgues sont faibles alors que plus on va vers l'aval de l'estuaire, plus les affinités des SH pour les microalgues augmentent.

La sorption des SH sur les microalgues est un phénomène pouvant être très important, comme le montrent les quantités d'AH sorbées par les microalgues. Dans les environnements aquatiques, les SH font partie de la matière organique dissoute. Le processus de sorption des SH sur les microalgues peut donc être considéré comme un mécanisme d'enlèvement de carbone organique dissous. Ce phénomène devrait être pris en considération dans les études et les modèles du cycle du carbone.

Afin d'améliorer les connaissances sur les phénomènes de sorption des SH par les cellules microalgales, d'autres microalgues pourraient être étudiées. Le dinoflagellé *Alexandrium tamarense* pourrait être utilisé afin de faire aussi des liens entre la sorption des SH et les efflorescences d'algues toxiques. Les diatomées *Thalassiosira weissflogii* et *Coscinodiscus wailesii* pourraient servir à vérifier si la différence de tailles affecte la sorption. Les effets cations monovalents et multivalents sur la sorption pourraient aussi être explorés afin d'améliorer les connaissances sur les types d'interactions possibles entre les SH et les microalgues. Le marquage des SH par des atomes de tritium pourrait permettre de différencier les phénomènes d'adsorption, d'absorption et de désorption et aussi de vérifier si l'internalisation des SH est possible chez les microalgues et de quantifier ce phénomène.

La matière organique dissoute a un rôle environnemental très important dans le transport et le devenir des contaminants et dans le développement possible d'efflorescences d'algues toxiques. La sorption des SH sur les microalgues pourrait influencer ces rôles environnementaux de la matière organique.

ANNEXES

ANNEXE I FABRICATION DU MILIEU DE CULTURE f/2-GUILLARD

Selon le type d'algue, le milieu peut changer de composition. Pour des diatomées, il faut inclure une solution silicatée. Préparation du milieu de culture : à de l'eau de mer filtrée, il faut ajouter des nutriments, divisés en quatre solutions (voire cinq pour les diatomées). Pour faire ce milieu, il faut préparer des solutions stock de nutriment dont la composition est décrite dans le tableau 21.

Pour faire un litre de milieu de culture f/2-Guillard (tableau 21), il faut mettre 1 mL de la solution S1 et 1 mL de la solution S2 (et 1 mL de S4 si diatomées), ajouter 900 mL d'eau de mer, ajouter 1 mL de la solution S3, puis compléter à 1 L avec de l'eau de mer. Recouvrir le bouchon du contenant du milieu (bouchon en polyesters) avec du papier aluminium. Une fois cette solution faite, il faut l'autoclaver avec le programme LIQEAU DE MER (programme 7). ATTENTION : durant l'autoclavage, aucun bouchon ne doit être fermé hermétiquement. Ce programme expose le milieu de culture à 110°C pendant 25 min (un cycle dure en tout 53 min). Ce programme permet d'éviter une trop forte cristallisation des sels.

Une fois le milieu stérilisé, il faut le laisser refroidir. Le milieu prêt, il peut être conservé au réfrigérateur pendant quelques semaines. La solution S5 ne doit être ajoutée qu'au moment de l'ensemencement des microalgues, avec 182 µL pour 1 L de milieu.

Tableau 21 : Composition du milieu f/2-Guillard

Solution	Composé	Concentration massique (g L^{-1})
Solution S1 pour 1L	NaNO_3	75
Solution S2 pour 1L	NaH_2PO_4	5
Solution S3 pour 1L Solution métallique	$\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	3.15
	Na_2EDTA	4.36
	$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	10 mL d'une solution à 9.8 g L^{-1}
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	10 mL d'une solution à 6.3 g L^{-1}
	$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	10 mL d'une solution à 22 g L^{-1}
	$\text{CoSO}_4, 6\text{H}_2\text{O}$	10 mL d'une solution à 10 g L^{-1}
	$\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$	10 mL d'une solution à 180 g L^{-1}
Solution S4 (pour diatomées)	$\text{Na}_2\text{SiO}_3, 5\text{H}_2\text{O}$	30
Solution S5 (fourni par Nutrocéan)	Vitamine B1 (thiamine)	0.07 %
	Vitamine B12	0.0002 %
	Biotine	0.0002 %
	N (azote)	15 %
	P_2O_5	2 %

ANNEXE II ENSEMENCEMENT DES MICROALGUES

L'ensemencement des microalgues doit se faire en milieu stérile. Nous pouvons utiliser deux approches pour créer une zone stérile : la flamme d'un bec Bunsen ou une hotte à flux laminaire. La hotte à flux laminaire permet d'avoir une zone stérile plus importante qu'une flamme et donc un espace de travail plus important. Si le travail se fait sous une hotte à flux laminaire, il faut porter des lunettes arrêtant les UV.

Matériel :

- * Alcool à 70 %
- * Papier absorbant
- * Filtre à 0.2 μm stérile
- * Seringue
- * Pipette graduée stérile
- * Paire
- * Lunettes anti-UV
- * Savon antibactérien ou de l'alcool à 70 % pour se stériliser les mains
- * La culture souche
- * Le nouveau milieu
- * La solution S5
- * Papier aluminium
- * Tape
- * Crayon indélébile

Démarrer la hotte à flux laminaire 30 min minimum avant de faire l'ensemencement et nettoyer toutes les surfaces avec de l'alcool à 70 %. Installer tout le matériel sous la hotte en le nettoyant avec l'alcool. Une fois les 30 min atteintes, le travail peut commencer.

Avant de manipuler le matériel, il faut se nettoyer les mains avec un savon antibactérien ou avec l'alcool. Si pour n'importe quelle raison les mains touchent quelque chose de non stérile, il faut les renettoyer avec le savon. Retirer le bouchon du contenant du milieu et le poser de façon à ce que la partie qui va être vers la culture ne touche aucune surface. Filtrer la solution S5 sur un filtre à 0.2 μm stérile (ne retiens pas les protéines : en polyéthersulfone) de façon à ce que le filtrat tombe directement dans le milieu. Retirer le bouchon de la culture souche en le pinçant entre le petit doigt et la paume, ne jamais le poser. Prélever entre 1 et 10 mL de la culture souche (selon le volume de cette culture et selon la vitesse de croissance voulue), avec une pipette graduée stérile. Injecter ce volume dans le nouveau milieu. Refermer la culture souche puis la nouvelle culture. Une fois la cultureensemencée, agiter lentement le milieu. Sortir tout le matériel de la hotte, la nettoyer avec de l'alcool et l'éteindre.

Pour les cultures de grands volumes >100 mL, il faut mettre un système d'agitation : soit une plaque tournante, soit un barreau magnétique stérile, soit un système de bullage stérile avec un filtre à 0.2 μm . Le système de bullage est à favoriser, car il permet de faire entrer de l'air stérile, et de créer une légère surpression qui permet de diminuer le risque de contamination bactérienne ultérieure.

ANNEXE III VAISSELLE

Nettoyer la vaisselle avec une brosse si nécessaire

La faire tremper dans une solution d'Alconox pendant 24 h. La vaisselle doit être complètement recouverte pour ne pas que des traces de savon apparaissent.

Remarque: Si la vaisselle est laissée à tremper plus de 24 h il y a fréquemment un dépôt blanchâtre qui se forme sur la verrerie. Après un certain temps, ces dépôts sont particulièrement difficiles à déloger. On évite la formation de ces dépôts en ne laissant pas la vaisselle à tremper trop longtemps.

La rincer abondamment à l'eau du robinet et trois fois à l'eau osmosée

Laisser égoutter tête à l'envers pendant 10 à 15 min.

Faire tremper pendant 24 h dans un bain d'HCl à 10 %.

Rincer 3 fois à l'eau osmosée.

La laisser sécher sur du papier absorbant

Couvrir les ouvertures de la vaisselle avec du papier d'aluminium

Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 30 min

ANNEXE IV PROTOCOLE POUR LA MESURE DE $\delta^{13}\text{C}$ ET $\delta^{15}\text{N}$.

Les échantillons de sédiment ou de tissus doivent être séchés à froid puis réduits en une fine poudre avec un mortier et finalement encapsulés dans une cupule en étain de 5 x 9 mm. Le séchage à l'étuve à une température de 40-70°C est acceptable. La quantité utilisée habituellement pour faire une analyse de sédiment est d'environ 3-4 mg. Par contre, pour un échantillon de tissus biologiques, la quantité requise est de 0.3 à 1 mg; une quantité de 0.1 mg peut être analysée sans problème. La précision de la pesée doit être de ± 0.0005 mg.

Les isotopes stables du carbone et de l'azote sont mesurés suite à la combustion des échantillons (ce qui produit CO_2 et N_2) avec un analyseur élémentaire COSTECH ECS 4010 couplé au Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) Delta^{Plus} XP de Thermo Electron Co. par une interface ConFlo III aussi de Thermo. Le gaz porteur hélium et les gaz de référence CO_2 et N_2 sont de haute pureté et proviennent de Air Liquide Canada. Le contrôle du système, l'acquisition et le traitement des données sont réalisés par le logiciel Isodat 2. Cet ensemble d'instruments permet d'obtenir les rapports des valeurs isotopiques, la quantité en carbone et azote de l'échantillon et de calculer le rapport C/N.

Si seulement les mesures de C et N sont souhaitées, le spectromètre de masse n'est pas utilisé et la quantification se fait avec l'analyseur élémentaire COSTECH ECS 4010 et le logiciel EAS32 (COSTECH). La courbe standard est alors préparée avec le standard acétanilide (COSTECH) avec quatre points de calibrage dans un intervalle d'environ 0.2 mg à 1.2 mg.

Standards chimiques nécessaires à la correction des valeurs isotopiques, disponibles au labo.

Cafféine: Sigma Chemical Co., St Louis, USA

Mueller Hinton Broth: Becton Dickinson USA

Nannochloropsis : pâte de microalgues produites à la station aquicole de l'ISMER, lyophilisée.

Ces standards « maison » ont d'abord été calibrés relativement à des standards certifiés en ^{13}C et ^{15}N provenant du National Institute of Standards and Technology (NIST, USA).

Précision sur les mesures avec le Delta^{Plus} XP, échantillons provenant d'un bloom de phytoplancton dans l'estuaire du Saint-Laurent septembre 2007 (n = 4).

Écart-type relatif, mesure de la quantité de carbone : $\pm 1.5 \%$

Écart-type relatif, mesure de la quantité de l'azote : $\pm 1.9 \%$

Écart-type relatif, calcul du rapport C/N : $\pm 0.8 \%$

Précision sur $\delta^{13}\text{C}$: $\pm 0.05 \text{‰}$

Précision sur $\delta^{15}\text{N}$: $\pm 0.15 \text{‰}$

ANNEXE V PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS POUR LE DÉNOMBREMENT CELLULAIRE

Préservation des échantillons pour dénombrement de bactéries et de phytoplancton
par cytométrie en flux

Laboratoire d'analyse des particules et des surfaces,

Institut des Sciences de la Mer de Rimouski

La préservation pour les bactéries et le phytoplancton est la même (mais il faut une cryovial pour les bactéries et une cryovial pour le phytoplancton) :

1. Mettre 4.5 mL d'échantillon dans une cryovial de 5 mL (e.g., Corning cryogenic vial 430663).

2. Ajouter 20 μ L de glutaraldéhyde 25 % Grade I (Sigma-Aldrich G5882 ou G6257)

[Concentration finale 0.1 %].

3. Bien agiter puis laisser fixer au noir à la température de la pièce pendant 15 min.

4. Congeler dans l'azote liquide puis conserver à -80°C (s'il n'y a pas d'azote liquide disponible, mettre directement à -80°C)

Notes :

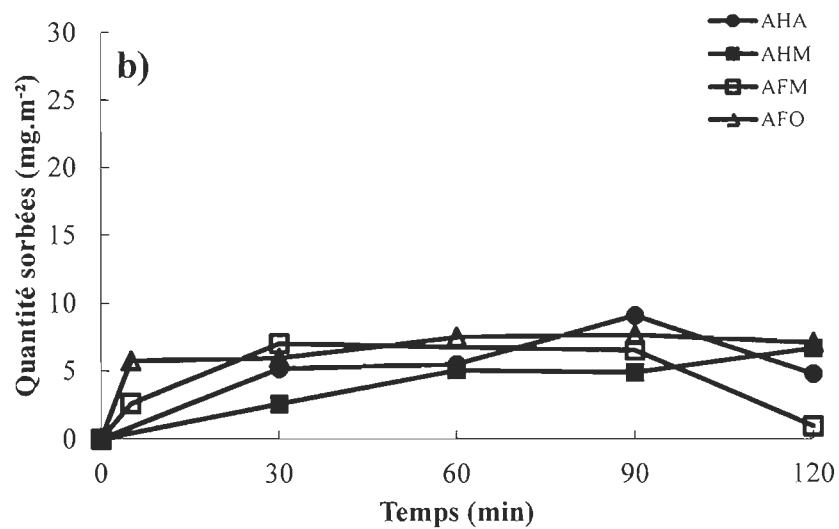
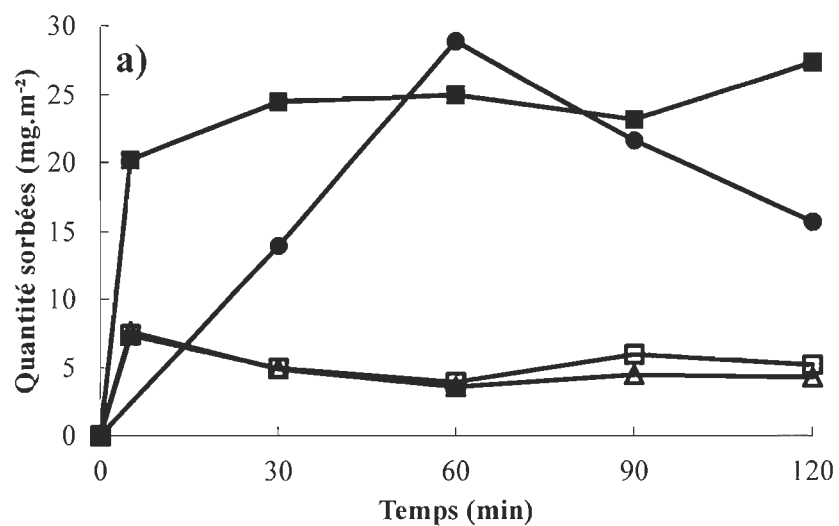
-Pour les microalgues des glaces et les échantillons très turbides, préfiltrer l'échantillon sur 20 μ m ou 40 μ m (e.g., BD Falcon Cell Strainer 40 μ m Nylon ref 352340)

-2 mL d'échantillon sont suffisants pour l'analyse en cytométrie en flux; un volume de 5 mL est recommandé pour plus de sûreté.

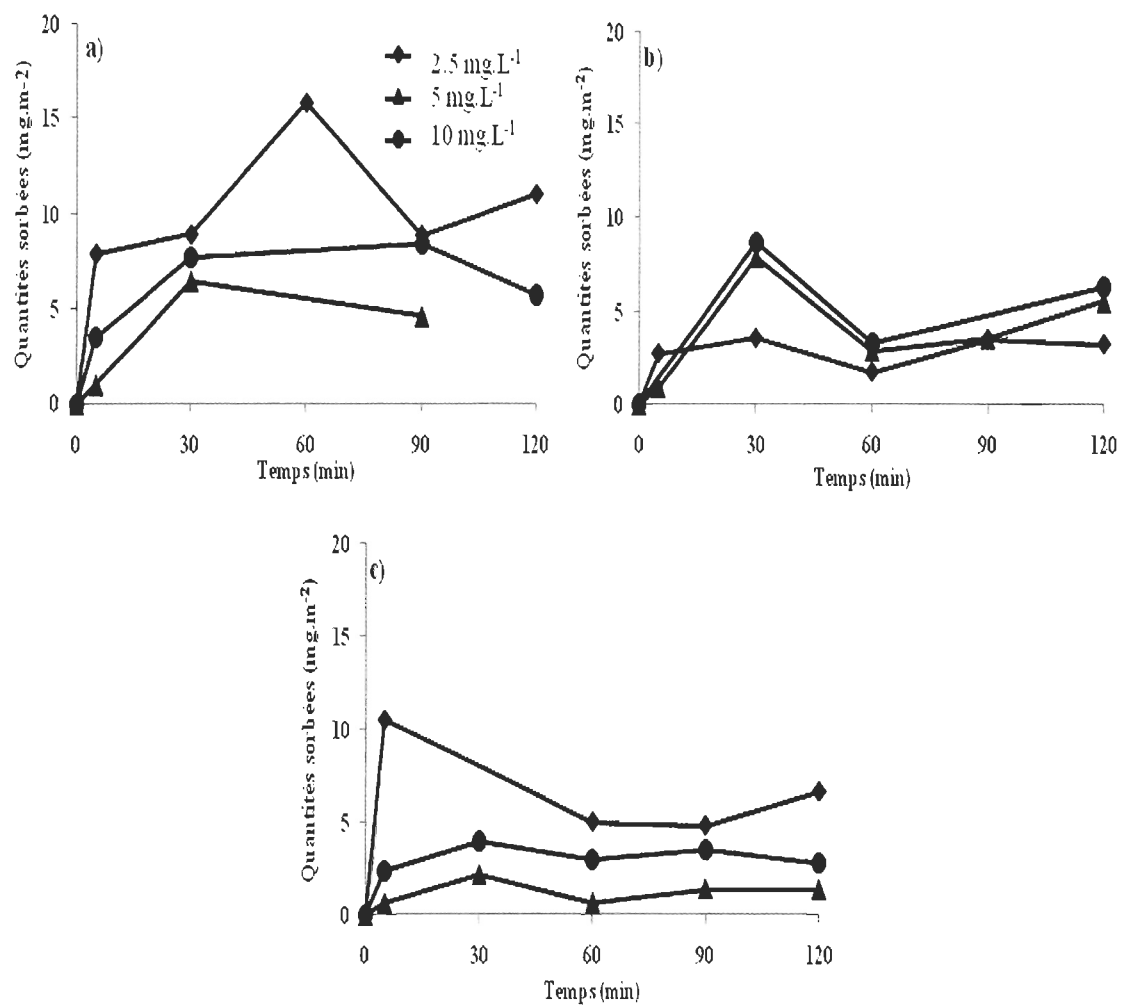
Claude Belzile ISMER,

13 mai 2009

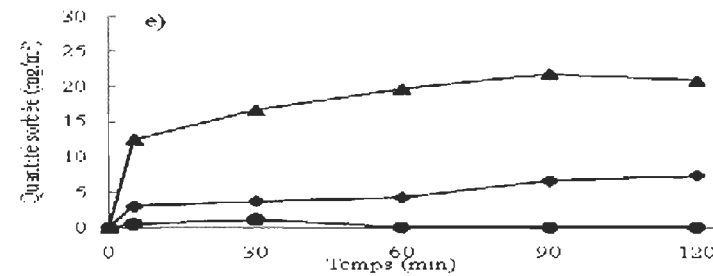
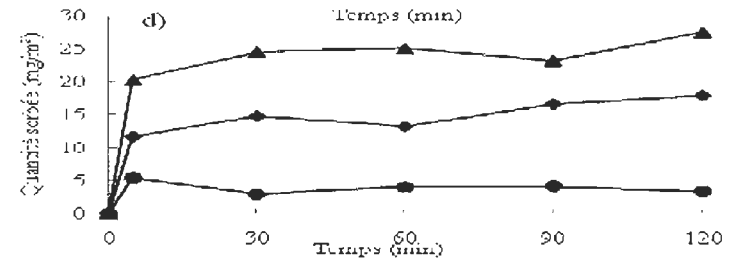
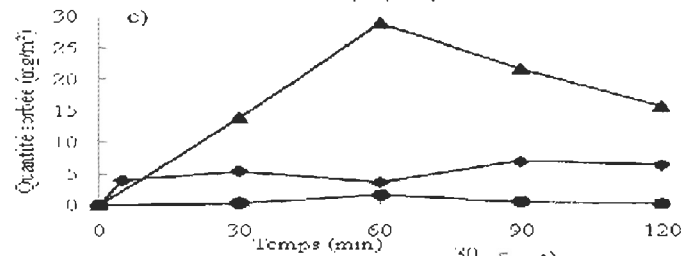
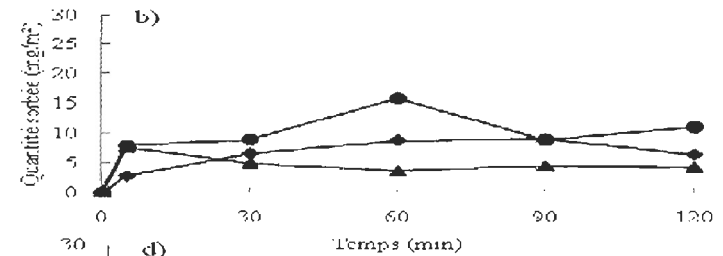
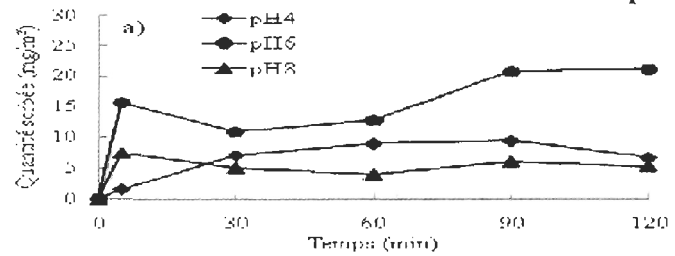
ANNEXE VI SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR *ISOCHRYSIS GALBANA* (a) ET *NANNOCHLOROPSIS OCVLATA* (b) À 25 PSU, pH 8 ET À 2.5 mg·L⁻¹



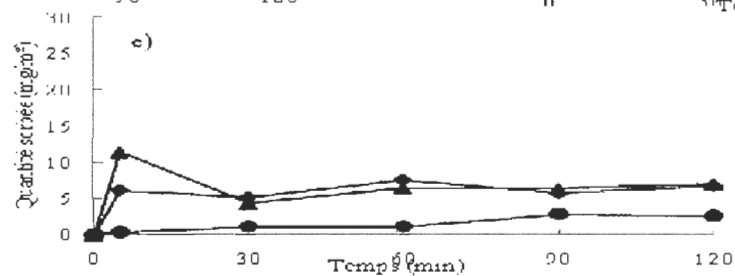
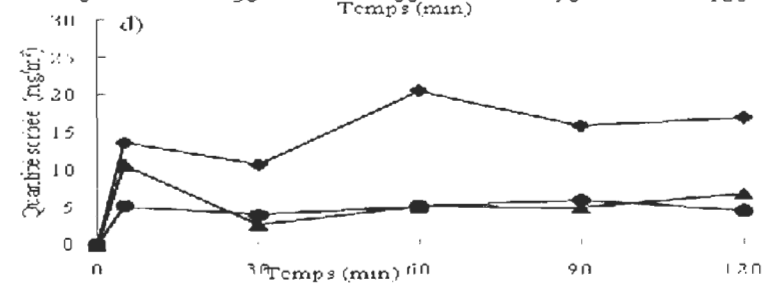
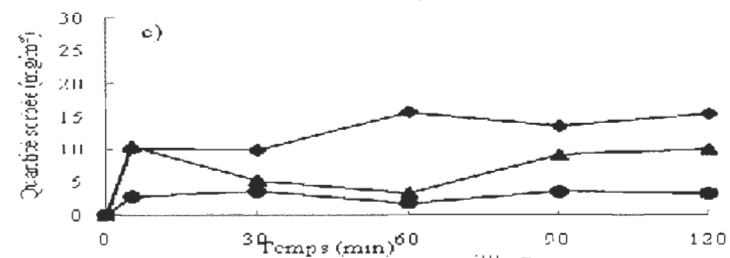
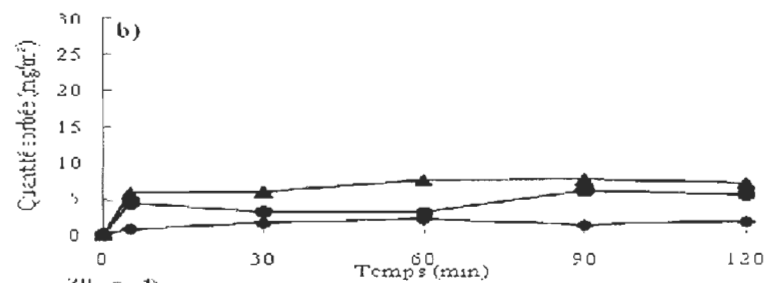
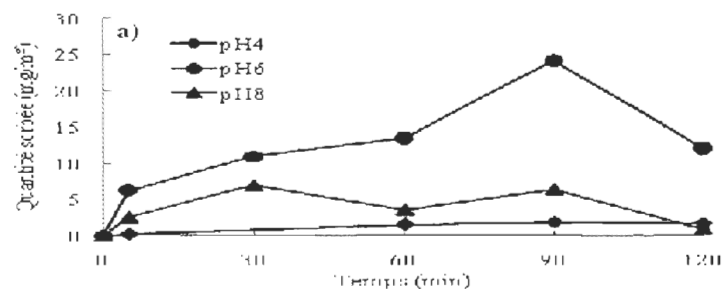
ANNEXE VII SORPTION DE DIFFÉRENTES SUBSTANCES HUMIQUES AFO
 SUR *ISOCHRYSIS GALBANA* À pH 6 ET 25 PSU (a), AHA SUR
NANNOCHLOROPSIS OCULATA À pH 6 ET 25 PSU (b) ET AHM
 SUR *NANNOCHLOROPSIS OCULATA* À pH 8 ET 25 PSU (c)



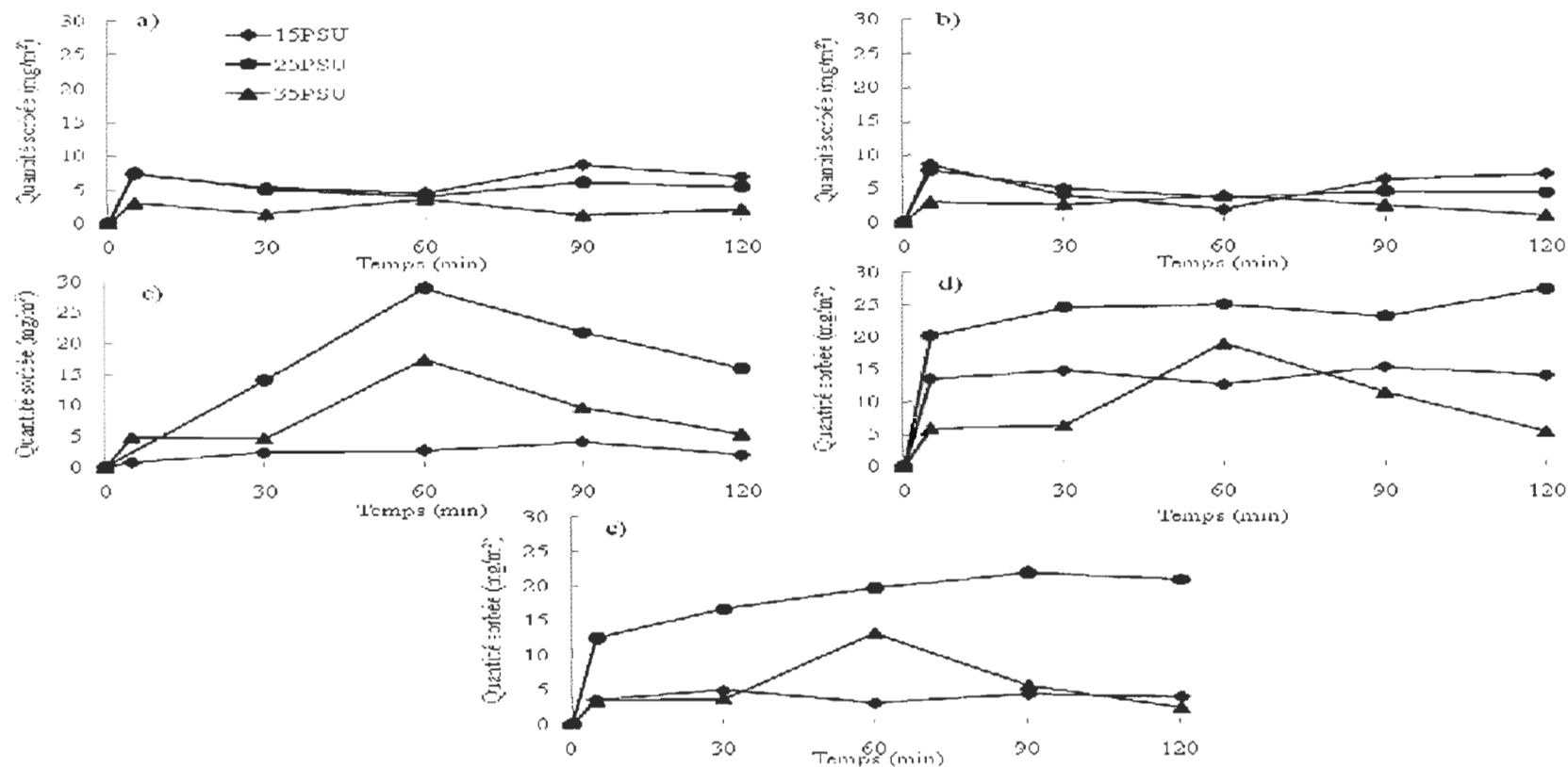
ANNEXE VIII CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR *ISOCHRYDIS GALBANA* À 25 PSU ET À DIFFÉRENTS pH AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)



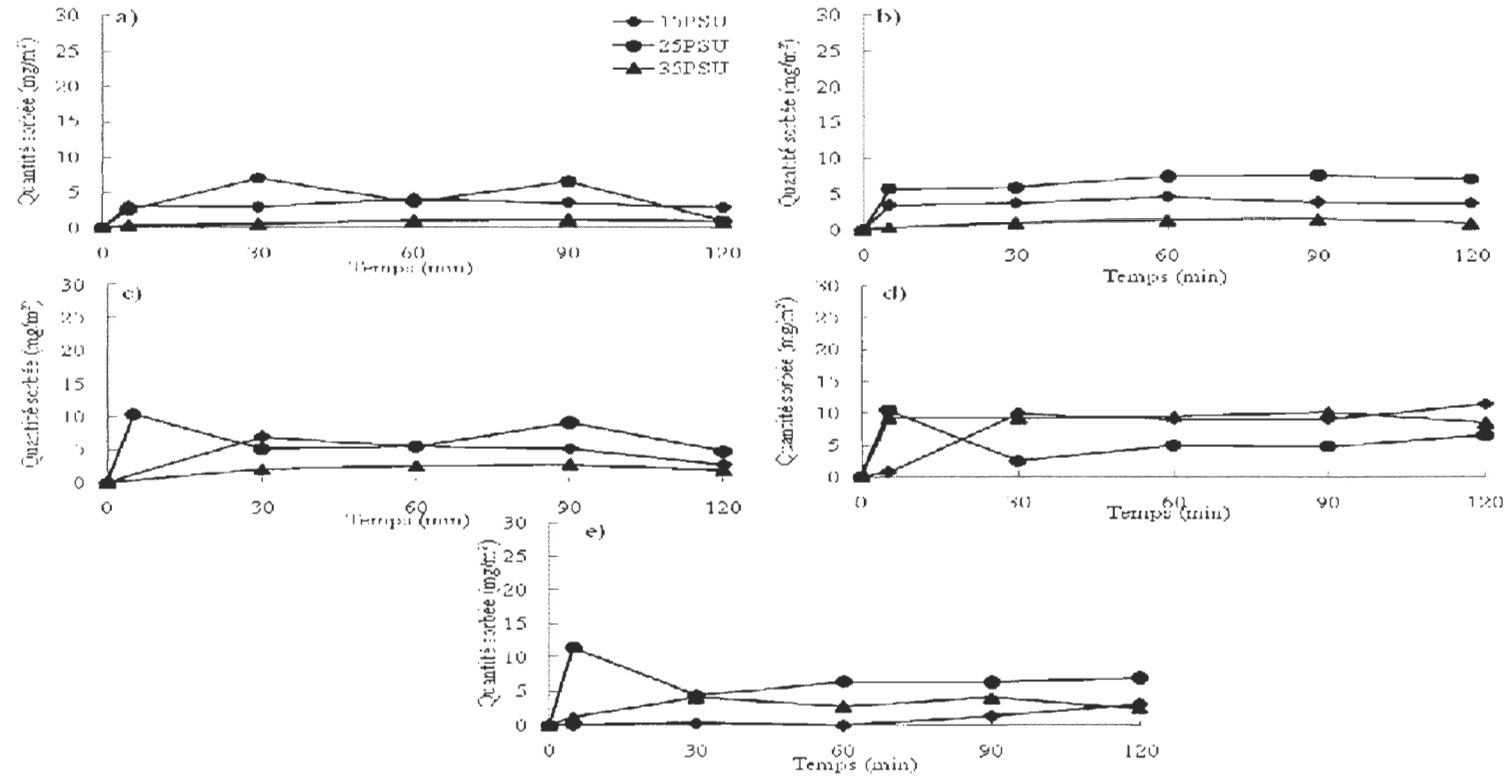
ANNEXE IX CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR *NANNOCHLOROPSIS OCULATA* À 25 PSU ET À DIFFÉRENTS pH AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)



ANNEXE X CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR *ISOCHRYSIS GALBANA* À pH 8 ET À DIFFÉRENTES SALINITÉS AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)



ANNEXE XI CINÉTIQUE DE SORPTION DES SUBSTANCES HUMIQUES SUR *NANNOCHLOROPSIS OCULATA* À pH 8 ET À DIFFÉRENTES SALINITÉS AFM (a), AFO (b), AHA (c), AHM (d) ET AHO (e)



BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Lail, L. I., Liu, Y., Atabek, A., & Camesano, T. A. (2007). Quantifying the adhesion and interaction forces between *Pseudomonas aeruginosa* and natural organic matter. *Environmental Science and Technology*, 41(23), 8031-8037.
- Abu-Rezq, T. S., Al-Musallam, L., Al-Shimmari, J., & Dias, P. (1999). Optimum production conditions for different high-quality marine algae. *Hydrobiologia*, 403(1985), 97-107.
- Aiken, G. R., Thurman, E. M., Malcolm, R. L., & Walton, H. F. (1979). Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. *Analytical Chemistry*, 51(11), 1799-1803.
- Alaoui, G., Léger, M. N., Gagné, J. P. & Tremblay, L. (2011). Assessment of estuarine sediment and sedimentary organic matter properties by infrared reflectance spectroscopy. *Chemical Geology*, 286(3-4), 290-300.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, A., Roberts, K. & Walter P. (2010). Membrane structure. In B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, A. Raff, K. Roberts, & Walter, P. (Eds.), *Essential cell biology* (3rd ed., pp. 363-386). New-York: Taylor & Francis Group.
- Alexeev, Y. E., Vasilchenko, I. S., Kharisov, B. I., Blanco, L. M., Garnovskii, A. D., & Zhdanov, Y. A. (2004). Review: synthetically modified carbohydrates as ligands. *Journal of Coordination Chemistry*, 57(17-18), 1447-1517.
- Allard, B., & Templier, J. (2000). Comparison of neutral lipid profile of various trilaminar outer cell wall (TLS)-containing microalgae with emphasis on algaenan occurrence. *Phytochemistry*, 54(4), 369-80.
- Alvarez-Puebla, R. A., & Garrido, J. J. (2005). Effect of pH on the aggregation of a gray humic acid in colloidal and solid states. *Chemosphere*, 59(5), 659-667.
- Alvarez-Puebla, R. A., Valenzuela-Calahorra, C., & Garrido, J. J. (2006). Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation. A molecular modelling approach. *The Science of the Total Environment*, 358(1-3), 243-254.
- Aminot, A., & Chaussepied, M. (1983). *Manuel des analyses chimiques en milieu marin*. (C.N.E.X.O. FRANCE, Ed.) (p. 395). Brest: CNEXO.
- Andersen, R. A., Berges, J. A., Harrison, P. J. & Watanabe, M. M. (2005). Appendix A- Recipes for freshwater and seawater media f/2 Medium. In R. A. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (p. 507). London: Elsevier Academic Press.
- Anonyme. (2011). Avril 2011. *Isochrysis galbana*. <https://ccmp.bigelow.org/node/1/strain/CCMP1324>.

- Ates, N., Kitis, M., & Yetis, U. (2007). Formation of chlorination by-products in waters with low SUVA correlations with SUVA and differential UV spectroscopy. *Water research*, 41(18), 4139-4148.
- Baalousha, M., Motelica-Heino, M., & Coustumer, P. L. (2006). Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 272(1-2), 48-55.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. (L. Barsanti & P. Gualtieri, Eds.) (p. 320). Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Blough, N. V., & Del Vecchio, R. (2002). Chromophoric DOM in the coastal environment. In D. A. Hansell & C. A. Carlson (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (pp. 509-546). San Diego: Academic Press.
- Boullemant, A., Gagné, J. P., Fortin, C., & Campbell, P. G. C. (2007). Interactions of hydrophobic metal complexes and their constituents with aquatic humic substances. *Environmental Chemistry*, 4(5), 323-333.
- Bricaud, A., Morel, A., & Prieur, L. (1981). Absorption by dissolved organic matter of the sea (yellow substance) in the UV and visible domains. *Limnology and Oceanography*, 26(1), 43-53.
- Brigante, M., Zanini, G., & Avena, M. (2007). On the dissolution kinetics of humic acid particles : Effects of pH, temperature and Ca^{2+} concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 294(1-3), 64-70.
- Brown, M. (1977). Transmission spectroscopy examinations of natural waters C. Ultraviolet spectral characteristics of the transition from terrestrial humus to marine yellow substance. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 5(3), 309-317.
- Buffle, J. A. E. (1977). Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minéraux. *Conference Proceedings de la Commission d'Hydrologie Appliquée de A.G.H.T.M.* (pp. 3-10). Paris: l'Université d'Orsay.
- Burkholder, J. A. M., Glibert, P. M., & Skelton, H. M. (2008). Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae*, 8(1), 77-93.
- Calvet, R., Barriuso, E., Bedos, C., Benoit, P., Charnay, M. P., & Coquet, Y. (2005). Rétention des pesticides dans le sol. In R. Calvet, E. Barriuso, C. Bedos, P. Benoit, M. P. Charnay, & Y. Coquet (Eds.), *Les pesticides dans le sol* (pp. 161-254). Edition France Agricole.
- Camci-Unal, G., & Pohl, N. L. B. (2009). Quantitative determination of heavy metal contaminant complexation by the carbohydrate polymer chitin. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55(3), 1117-1121.

- Campbell, P. G. C., Twiss, M., & Wilkinson, K. (1997). Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(11), 2543-2554.
- Cauwet, G. (2002). DOM in the coastal cone. In D. A. Hansell & C. A. Carlson (Eds.), (pp. 579-609). San Diego: Academic Press.
- Chen, C., Wang, X., Jiang, H., & Hu, W. (2007). Direct observation of macromolecular structures of humic acid by AFM and SEM. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302(1-3), 121-125.
- Chen, J., LeBoeuf, E. J., Dai, S., & Gu, B. (2003). Fluorescence spectroscopic studies of natural organic matter fractions. *Chemosphere*, 50(5), 639-647.
- Chen, Y. S., Senesi, N., & Schnitzer, M. (1977). Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Science Society of America Journal*, 41(2), 352-358.
- Chen, Y. S. & Schnitzer, M. (1978). Surface-tension of aqueous solutions of soil humic substances. *Soil Science*, 125, 7-15.
- Chen, Y., Katan, J., Gamliel, A., Aviad, T., & Schnitzer, M. (2000). Involvement of soluble organic matter in increased plant growth in solarized soils. *Biology and Fertility of Soils*, 32(1), 28-34.
- Cheng, M. L., Ho, H. Y., Chiu, D. T., & Lu, F. J. (1999). Humic acid-mediated oxidative damages to human erythrocytes: a possible mechanism leading to anemia in Blackfoot disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(3-4), 470-477.
- Chin, Y. P., Aiken, G. R., & O'Loughlin, E. (1994). Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, 28(11), 1853-1858.
- Chin, Y. P., Aiken, G. R., & Danielson, K. M. (1997). Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. *Environmental Science and Technology*, 31(6), 1630-1635.
- Coble, P. G. (1996). Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*, 51(4), 325-346.
- Coble, P. G. (2007). Marine optical biogeochemistry: the chemistry of ocean color. *Chemical Reviews*, 107(2), 402-418.
- Conte, P., & Piccolo, A. (1999). Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environmental Science and Technology*, 33(10), 1682-1690.
- Cory, R. M., & McKnight, D. M. (2005). Fluorescence spectroscopy reveals ubiquitous presence of oxidized and reduced quinones in dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*, 39(21), 8142-9.

- Crist, R. H., Oberholser, K., Schwartz, D., Marzoff, J., Ryder, D., & Crist, D. R. (1988). Interactions of metals and protons with algae. *Environmental Science and Technology*, 22(7), 755-760.
- Crist, R. H., Oberholser, K., Shank, N. & Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environmental Science and Technology*, 15(10), 1212-1217.
- Dean, A. P., Estrada, B., Nicholson, J. M., & Sigee, D. C. (2008). Molecular response of *Anabaena flos-aquae* to differing concentrations of phosphorus: A combined Fourier transform infrared and X-ray microanalytical study. *Phycological Research*, 56(3), 193-201.
- Derenne, S., Largeau, C., Berkloff, C., Rousseau, B., Wilhelm, C., & Hatcher, P. G. (1992). Non-hydrolysable macromolecular constituents from outer walls of *Chlorella fusca* and *Nanochlorum eucaryotum*. *Phytochemistry*, 31(6), 1923-1929.
- Doblin, M.; Blackburn, S. I. & Hallegraeff, G. M. (1999). Growth and biomass stimulation of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Graham) by dissolved organic substances. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(1), 33-47.
- Domenighini, A., & Giordano, M. (2009). Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification, and the assessment of water quality. *Journal of Phycology*, 45(2), 522-531.
- Edzwald, J. K., & Tobiason, J. E. (1999). Enhanced coagulation : US requirements and a broader view. *Water Science and Technology*, 40(9), 63-70
- Edzwald, J. K., & Van Benschoten, J. E. (1990). Aluminum coagulation of natural organic matter. In H. H. Hahn & R. Klute (Eds.), *Chemical Water and Wastewater Treatment* (pp. 341-359). Berlin: Springer.
- Eglinton, T., & Repeta, D. (2003). Organic matter in the contemporary ocean. *Treatise on Geochemistry*, 6, 145-180.
- Elayan, N. M., Treleaven, W. D., & Cook, R. L. (2008). Monitoring the effect of three humic acids on a model membrane system using ^{31}P NMR. *Environmental Science and Technology*, 42(5), 1531-1536.
- Emerson, S. R., & Hedges, J. I. (2008). *Chemical Oceanography and the Marine Carbon Cycle*. (S. R. Emerson & J. I. Hedges, Eds.) (p. 453). Cambridge: Cambridge University Press.
- Eriksson, M., Lindhorst, T. K., & Hartke, B. (2008). Differential effects of oligosaccharides on the hydration of simple cations. *The Journal of Chemical Physics*, 128(10), 105105.

- Findlay, S. E. G., & Sinsabaugh, R. L. (2003). *Aquatic Ecosystems Interactivity of Dissolved Organic Matter*. (S. E. G. Findlay & R. L. Sinsabaugh, Eds.) (p. 512). San Diego: Academic Press.
- Francioso, O., Sánchez-Cortés, S., Tugnoli, V., Marzadori, C., & Ciavatta, C. (2001). Spectroscopic study (DRIFT, SERS and ^1H NMR) of peat, leonardite and lignite humic substances. *Journal of Molecular Structure*, 565-566, 481–485.
- Gagnon, R., Levasseur, M., Weise, A. M., Fauchot, J., Campbell, P. G. C., Weissenboeck, B. J., Merzouk, A., Gosselin, M. & Vigneault, B. (2005). Growth stimulation of *Alexandrium tamarens* (*Dinophyceae*) by humic substances from the Manicouagan river (eastern Canada). *Journal of Phycology*, 41(3), 489–497.
- Gagné, J. P., Gouteux, B., Soubaneh, Y., & Brindle, J. (2011). Sorption of pesticides on natural geosorbents. In M. Stoytcheva (Ed.), *Pesticides - Formulations, Effects, Fate* (Vol. 2, pp. 785-802). Rijeka: Intech.
- Galgani, L., Tognazzi, A., Rossi, C., Ricci, M., Galvez, J. A., Dattilo, A. M., Cozar, A., Bracchini, L. & Loiselle, S. (2011). Assessing the optical changes in dissolved organic matter in humic lakes by spectral slope distributions. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 102(2), 132-139.
- Gelin, F., Boogers, I., Noordeloos, A. A. M., Sinninghe Damste, J. S., Riegman, R. & de Leeuw, J. W. (1997). Resistant biomacromolecules in marine microalgae of the classes *Eustigmatophyceae* and *Chlorophyceae*: Geochemical implications. *Organic Geochemistry*, 26(11-12), 659-675.
- Gelin, F., Volkman, J. K., Largeau, C., Derenne, S., Sinninghe Damsté, J. S. & de Leeuw, J. W. (1999). Distribution of aliphatic, nonhydrolyzable biopolymers in marine microalgae. *Organic Geochemistry*, 30(2-3), 147-159.
- Gelin, F., Boogers, I., Noordeloos, A., Damsté, J., Hatcher, P., & de Leeuw, J. W. (1996). Novel, resistant microalgal polyethers: An important sink of organic carbon in the marine environment? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(7), 1275–1280.
- Ghosh, K., & Schnitzer, M. (1980). Macromolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 129(5), 266-276.
- Giordano, M., Kansiz, M., Heraud, P., Beardall, J., Wood, B., & McNaughton, D. (2001). Fourier transform infrared spectroscopy as a novel tool to investigate changes in intracellular macromolecular pools in the marine microalga *Chaetoceros muellerii* (*Bacillariophyceae*). *Journal of Phycology*, 37(2), 271–279.
- Giordano, M., Ratti, S., Domenighini, A., & Vogt, F. (2009). Spectroscopic classification of 14 different microalga species: first steps towards spectroscopic measurement of phytoplankton biodiversity. *Plant Ecology and Diversity*, 2(2), 155-164.
- Gjessing, E. T. (1976). *Physical and Chemical Characteristics of Aquatic Humus* (p. 120). Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers.

- Granéli, E., Carlsson, P., & Legrand, C. (1999). The role of C, N and P in dissolved and particulate organic matter as a nutrient source for phytoplankton growth, including toxic species. *Aquatic Ecology*, 33(1), 17–27.
- Green, S. A., & Blough, N. V. (1994). Optical absorption and fluorescence properties of chromophoric dissolved organic matter in natural waters. *Limnology and Oceanography*, 39(8), 1903–1916.
- Gu, B., Schmitt, J., Chen, Z., Liang, L., & McCarthy, J. F. (1994). Adsorption and desorption of natural organic matter on iron oxide: mechanisms and models. *Environmental Science and Technology*, 28(1), 38–46.
- Gu, C., Karthikeyan, K. G., Sibley, S. D., & Pedersen, J. A. (2007). Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid. *Chemosphere*, 66(8), 1494–1501.
- Gualtieri P. (2011 Communication Personnel). Biophysics Institute of the National Council of Research (CNR), Pisa, Italy.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In W. L. Smith & M. H. Chanley (Eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals* (pp. 26–60). New-York: Plenum Press.
- Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8, 229–239.
- Guiry, M. D. (2011a). Avril 2011. *Isochrysis galbana*. http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=51696&sk=0&from=results.
- Guiry, M. D. (2011b). Avril 2011. *Nannochloropsis Oculata*. http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=59454&sk=0&from=results.
- Guéguen, C., Granskog, M. A., McCullough, G., & Barber, D. G. (2011). Characterisation of colored dissolved organic matter in Hudson Bay and Hudson Strait using parallel factor analysis. *Journal of Marine Systems*, 88(3), 423–433.
- Hansell, D. A. (2002). DOC in the global ocean carbon cycle. In D. A. Hansell & C. A. Carlson (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (pp. 685–715). San Diego: Academic Press.
- Hansell, D. A., & Carlson, C. A. (2001). Marine dissolved organic matter and the carbon cycle. *Oceanography, special Issue JGOFS*, 14(4), 41–49.
- Hasegawa, T. (2009). Intramolecular approach to investigating carbohydrate-carbohydrate interactions. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 21(122), 345–353.
- Hedges, J. I., & Keil, R. G. (1999). Organic geochemical perspectives on estuarine processes : Sorption reactions and consequences. *Marine Chemistry*, 65(1–2), 55–65.

- Heil, C. (2005). Influence of humic, fulvic and hydrophilic acids on the growth, photosynthesis and respiration of the dinoflagellate *Prorocentrum minimum* (Pavillard) Schiller. *Harmful Algae*, 4(3), 603-618.
- Helms, J. R., Stubbins, A., Ritchie, J. D., Minor, E. C., Kieber, D. J., & Mopper, K. (2008). Absorption spectral slopes and slope ratios as indicators of molecular weight, source, and photobleaching of chromophoric dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 53(3), 955-969.
- Herzberg, G., & Spinks, J. W. T. (1944). *Atomic Spectra and Atomic Structure*. (G. Herzberg & J. W. T. Spinks, Eds.) (2nd ed., p. 257). New-York: Dover publications.
- Hibberd, D. (1976). The ultrastructure and taxonomy of the *Chrysophyceae* and *Prymnesiophyceae* (*Haptophyceae*): a survey with some new observations on the ultrastructure of the *Chrysophyceae*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 72(2), 55-80.
- Hiemstra, T., Antelo, J., van Rotterdam, A. M. D., & van Riemsdijk, W. H. (2010). Nanoparticles in natural systems II: The natural oxide fraction at interaction with natural organic matter and phosphate. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(1), 59-69.
- Hillebrand, H., Dürselen, C. D., Kirschtel, D., Pollinger, U., & Zohary, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, 35(2), 403-424.
- Hirose, K. (2007). Metal-organic matter interaction: Ecological roles of ligands in oceanic DOM. *Applied Geochemistry*, 22(8), 1636-1645.
- Hseu, Y. (2002). Humic acid induces apoptosis in human endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182(1), 34-43.
- Huang, T.-S., Lu, F.-J., & Tsai, C.-W. (1995). Tissue distribution of absorbed humic acids. *Environmental Geochemistry and Health*, 17(1), 1-4.
- Huang, W., Peng, P., Yu, Z., & Fu, J. (2003). Effects of organic matter heterogeneity on sorption and desorption of organic contaminants by soils and sediments. *Applied Geochemistry*, 18(7), 955-972.
- Hunter R. A. et Liss, P. S. (1979). The surface charge of suspended particles in estuarine and coastal waters. *Nature* 282, 823-825.
- Kah, M., & Brown, C. D. (2006). Adsorption of ionisable pesticides in soils. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 188, 149-217
- Kaplan, D., Cohen, Z., & Abeliovich, A. (1986). Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. *Biomass*, 9(1), 37-48.

- Karasyova, T. A., Klose, E. O., Menzel, Ralph, & Steinberg, Christian E. W. (2007). Natural organic matter differently modulates growth of two closely related coccal green algal species. *Environmental Science and Pollution Research International*, 14(2), 88-93.
- Karp, G., & Bouharmont, J. (2010). Structure et fonction de la membrane plasmique. In D. Boeck (Ed.), *Biologie Cellulaire et Moléculaire* (3rd ed., pp. 122-181).
- Keller, J. U., & Staudt, R. (2004). *Gas Adsorption Equilibria: Experimental Methods and Adsorptive Isotherms*. (J. U. Keller & R. Staudt, Eds.) (1st ed., p. 436). Springer.
- Kile, D. E., Wershaw, R. L., & Chiou, C. T. (1999). Correlation of soil and sediment organic matter polarity to aqueous sorption of nonionic compounds. *Environmental Science and Technology*, 33(12), 2053-2056.
- Knauer, K., & Buffle, J. (2001). Adsorption of fulvic acid on algal surfaces and its effect on carbon uptake. *Journal of Phycology*, 37(1), 47-51.
- Kononova, M. M. (1966). *Soil Organic Matter, its Nature, its Role in Soil Formation and in Soil Fertility*. (Kononova MM, Ed.) (2nd ed., pp. 400-404). Oxford: Pergamon Press.
- Korshin, G. V., Li, C. W., & Benjamin, M. M. (1997). Monitoring the properties of natural organic matter through UV spectroscopy: a consistent theory. *Water Research*, 31(7), 1787-1795.
- Kosakowska, A., Nedzi, M., & Pempkowiak, J. (2007). Responses of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to iron and humic substances. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(5), 365-370.
- Koukal, B., Guéguen, C., Pardos, M., & Dominik, J. (2003). Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, 53(8), 953-961.
- Kowalczyk, P., Stonegiert, J., Cooper, W., Whitehead, R., & Durako, M. (2005). Characterization of chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Baltic Sea by excitation emission matrix fluorescence spectroscopy. *Marine Chemistry*, 96(3-4), 273-292.
- Kowalczyk, P., Durako, M. J., Young, H., Kahn, A. E., Cooper, W. J., & Gonsior, M. (2009). Characterization of dissolved organic matter fluorescence in the South Atlantic Bight with use of PARAFAC model: Interannual variability. *Marine Chemistry*, 113(3-4), 182-196.
- Kulikova, N. A., Perminova, I. V., Badun, G. A., Chernysheva, M. G., Koroleva, O. V., & Tsvetkova, E. A. (2010). Estimation of uptake of humic substances from different sources by *Escherichia coli* cells under optimum and salt stress conditions by use of tritium-labeled humic materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(18), 6223-30.

- Kupryszewski, G., Pempkowiak, J., & Kedzia, A. (2001). The effect of humic substances isolated from a variety of marine and lacustrine environments on different microorganisms. *Oceanologia*, 43(2), 257-261.
- Laglera, L. M., & Van den Berg, C. M. G. (2009). Evidence for geochemical control of iron by humic substances in seawater. *Limnology and Oceanography*, 54(2), 610–619.
- Lamelas, C., Pinheiro, J. P., & Slaveykova, V. I. (2009). Effect of humic acid on Cd(II), Cu(II), and Pb(II) uptake by freshwater algae: kinetic and cell wall speciation considerations. *Environmental Science and Technology*, 43(3), 730-735.
- Lamelas, C., Wilkinson, K. J., & Slaveykova, V. I. (2005). Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environmental Science and Technology*, 39(16), 6109-6116.
- Largeau, C., Derenne, S., Casadevall, E., Kadouri, A., & Sellier, N. (1986). Pyrolysis of immature Torbanite and of the resistant biopolymer (PRB A) isolated from extant alga *Botryococcus braunii*. Mechanism of formation and structure of torbanite. *Organic Geochemistry*, 10(4-6), 1023-1032.
- Lee, J., Park, J. H., Shin, Y. S., Lee, B. C., Chang, N. I., Cho, J., & Kim, S. D. (2009). Effect of dissolved organic matter on the growth of algae, *Pseudokirchneriella subcapitata*, in Korean lakes: the importance of complexation reactions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 335-343.
- Lee, R. E. (2008a). *Prymnesiophyta Prymnesiophyceae*. In R. E. Lee (Ed.), *Phycology* (4th ed., pp. 484-503). New York: Cambridge University Press.
- Lee, R.E. (2008b). *Heterokontophyta Eustigmatophyceae*. In R. E. Lee (Ed.), *Phycology* (4th ed., pp. 354-356). New-York: Cambridge University Press.
- Leenheer, J. A. (2009). Systematic approaches to comprehensive analyses of natural organic matter. *Annals of Environmental Science*, 3(1), 1-130.
- de Leeuw, J. W., & Largeau, C. (1993). A review of macromolecular organic compounds that comprise living organisms and their role in kerogen, coal and petroleum formation. In M. H. Engel & S. A. Macko (Eds.), *Organic Geochemistry, Principles and Applications* (pp. 23-72).
- de Leeuw, J. W., Versteegh, G. J. M., & Bergen, P. F. (2006). Biomacromolecules of algae and plants and their fossil analogues. *Plant Ecology*, 41(5), 209-233.
- Lide, D. R. (1994). Infrared correlation charts. In D. R. Lide (Ed.), *Handbook of Chemistry and Physics* (75th ed., pp. 9-79_9-81). Ann Arbor: CRC Press.
- Limousin, G., Gaudet, J., Charlet, L., Szenknect, S., Barthes, V., & Krimissa, M. (2007). Sorption isotherms: A review on physical bases, modeling and measurement. *Applied Geochemistry*, 22(2), 249-275.

- Lin, Y., Chang, F., Tsao, C., & Leu, J. (2007). Influence of growth phase and nutrient source on fatty acid composition of *Isochrysis galbana* CCMP 1324 in a batch photoreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 37(2), 166-176.
- Luthy, R. G., Aiken, G.R., Brusseau, M. L., Cunningham, S. D., Gschwend, P. M., Pignatello, J. J., Reinhard, M., Traina, S. J., Weber, W. J. & Westall, J. C. (1997). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environmental Science and Technology*, 31(12), 3341-3347.
- Lutz, I., Jie, Z., Opitz, R., Kloas, W., Ying, X., Menzel, R., & Steinberg, C. E. W. (2005). Environmental signals: synthetic humic substances act as xeno-estrogen and affect the thyroid system of *Xenopus laevis*. *Chemosphere*, 61(8), 1183-1188.
- MacCarthy, P. (2001). The principles of humic substances. *Soil Science*, 166(11), 738-751.
- Madari, B., Reevesiii, J., Machado, P., Guimaraes, C., Torres, E., & Mccarty, G. (2006). Mid- and near-infrared spectroscopic assessment of soil compositional parameters and structural indices in two Ferralsols. *Geoderma*, 136(1-2), 245-259.
- Malcolm, R. L., & MacCarthy, P. (1992). Quantitative evaluation of XAD-8 and XAD-4 resins used in tandem for removing organic solutes from water. *Environment International*, 18(6), 597-607.
- Malcolm, R. L., & MacCarthy, P. (1986). Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research. *Environmental Science and Technology*, 20(9), 904-911.
- Mal'tseva, E. V., Ivanov, A. A., & Yudina, N. V. (2009). Adsorption interactions of humic acids with biocides. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 83(11), 1981-1985.
- Mao, J., Tremblay, L., Gagné, J. P., Kohl, S., Rice, J., & Schmidtrohr, K. (2007). Humic acids from particulate organic matter in the Saguenay Fjord and the St. Lawrence Estuary investigated by advanced solid-state NMR. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(22), 5483-5499.
- Martin-Mousset, B., Croue, J. P., Lefebvre, E. & Legube, E. (1997). Distribution and characterization of dissolved organic matter of surface waters. *Water Research*, 31(3), 541-553.
- Matsunaga, K., Nishioka, J., Kuma, K., Toya, K., & Suzuki, Y. (1998). Riverine input of bioavailable iron supporting phytoplankton growth in Kesenuma Bay (Japan). *Water Research*, 32(11), 3436-3442.

- McKnight, D. M., Behmel, P., Francko, D. A., Gjessing, E. T., Münster, U., Petersen, R. C., Skulberg, O. M., Steinberg, C. E. W., Tipping, E. & Visser, S. A. (1990). Group Report How do Organic Acids Interact with Solutes, Surfaces, and Organisms? In in Perdue E. M., Gjessing E. T. (Eds.), *Group report. In: Organic Acids in Aquatic Ecosystems* (pp. 223-243). Dahlem Workshop Report, Wiley Interscience, New-York.
- Meinelt, T., Schreckenbach, K., Knopf, K., Wienke, A., Stüber, A., & Steinberg, C. E. W. (2004). Humic substances affect physiological condition and sex ratio of swordtail (*Xiphophorus helleri* Heckel). *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries*, 66(2), 239-245.
- Mohammady, N., & Fathy, A. (2007). Humic acid mitigates viability reduction, lipids and fatty acids of *Dunaliella salina* and *Nannochloropsis salina* grown under nickel stress. *International Journal of Botany*, 3(1), 64-70.
- Moura, M. N., Martín, M. J., & Burguillo, F. J. (2007). A comparative study of the adsorption of humic acid, fulvic acid and phenol onto *Bacillus subtilis* and activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 149(1), 42-48.
- Mourente, G., Lubian, L. M., & Odriozola, J. M. (1990). Total fatty acid composition as a taxonomic index of some marine microalgae used as food in marine aquaculture. *Hydrobiologia*, 203(3), 147-154.
- Muller, F. L. L. (1996). Measurement of electrokinetic and size characteristics of estuarine colloids by dynamic light scattering spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 331(1), 1-15.
- Murphy, E. M., Zachara, J. M., Smith, S. C., Phillips, J. L., & Wietsma, T. W. (1994). Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances. *Environmental Science and Technology*, 28(7), 1291-1299.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(11), 1527-1536.
- Nebbioso, A. (2009). Molecular rigidity and diffusivity of Al^{3+} and Ca^{2+} humates as revealed by NMR spectroscopy. *Environmental Science and Technology*, 43(7), 2417-2424.
- Neihof, R., & Loeb, G. (1972). The surface charge of particulate matter in seawater. *Limnology and Oceanography*, 17(1), 7-16.
- Neihof, R., & Loeb, G. (1974). Dissolved organic matter in seawater and the electric charge of immersed surfaces. *Journal of Marine Research*, 32(1), 5-12.
- Neporent, B. (1974). Spectroscopic investigations of intramolecular relaxations in organic complex molecules. *Pure and Applied Chemistry*, 37(1-2), 111-146.

- Novak, J. M., Mills, G. L., & Bertsch, P. M. (1992). Estimating the percent aromatic carbon in soil and aquatic humic substances using ultraviolet absorbance spectrometry. *Journal of Environmental Quality*, 21(1), 144-147.
- Paerl, H. (1988). Nuisance phytoplankton blooms in coastal, estuarine, and inland waters. *Limnology and Oceanography*, 33(4), 823-847.
- Pansu, M., & Gautheyrou, J. (2003). *L'analyse du sol minéralogique, organique et minérale*. (M. Pansu & J. Gautheyrou, Eds.) (p. 993). Paris: Springer.
- Parent, L., Twiss, M. R., & Campbell, P. G. C. (1996). Influences of natural dissolved organic matter on the interaction of aluminum with the microalga *Chlorella*: a test of the free-ion model of trace metal toxicity. *Environmental Science and Technology*, 30(5), 1713-1720.
- Perdue, E. M., & Ritchie, J. D. (2003). Dissolved organic matter in fresh waters. In J. I. Drever, H. D. Holland, & K. K. Turekian (Eds.), *Surface and Ground Water, Weathering, Erosion and Soils: Treatise on Geochemistry, Vol. 5* (pp. 273-318). Oxford: Elsevier-Pergamont.
- Peuravuori, J. (1997). Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*, 337(2), 133-149.
- Piccolo, A. (2001). The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 166(11), 810.
- Porcal, P., Koprivnjak, J., Molot, L., & Dillon, P. (2009). Humic substances-part 7: the biogeochemistry of dissolved organic carbon and its interactions with climate change. *Environmental Science and Pollution Research International*, 16(6), 714-726.
- Prakash, A., & Rashid, M. (1968). Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*, 13(4), 598-606.
- Prakash, A., Rashid, M., Jensen, A., & Rao, D. V. S. (1973). Influence of humic substances on the growth of marine phytoplankton: diatoms. *Limnology and Oceanography*, 18(4), 516-524.
- Quilès, F., Humbert, F., & Delille, A. (2010). Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75(2), 610-616.
- Renaud, S. M., & Parry, D. L. (1994). Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 6(3), 347-356.
- Rodríguez, M. C., & Cerezo, A. S. (1996). The resistant "biopolymer" in cell walls of *Coelastrum sphaericum*. *Phytochemistry*, 43(4), 731-734.

- Rodríguez, M. C., Nosedá, M. D., & Cerezo, A. S. (1999). The fibrillar polysaccharides and their linkage to algaenan in the trilaminar layer of the cell wall of *Coelastrum sphaericum* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 35, 1025–1031.
- Sánchez-Marín, P., & Beiras, R. (2011). Adsorption of different types of dissolved organic matter to marine phytoplankton and implications for phytoplankton growth and Pb bioavailability. *Journal of Plankton Research*, 33.
- Sánchez-Marín, P., Slaveykova, V. I., & Beiras, R. (2010). Cu and Pb accumulation by the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* in the presence of humic acids. *Environmental Chemistry*, 7(3), 309–317.
- Sandorfy, C., & Theophanides, T. (1984). *Spectroscopy of Biological Molecules: Theory and Applications - Chemistry, Physics, Biology and Medicine*. (C. Sandorfy & T. Theophanides, Eds.) (p. 660). Springer.
- Sathyendranath, S. (2000). *Remote Sensing of Ocean Colour in Coastal, and Other Optically-Complex, Waters*, reports of the International Ocean-Colour Coordination Group, no. 3. (p. 140), IOCCG, Dartmouth, Canada.
- Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M. & Imboden, D. M. (2002). *Environmental Organic Chemistry*. (Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M. & Imboden, D. M., Ed.) (2nd ed, p1000). New-York, Wiley Interscience.
- Seijo, M., Ulrich, S., Filella, M., Buffle, J., & Stoll, S. (2009). Modeling the adsorption and coagulation of fulvic acids on colloids by brownian dynamics simulations. *Environmental Science and Technology*, 43(19), 7265–7269.
- Senesi, N. (1992). Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Science of the Total Environment*, 123–124, 63–76.
- Senesi, N. (1999). Aggregation patterns and macromolecular morphology of humic substances: A fractal approach. *Soil Science*, 164(11), 841–856.
- Senesi, N., D'Orazio, V. & Ricco, G. (2003). Humic acids in the first generation of EUROSOILS. *Geoderma*, 116(3–4), 325–344.
- Sholkovitz, E. R. (1976). Flocculation of dissolved organic and inorganic matter during the mixing of river water and seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40(7), 831–845.
- Silverstein, R. M., Basler, C. G., & Morill, C. T. (1998a). Spectrométrie Ultraviolette. In De Boeck Université (Ed.), *Identification Spectrométrique des Composés Organiques* (5th ed., pp. 289–317). Paris.
- Silverstein, R. M., Basler, C. G., & Morill, C. T. (1998b). Spectrométrie infrarouge. In D. B. Université (Ed.), *Identification Spectrométrique des Composés Organiques* (5th ed., pp. 91–164). Paris.

- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2003). Applications de la spectrométrie infrarouge. In D. Boeck (Ed.), *Principes d'Analyse Instrumentale* (1st ed., pp. 420-421). Paris: Traduit en Français par Claudine Buess-Herman et Freddy Dumont.
- Somorjai, G. A. (1994). *Introduction of Surface Chemistry and Catalysis*. (G. A. Somorjai, Ed.) (p. 643). New-York: Wiley Interscience.
- Sparks, D. L. (1989). *Kinetics of Soil Chemical Processes*. (D.L Sparks, Ed.) (p. 210). San Diego: Academic Press.
- Sposito, G. (2008). *The Chemistry of Soils*. (G. Sposito, Ed.) (2nd ed., p. 344). New York: Oxford University Press.
- Stedmon, C. A., & Markager, S. (2005). Tracing the production and degradation of autochthonous fractions of dissolved organic matter using fluorescence analysis. *Limnology and Oceanography*, 50(5), 1415-1426.
- Steelink, C. (2002). Peer Reviewed: Investigating Humic Acids in Soils. *Analytical Chemistry*, 74(11), 326-333.
- Steinberg, C. E. W., Meinelt, T., Timofeyev, M., Bittner, M., & Menzel, R. (2008). Humic Substances: Part 2: Interactions with Organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, 2(15), 128-135.
- Steinberg, C. E. W., Kamara, S., Prokhot'skaya, V. Y., Manusadzianas, L., Karasyova, T. A., Timofeyev, M. A., Jie, Z., Paul, A., Meinelt, T., Farjalla, V. F., Matsuo, A. Y. O., Kent Burnison, B. & Menzel, R. (2006). Dissolved humic substances - ecological driving forces from the individual to the ecosystem level? *Freshwater Biology*, 51(7), 1189-1210.
- Stevenson, F. J. (1994). *Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions*. (F. J. Stevenson, Ed.) (2nd ed., p. 512). New York.: Wiley Interscience.
- Sutton, R., & Sposito, G. (2005). Molecular structure in soil humic substances: The new view. *Environmental Science and Technology*, 39(23), 9009-9015.
- Sutton, R., & Sposito, G. (2006). Molecular simulation of humic substance-Ca-montmorillonite complexes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(14), 3566-3581.
- Sutton, R., Sposito, G., Diallo, M. S., & Schulten, H. (2005). Molecular simulation of a model of dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 24(8), 1902-1911.
- Swift, R. S. (1999). Macromolecular properties of soil humic substances: Fact, fiction, and opinion. *Soil Science*, 164(11), 790-802.

- Tatzber, M., Stemmer, M., Spiegel, H., Katzlberger, C., Haberhauer, G., Mentler, A., & Gerzabek, M. H. (2007). FTIR-spectroscopic characterization of humic acids and humin fractions obtained by advanced NaOH, Na₄P₂O₇, and Na₂CO₃ extraction procedures. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 170(4), 522-529.
- Thurman, E.M. (1985). Amount of Organic Carbon in Natural Waters. In E. M. Thurman (Ed.), *Organic Geochemistry of Natural Waters* (pp. 7-65).
- Thurman, E. M., Malcolm, R. L., & Aiken, G. R. (1978). Prediction of capacity factors for aqueous organic solutes adsorbed on a porous acrylic resin. *Analytical Chemistry*, 50(6), 775-779.
- Thurman, E. M., & Malcolm, R. L. (1981). Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, 15(4), 463-466.
- Toledo, A. P. P., D'Aquino, V., & Tundisi, J. (1982). Influence of humic acid on growth and tolerance to cupric ions in *Melosira italica* (subsp. *subartica*). *Hydrobiologia*, 87(3), 247-254.
- Toledo, A., & Tundisi, J. G. (1980). Humic acid influence on the growth and copper tolerance of *Chlorella* sp. . *Hydrobiologia*, 263, 261-263.
- Traina, S. J., Novak, J., & Smeck, N. E. (1990). An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *Journal of Environmental Quality*, 19(1), 151-153.
- Tremblay, L. & Gagné, J. P. (2002). Fast quantification of humic substances and organic matter by direct analysis of sediments using DRIFT spectroscopy. *Analytical chemistry*, 74(13), 2985-2993
- Tremblay, L. & Gagné, J. P. (2007). Distribution and biogeochemistry of sedimentary humic substances in the St. Lawrence Estuary and the Saguenay Fjord, Québec. *Organic Geochemistry*, 38(4), 682-699
- Tremblay, L., & Gagné, J. P. (2009). Organic matter distribution and reactivity in the waters of a large estuarine system. *Marine Chemistry*, 116(1-4), 1-12. Tremblay, L., Kohl, S. D., Rice, J. A., & Gagné, J. P. (2005a). Effects of lipids on the sorption of hydrophobic organic compounds on geosorbents: a case study using phenanthrene. *Chemosphere*, 58(11), 1609-1620.
- Tremblay, L., Kohl, S. D., Rice, J. A., & Gagné, J. P. (2005b). Effects of temperature, salinity, and dissolved humic substances on the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to estuarine particles. *Marine Chemistry*, 96(1-2), 21-34.
- Vergnoux, A., Guiliano, M., Di Rocco, R., Domeizel, M., Théraulaz, F., & Doumenq, P. (2011). Quantitative and mid-infrared changes of humic substances from burned soils. *Environmental Research*, 111(2), 205-214.

- Vermeer, A. W. P., van Riemsdijk, W. H., & Koopal, L. K. (1998). Adsorption of humic acid to mineral particles. 1. Specific and electrostatic interactions. *Langmuir*, 14(10), 2810-2819.
- Vermeer, A. W. P., & Koopal, L. K. (1998). Adsorption of humic acids to mineral particles. 2. Polydispersity effects with polyelectrolyte adsorption. *Langmuir*, 14(15), 4210-4216.
- Vigneault, B., Percot, A., Lafleur, M., & Campbell, P. G. C. (2000). Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environmental Science and Technology*, 34(18), 3907-3913.
- Visser, S. A. (1982). Surface active phenomena by humic substances of aquatic origin. *Revue Francaise des Sciences de l'Eau*, 1, 285-296.
- Visser, S.A. (1983). Comparative study on the elementary composition of fulvic and humic acids of aquatic origin and from soils and microbial substrates. *Water Research*, 17(10), 1393-1396.
- Vogel, E., Geßner, R., Hayes, M. H. B., & Kiefer, W. (1999). Characterisation of humic acid by means of SERS. *Journal of Molecular Structure*, 482, 195-199.
- Wakeham, S., Lee, C., Hedges, J., & Hernes, P. (1997). Molecular indicators of diagenetic status in marine organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61(24), 5363-5369.
- Wauchope, R. D., Yeh, S., Linders, J. B. H. J., Kloskowski, R., Tanaka, K., Rubin, B., Katayama, A., Kördel, W., Gerstl, Z., Lane, M. & Unsworth, J. B. (2002). Pesticide soil sorption parameters: theory, measurement, uses, limitations and reliability. *Pest Management Science*, 58(5), 419-45.
- Weber, J. W. J., McGinley, P. M., & Katz, L. E. (1991). Sorption phenomena in subsurface systems: Concepts, models and effects on contaminant fate and transport. *Water Research*, 25(5), 499-528.
- Weise, A. M., Levasseur, M., Saucier, F. J., Senneville, S., Bonneau, E., Roy, S., Sauvé, G., Michaud, S. & Fauchot, J. (2002). The link between precipitation, river runoff, and blooms of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in the St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(3), 464-473.
- Weishaar, J. L., Aiken, George R., Bergamaschi, B. A., Fram, M. S., Fujii, R., & Mopper, K. (2003). Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. *Environmental Science and Technology*, 37(20), 4702-4708.
- Wells, M. L. (2002). Marine colloids and trace metal. In D.A. Hansell & C.A. Carlson (Eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter* (pp. 367-404). San Diego: Academic Press.

- Weng, L. P., Koopal, L. K., Hiemstra, T., Meeussen, J. C. L., & Van Riemsdijk, W.H. (2005). Interactions of calcium and fulvic acid at the goethite-water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(2), 325-339.
- White, M. C., Thompson, J. D., Harrington, G. W., & Singer, P. C. (1997). Evaluating criteria for enhanced coagulation compliance. *Journal of the American Water Works Association*, 89(5), 64-77.
- Wootton, E. C., Zubkov, M. V., Jones, D. H., Jones, R. H., Martel, C. M., Thornton, C. A., & Roberts, E. C. (2007). Biochemical prey recognition by planktonic protozoa. *Environmental Microbiology*, 9(1), 216-22.
- Yuan, W., & Zydney, A. L. (1999). Effects of solution environment on humic acid fouling during microfiltration. *Desalination*, 122(1), 63-76.
- Zhou, J. L., & Bank, C. J. (1992). Humic acid removal from water by biosorption. *Environmental Technology*, 13(8), 727-737.
- Zhou, J. L., & Banks, C. J. (1991). Removal of humic acid fractions by *Rhizopus arrhizus*: Uptake and kinetic studies. *Environmental Technology*, 12(10), 859-869.
- Zhu, C., & Lee, Y. (1997a). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 189-194.
- Zhu, C., & Lee, Y. (1997b). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 451-457.

