

La distribution spatiale des proliférations de cyanobactéries : surveillance et gestion de risques

Équipe de recherche

BIRD, David F., Université du Québec à Montréal

Dorner, Sarah, École Polytechnique

Fortin, Nathalie, Institut de recherche en biotechnologie, Conseil national de recherches Canada

Greer, Charles, Université McGill

Prairie, Yves T., Université du Québec à Montréal

Prévost, Michèle, École Polytechnique

Employés UQAM :

Arsenault, Julien

Boisvert, Jennifer

Camiré, Martine

Cloutier, Guillaume

Guindon, Alexandre

Lemyre-Charest, Dominic

Moukhina, Irina

Paquet, Serge

Parkes, Alice

Employés BRI :

Boisvert, Bruno

Bonnet, Claudie

Champagne, Julie

Juck, David

Maynard, Christine

Sirois, Josée

Wojciechowicz, Olivia

Partenaires

Conservation Baie Missisquoi

Chantal d'Auteuil et Johanne Bérubé, Organisme de Bassin Versant de la Baie Missisquoi

Municipalité de Venise-en-Québec

Municipalité de Saint Armand

Municipalité de Saint-Georges-de-Clarenceville

Hak, Louis

Chouinard, Frédéric, ministère du Développement durable, de l'environnement et des Parcs, Jonquière

Mochon, Alain, responsable du service de la conservation et de l'éducation, Parc national de la Yamaska

Giani, Alessandra, professeure, Departamento de Botanica, Universidade Federal de Minas Gerais, Brésil

Étudiants

Allain, Thibault, baccalauréat

Boisjoli, Geneviève, baccalauréat

Champagne-L'Anglais, Maude, baccalauréat

Desroches, Charles, baccalauréat

Duan, Hongmei, maîtrise, Université McGill

Hill, Lowine, baccalauréat

Matteau Lebrun, Frédérique, baccalauréat

McCarthy, Mark, doctorat

Munoz Ramos, Valentina, maîtrise, Université McGill

Renaud, Susan, doctorat

Roby, Isabelle, baccalauréat

Van Horne, Vincent, baccalauréat

Woo, Monica, baccalauréat

Notre projet avait trois objectifs principaux : 1) caractériser les rapports entre les caractéristiques physiques et chimiques des lacs, la présence, taxonomie, le comportement, la dynamique spatiale et temporelle des cyanobactéries, la météo et les risques de toxicité dans quelques lacs du Québec méridional, 2) examiner l'utilité des essais génétiques pour estimer l'abondance des cellules qui produisent les toxines, et 3) fournir une analyse taxonomique et toxicologique (coliformes, microcystines, endotoxines) des échantillons journaliers venant de l'étude épidémiologique sous la direction de l'axe 2 en 2009. En résumé très bref, nos efforts étaient concentrés sur un suivi temporel de la dynamique des cyanobactéries dans 4 lacs à risque pour les fleurs d'eau cyanobactériennes : Champlain, Roxton, William et Choinière. Nous avons aussi échantillonné moins intensivement d'autres lacs signalés par le MDDEP en 2009 et 2010. Nous n'avons pas encore terminé l'analyse, surtout des années 2008 et 2010. Ici, nous décrivons nos résultats les plus importants sorties à ce jour.

1. Identification des souches toxiques et comparaison entre les espèces présentes au Québec et les espèces d'ailleurs. Nous avons concentré nos efforts sur le dosage des microcystines, car ces toxines sont les plus souvent rencontrées. Il y avait trois espèces de cyanobactérie impliquées dans les événements de forte toxicité dans nos échantillons. De loin l'espèce la plus nocive était *Microcystis aeruginosa*. Dans la Fig. 1, on voit la distribution des valeurs dans nos échantillons de la toxicité par cellule de *M. aeruginosa*, en g de l'hépatotoxine microcystine. Cette distribution correspond très bien avec le contenu cellulaire observée ailleurs dans le monde. Notamment, la supposition utilisée pour formuler les seuils d'alerte de l'OMS (Falconer et al. 1999) est qu'il y ait 200 fg de microcystine par cellule cyanobactérienne dans l'environnement. Le contenu moyen dans nos mesures, de 150 fg par cellule (fleche bleue), n'est pas loin de la valeur de 200 fg par cellule (fleche rouge) utilisée pour formuler les seuils d'alerte de 20,000 et 100,000 cellules par ml, ce qui équivaldrait à 4 et 20 µg de microcystine par L si la totalité des cellules sont de cette espèce nocive. Le contenu médiane de nos observations était de 40 fg par cellule (fleche jaune), pourtant. Alors, d'après nos résultats, quand un lac est dominée par cette espèce, les seuils d'alerte OMS devraient être respectés au Québec. Il est à noter quand même que ces seuils sont 10 à 100 fois trop sévère dans la majorité des cas.

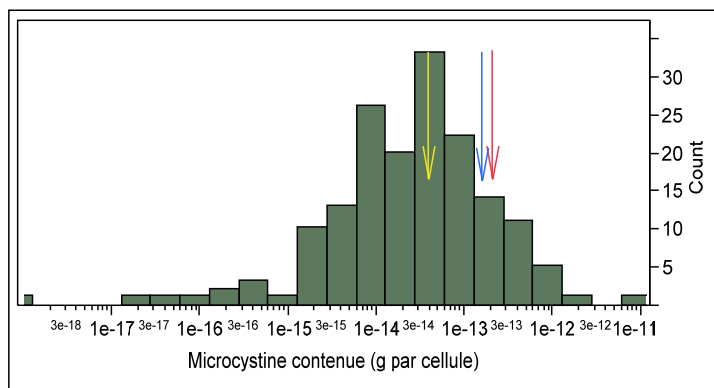


Fig. 1. Distribution des valeurs de la toxicité par cellule de *Microcystis aeruginosa* dans nos échantillons des communautés naturelles.

L'abondance de *Microcystis aeruginosa* explique presque la totalité de la variation de la concentration de la microcystine dans les lacs échantillonnés (Fig. 2). Pourtant, elle n'est pas la seule espèce produisant de la microcystine. Certains lacs présentent un risque dû aux fleurs d'eau composés de *Woronichinia* (Fig. 3). Néanmoins, des fleurs d'eau de forte toxicité non basées sur *Microcystis* sont très rares. Les fortes accumulations d'*Anabaena* et *Aphanizomenon* pourraient poser un risque associé à d'autres toxines, comme l'anatoxine ou des lipopolysaccharides, mais elles ne constituent un risque au niveau des microcystines que rarement dans les lacs que nous avons échantillonné – une seule fleur d'eau dominée par *Anabaena* au Lac Roxton, parmi nos centaines d'échantillons, posait un risque de toxicité.

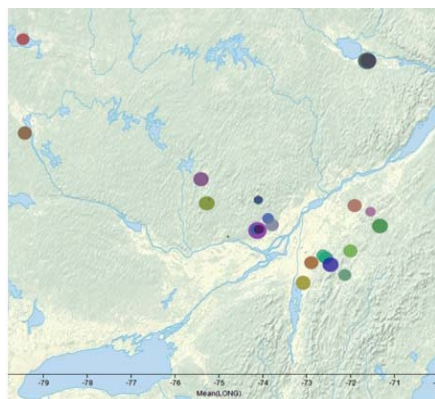


Fig. 2. Disposition des lacs étudiés en 2009, et leur contenu en microcystines. Pour vous situez, les lacs indiqués par les marqueurs à l'extrême gauche sont en Abitibi-Témiscamingue, et le lac à droite en haut est à coté du Lac Saint-Jean. Le volume des marqueurs est proportionel au logarithme de la concentration moyenne de microcystine, ce qui tend à uniformiser l'allure. Les même lacs figurent dans la figure suivante, mais sans la carte arrière. La gamme de concentrations rencontrées en 2008 et 2010 étaient très semblable : de 0, jusqu'à plus que 1000 µg par L.

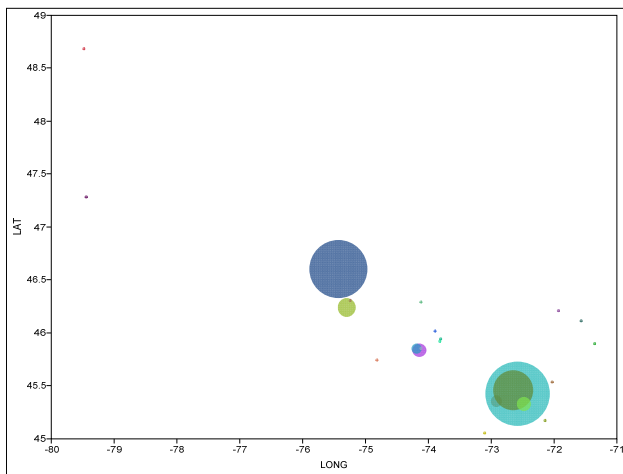


Fig. 3. Cette fois, sur la carte sans topographie, les bulles correspondent à l'abondance des cellules de *Woronichinia* toxigène. Les lacs ayant une forte concentration de cette espèce étaient Choinière, Ouellette et Roxton. *Woronichinia* n'était pas si commune que *Microcystis*, mais elle contenait un peu plus de toxine par unité de poids.

La troisième espèce toxigène repérée était *Planktothrix*. Cette espèce pose un risque unique car elle habite en forte accumulations dans les couches profondes du lac, jusqu'à ce qu'un orage les amène à la surface pour accumuler sur la berge, soudainement et sans préavis. Les seuls lacs à fleurs d'eau de cette espèce dans nos échantillons étaient les lacs Vert et Kenogamichiche, en Saguenay. Un autre lac, dans la Montérégie, renferment une population importante de ces cyanobactéries dans les eaux profondes : le lac Bromont. Nous avons remarqué, pour cette espèce, que les colonies composantes des fleurs d'eau intenses mais éphémères ne disparaissent pas. Dans les jours après leur disparition, elles se trouvent sur le fond dans un tapis aussi toxique qu'elles ne l'étaient dans leur manifestation dans l'écume à la surface. Cette espèce régule sa position dans la colonne d'eau, activement, et elle possède une manière à se concentrer en grosse particules quand la lumière est forte, afin de mieux migrer et se protéger contre les dommages.

2. Isolation des souches toxigènes Nous avons isolé et nous gardons en culture environ 75 souches de Cyanobacteria actuellement. Nous les avons transférées aussi à la « Canadian Phycological Culture Centre », maintenue à l'Université de Waterloo. Les espèces isolées viennent des genres *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanocapsa*, *Aphanothece*, *Coelosphaerium*, *Pseudanabaena*, *Anabaena*, et *Oscillatoria*. Nous avons isolé les souches de *Planktothrix rubescens* du Lac Vert qui produisent de la microcystine, la souche potentiellement responsable de la mortalité de chiens à ce lac (et potentiellement ailleurs). Nous avons aussi isolé une souche d'*Anabaena*, du Lac William, qui contient le gène pour la production de la neurotoxine *anatoxine-a*, qui probablement aussi, dans son tour, responsable de la mortalité des chiens à William et ailleurs. Il s'agit de la seule souche maintenue à la centre de culture phycologique à Waterloo pour laquelle la production de l'anatoxine est confirmée. L'utilisation d'une amorce d'ADN pour la détection du gène de l'anatoxine nous permet maintenant de dénombrer par le biais de la PCR des cellules qui produisent cette neurotoxine si dangereuse pour les animaux (voir le succès de l'utilisation de la biologie moléculaire dans la section 7 ci-basse).

3. Modèles prédictifs de la concentration de microcystine et de l'abondance des souches toxigènes En absence d'information sur la taxonomie de la communauté phytoplanctonique, les variables environnementales qui indiquent que les conditions sont propices pour le développement des communautés toxiques se résument dans ce modèle, en ordre d'importance :

$$\begin{aligned} \text{Log Microcystines } (\mu\text{g par L}) &= -2.76 + 3.62 \log \text{ NT} - 0.36 \log \text{ NO}_3 \\ &\quad - 0.70 \log \text{ Secchi} - 0.83 \log \text{ ND} \\ &\quad + 0.03 \text{ Température de l'eau} \\ n &= 174, R^2 = 0.55 \end{aligned}$$

où NT = azote total, NO₃ = concentration de nitrate, Secchi est la transparence de l'eau mesurée avec la disque de Secchi, ND est l'azote total dissous, et la température de l'eau était prise à la surface lors de l'échantillonnage. L'azote total seul explique presque la totalité de cette relation. Quand l'on modélise la

relation seulement avec la biomasse des espèce toxigéniques, on augmente la coefficient de détermination, R^2 , légèrement, à 0.60 :

$$\begin{aligned} \text{Log Microcystines } (\mu\text{g par L}) &= 2.72 + 0.162 \log [\textit{Microcystis aeruginosa}] \\ &+ 0.041 \log [\text{autres espèces de } \textit{Microcystis}] \\ &+ 0.029 \log [\textit{Anabaena flos-aquae}] \\ &+ 0.023 \log [\textit{Woronichinia}] \\ n &= 366, R^2 = 0.60 \end{aligned}$$

où la biomasse des espèces est en unités de g de carbone par L. Ici, *Microcystis aeruginosa* est de loin la variable la plus importante dans le modèle. Combiné, le R^2 monte à 0.61 :

$$\begin{aligned} \text{Log Microcystines } (\mu\text{g par L}) &= 0.13 + 0.089 \log [\textit{Microcystis aeruginosa}] + 2.33 \log \text{NT} \\ &- 0.29 \log \text{NO}_3 + 0.062 \log [\textit{Planktothrix}] - 0.029 \log \text{ND} \\ n &= 228, R^2 = 0.61 \end{aligned}$$

Si l'accumulation de quantités importantes de *Microcystis* mène à des problèmes de toxicité, qu'est-ce qui explique sa propre biomasse? Il n'y a que deux variables corrélées à cette biomasse : la concentration de l'azote totale (positivement) et l'azote dissout (négativement). Le phosphore n'est pas une bonne variable pour la prédire, malgré son importance centrale dans la formation de la biomasse totale du phytoplancton. En même temps, l'azote est corrélé positivement avec la concentration des microcystines par cellule de *Microcystis*, ce qui amène un effet multiplicatif.

4. Caprices du recrutement et de la formation des écumes à la surface Comme indiqué en détail lors du rencontre de de mi-chemin de cette subvention, nous avons constaté que le recrutement des cyanobactéries des sédiments vers la colonne d'eau dépend de façon imprévisible du *brassage par le vent* (e.g. Misson 2012) et les conditions chimiques des sédiments. Il y a un facteur confondant dans la forme de *l'anoxie près des sédiments*, soutenu par les expériences de Brunberg et Blomqvist (2002). L'anoxie des sédiments pourrait garder l'intégrité des cyanobactéries dormantes sur le fond pendant l'hiver, et il pourrait jouer un rôle dans la flottabilité des colonies, selon une hypothèse de Reynolds, selon laquelle les colonies de cyanobactéries migrent et restent sur le fond l'hiver par le biais d'un précipité de fer sur l'extérieur. Ce précipité sera dissout dans les conditions d'anaérobie le printemps-été, favoriser par une augmentation de température.

5. Les endotoxines Une question embêtante est soulevée par le fait que les cyanobactéries sont des bactéries gram-négatives, et alors leurs membranes extérieures sont constituées des lipopolysaccharides (LPS), ou « endotoxines ». L'introduction des endotoxines dans le sang est très nocive; la consommation est beaucoup moins problématique mais son effet demeure un inconnu. Un effort substantiel de notre projet était dirigé vers le développement et vérification d'un protocole pour le dosage des lipopolysaccharides. Nos expériences ont fourni un protocole qui semble fiable. Notamment, nous avons pu démenti les propos de Bernardova et al. (2008) qui ont suggéré qu'un protocole extrêmement long et cher et fastidieux était nécessaire pour éviter des biais associés à la présence de l'acide ribonucléique (ARN) dans les extraits de LPS. Nous avons démontré que le RNase utilisé à forte concentration dans leur protocole est capable de décomposé les LPS aussi bien que l'ARN. Sans cet embêtement, nous avons pu doser les LPS dans nos échantillons (Figs. 4a, et b). Il y a pourtant un bémol à cet exploit. Nous avons constaté, et la littérature confirme, qu'il y a une perte des LPS entreposés dans la congélateur pour des longues périodes. Alors, il se peut que nos mesures sous-estiment la concentration originale. Néanmoins, les niveaux observés correspondent aux valeurs attendues. En fait, selon Rapala et al. (2002) et Stewart et al. (2006), les endotoxines des cyanobactéries axéniques sont très faibles d'activité. Les endotoxines environnementales ne sont pas corrélées à l'abondance des cyanobactéries, mais plutôt aux bactéries hétérotrophes associées aux fleurs d'eaux. Ceci correspond à nos observations.

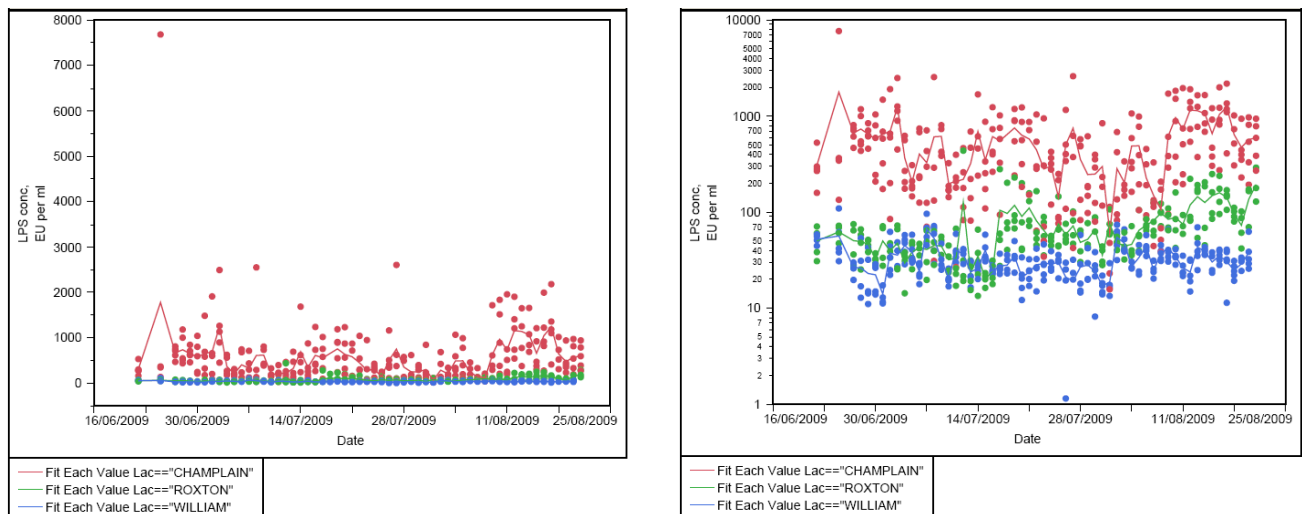


Fig. 4. a. Les concentrations des endotoxines dans la zone littorale des trois lacs Champlain, Roxton et William, pendant la saison de récréation de juin à la fin août, 2009. Cette graphique est sur une échelle arithmétique, ce qui cache les faibles valeurs des lacs Roxton et William. **b.** La graphique à droite présente les mêmes résultats, mais cette fois, sur une échelle logarithmique. Un examen des résultats de plus près démontre que les endotoxines s’accumulent dans zones littorales, près des rives, à la surface, précisément où le public entre dans les eaux. Ces endotoxines viennent des bactéries naturelles vivant dans les eaux du lac; les cyanobactéries contribuent un peu à cette activité mais elles ne sont que d’importance secondaire. Elles vont contribuer à l’accumulation des endotoxines par production de matières dégradables et de la pourriture.

6. Les toxines extracellulaires (dissoutes) La microcystine dissoute n’existe pas à des niveaux préoccupante dans nos lacs à l’étude. Dans tous nos échantillons de tous les lacs problématiques de 2009 et 2010, la concentration maximale observée de cette toxine, dissoute, était de 5.7 µg/L en 2009 et 1.6 µg/L en 2010. Sur les 797 observations prises dans les zones littorales des lacs pour l’étude épidémiologique en 2009, une seule a dépassé le seuil à boire à vie de 1.5 µg/L – à seulement 2.5 µg par L. Parmi toutes nos observations en 2009 sur l’ensemble des lacs visité, 506 sur 583 observations étaient sous la limite de détection, seulement 14 sur 583 dépassaient 1.5, et aucune excédé 10 µg/L. La microcystine dissoute n’est pas à craindre dans nos lacs (Figs. 5 a, b).

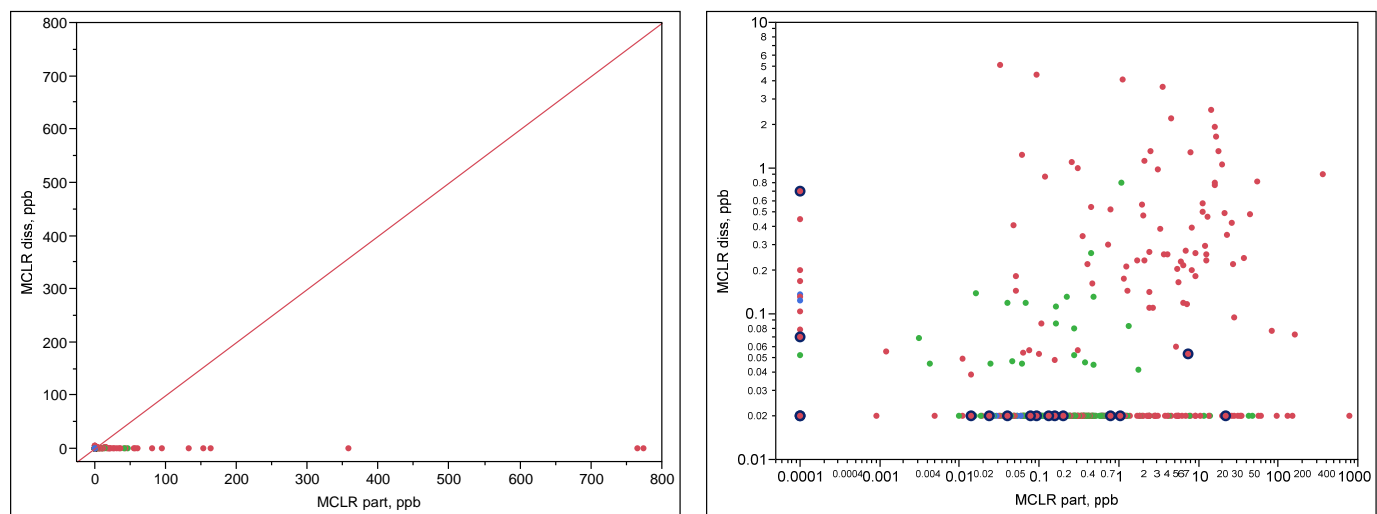
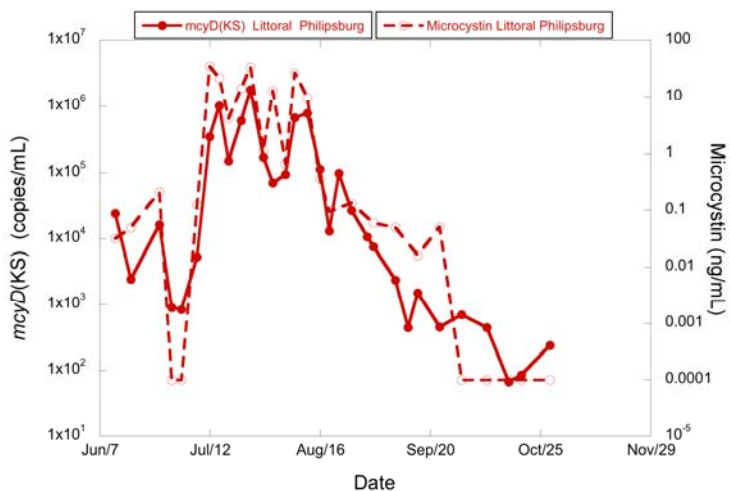


Fig. 5. a. La figure à gauche montre la relation entre la concentration de la microcystine dissoute, sur l’axe vertical, et la microcystine particulaire à même site, sur l’axe horizontal. La droite rouge est la droite d’égalité entre les deux formes. Sur la même échelle, l’on voit que la toxine dissoute n’est pas comparable. **b.** L’on peut voir les valeurs des toxines dissoutes que sur un axe logarithmique, dans la graphique à droite. Champlain = rouge, Roxton = vert.

7. Le dépistage des fleurs d'eau toxigéniques par la biologie moléculaire Les membres de l'équipe de l'IRB étaient responsables des analyses en biologie moléculaire. Ils ont fourni un rapport final de 39 pages totales, que nous devons résumer ici dans quelques figures, et paragraphes. Les objectifs étaient 1) de suivre la dynamique des bactéries coliformes dans les lacs sous étude épidémiologique, pour éliminer l'influence de ces organismes sur l'estimation de l'impact des algues bleues sur la santé des riverains, et 2) de développer des outils pour le dépistage des risques associés à des organismes génétiquement aptes à produire des toxines. Pour réussir à dépister des cellules capables de produire de la microcystine, un protocole de PCR quantitative (« à temps réel ») était développé (Fig. 6).

Fig. 6. Le nombre de copies du gène *mcyD* par millilitre coïncide très étroitement avec la concentration de l'hépatotoxine microcystine dans la zone littorale de Philipsburg. La précision du dénombrement des gènes est bien supérieure à la méthode standard, par microscopie. Cette dernière est laborieuse et facilement susceptible à des erreurs importantes. Dans cette série temporelle, nous pourrions remarquer l'évènement de recrutement des souches toxiques des sédiments, qui est survenu vers le début juillet. Lors d'un gros orage, le nombre de cellules toxiques dans la colonne d'eau a augmenté de quelques milliers de fois à l'intérieur de 2 à 3 jours. Nous sommes intéressés non seulement par les causes de recrutement, mais aussi par les facteurs qui mènent à la disparition des fleurs d'eau et de leur retour aux sédiments.



Les conclusions les plus importantes de ces études des dynamiques en génétiques se résument ainsi. Cette étude nous a permis d'évaluer la dynamique des fleurs d'eau sur deux années consécutives. De fortes variations ont été observées à l'aide de la méthode de PCR en temps réel entre les campagnes d'échantillonnage de 2008 et de 2009 pour tous les lacs. Le nombre de copies du gène *mcyD*(KS) par mL d'eau a varié de façon considérable entre années et même entre jours de la même semaine dans les stations pendant ces deux années. Par exemple, il y avait 44 fois moins de copies/mL dans la station littorale du lac Roxton le 25 août 2009 par rapport au 28 août 2008. Les épisodes importants de fleurs d'eau ont été observés sensiblement pendant les mêmes périodes cependant pour la baie Missisquoi dans les stations littorale et pélagique de Philipsburg et pour le réservoir Choinière dans la station littorale. Par exemple, le nombre le plus élevé de copies par mL d'eau a été identifié à la baie Missisquoi le 28 juillet en 2008 et le 25 juillet en 2009. Similairement, le maximum de copies pour le réservoir Choinière a été enregistré le 14 août en 2008 et le 11 août en 2009. En ce qui concerne le lac Roxton, le maximum de copies par mL d'eau a été identifié le 28 août en 2008 et le 24 septembre en 2009. Il y a tout de même eu une hausse importante dans la station littorale qui a été observée le 11 août 2009.

Des concentrations importantes de *E.coli* et de coliformes ont été observées le 19 juillet dans les stations littorales de Clarenceville et de Venise-en-Québec (plage dans la baie de Venise) de la baie Missisquoi. Ces concentrations ne correspondent pas à la période où le nombre de copies du gène *mcyD*(KS) était le plus élevé dans ces secteurs. Le même scénario a été observé au début du mois de juin et à la fin octobre au lac Roxton au niveau de la plage de la station 1. Ces résultats démontrent l'importance de faire un suivi de la qualité bactériologique des eaux de baignade des plages même si les cyanobactéries ne sont pas visibles à l'oeil nu ou si elles sont présentes en faible quantité.

La méthode de PCR en temps réel a permis une détection précoce des cyanobactéries qui ont le potentiel de produire des toxines. Pendant la campagne d'échantillonnage de 2009, le gène *mcyD*(KS) a été détecté dans le littoral de Philipsburg (baie Missisquoi) dès le 26 avril et dans les deux stations du lac Roxton à partir du 28 mai. Pour le réservoir Choinière, un petit nombre de copies a été observé le 30 juin, au début de la campagne d'échantillonnage. Dans cette étude, le gène a été amplifié avant que les cyanobactéries soient visibles et avant que les concentrations de toxines soient au dessus de la limite de détection. Cet outil pourrait être utilisé en début de saison (début du mois de mai) pour évaluer quels sont les lacs qui contiennent des cyanobactéries qui ont la capacité de produire des toxines. Si

le gène est détecté au printemps, ces lacs pourrait faire l'objet d'un suivi plus serré pendant la période propice aux fleurs d'eau.

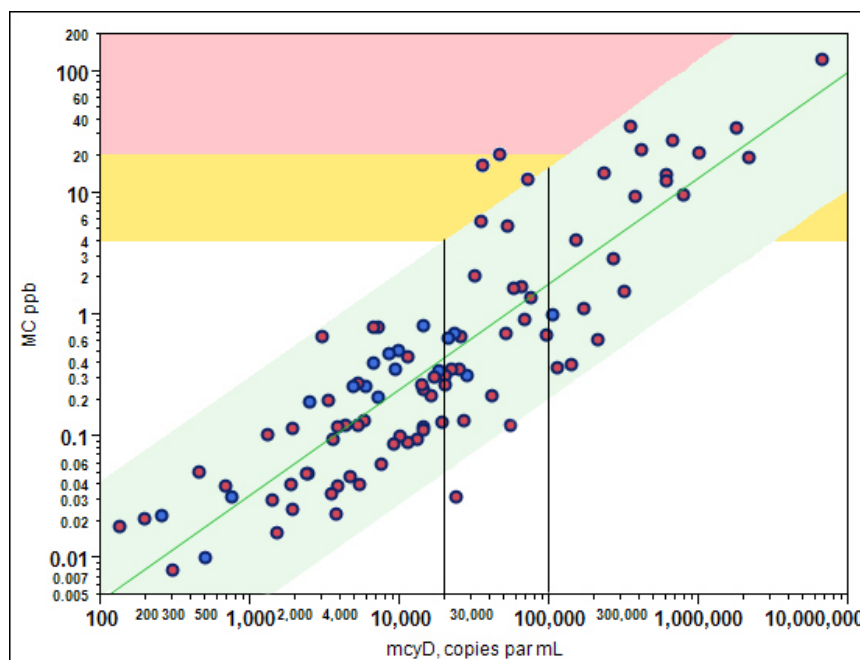


Fig. 6. Une comparaison entre l'abondance des gènes à l'origine des toxines, et la concentration des microcystines dans deux lacs, Champlain et Choinère, en 2009. Malgré que les espèces toxigénique n'étaient pas les mêmes entre les deux systèmes hydrologiques, l'essai génétique a permis d'estimer convenablement le risque de rencontrer des toxines au-dessus des seuils d'alerte de l'OMS. Ces deux seuils sont de 20 et 100 mille cellules par mL, indiqués par les deux droites noires. La limite supérieure de confiance de 95% autour de la droite de régression ici correspondent plus au moins parfaitement avec les valeurs sousentendues des microcystines, de 4 et 20 µg par L, dans l'ordre. Il est à noter que ces seuils exagèrent le risque de rencontrer un niveau dangereux de microcystines dans les cours d'eau. Ils offrent une limite inférieure qui fonctionne par principe de précaution. Mais cette limite est plus précise et fiable que la limite offerte par la microscopie. Une autre observation utile ici est que les abondances au-delà d'environ 300,000 copies du gène par millilitre n'arrive que dans la zone littorale, par accumulation par le vent. Il est curieux de constater que ces cellules sont généralement plus toxiques que les cellules au large dans le même lac. Il se peut que celles qui flottent le mieux sont celles qui contiennent plus d'azote et donc, plus de protéines pour faire leurs aérotopes (bulles de flottaison), et plus d'acides aminés pour faire des toxines, comme sous-entendu dans le dernier paragraphe de la section 3 ci-haute.

Références

- Falconer, I., J. Bartram, I. Chorus, T. Kuiper-Goodman, H. Utkilen, M. Burch et G.A. Codd. 1999. Ch. 5. Safe levels and safe practices. Dans *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Ingrid Chorus and Jamie Bartram, eds. Spon, London.
- Misson, B. et D. Latour. 2012. Influence of light, sediment mixing, temperature and duration of the benthic life phase on the benthic recruitment of *Microcystis*. *J. Plankton Res.* 34: 113–119.
- Rapala, J., K. Lahti, L.A. Räsänen, A.-L. Esala, S.I. Niemelä, et K. Sivonen. 2002. Endotoxins associated with cyanobacteria and their removal during drinking water treatment. *Water Res.* 36: 2627-2635
- Stewart, I., P.J. Schluter, et G.R. Shaw. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health – a review. *Environmental Health: A Global Access Science Source* 5:7 (27 pp.)