MFN-786

I Pq A
BIBLIOTECA

IEAPM
BIBLIOTECA

ESTIMATION DE LA FERTILITE, POUR CERTAINS ALGUES UNICELLULAIRES, DES EAUX DE CLAIRES A HUITRES DE LA REGION DE BOUIN (LOIRE-ATLANTIQUE). I. ASPECT METHODOLOGIQUE : INFLUENCE DE LA FILTRATION DES ECHANTILLONS. II. VARIATION SAISONNIERE DE LA FERTILITE POUR TROIS SOUCHES TESTS.

Growth potential bioassay of water from the oyster ponds of Bouin (Loire - Atlantique, France). I. Technical aspect: Influence of sample filtration. II. Seasonal variation of the growth potential for three strains of test organisms.

STATION MARINE D'ENDOUME

D.E.A. 77-78. RAPPORT OPTIONNEL

BAGES MIREYA

GONZALEZ RODRIGUEZ ELIANE

1389

IEAPM
BIBLIOTECA

Nous remercions tous ceux qui ont rendu possible la realisation de ce travail.

Mots-Clés: Fertilité
Tests biologiques
Algues unicellulaires
Claires à huîtres
Bouin (Loire-Atlantique)
Filtration

R E S U M E

La fertilité des eaux de claires de la région ostréicole de Bouin a été étudiée au moyen des tests biologiques en utilisant trois algues unicellulaires: Phaeodactylum tricornutum, Skeletonema costatum, et Navicula os-trearia.

Quelques aspects méthodologiques de ce protocole ont été abordés: l'influence de la filtration et de la stérilisation de l'eau sur la fertilité. Nous avons effectuée des filtrations différentielles en utilisant quatre types de filtres sur des échantillons autoclavés et non autoclavés. Une réponse définitive ne peut pas être donnée par défauts ou imperfections des techniques employées qui devront être améliorées.

Les études de fertilité ont porté sur des eaux recuillies de janvier 1977 à mars 1978, conservées par congélation jusqu'à leur utilisation. La évolution de la fertilité observée pour les trois algues au cours de la période étudiée, ne correspond pas à celle des teneurs initiales en nitrates, nitrites, ammoniaque et phosphates. Il est fort probable que d'autres composés non dosés agissent sur la croissance des algues. Une variation de type saisonnier apparaît seulement pour P. tricornutum dans les eaux provenant du canal d'alimentation des claires.

Key-Words: Growth potential
Bioassay
Unicellular algae
Oyster ponds
Bouin (Loire-Atlantique, France)
Filtration

SUMMARY

Growth potential bioassay of oyster ponds of Bouin have been undertaken using three unicellular algae as test organisms: Phaeodactylum tricornutum, Skeletonema costatum and Navicula ostrearia.

Some technological aspects of this method have been studied: influence of water filtration and sterilization. Differential filtration using four types of filters relative to sterile sea-water prepared by autoclaving have been carried out. Due to the imperfection technics utilized, we cannot give a definitive solution concerning the influence of these facters in the growth potential.

For the use in the bioassay experiment, water samples collected during the period of january 1977 to march 1978 were deep-frozen until the day of utilization. No relationships could be observed between the algal growth and the concentrations of nutrients such as nitrats, nitrits, ammonia and phosphats. Some indetermined components are likely to influence algal growth. A seasonal variation was observed only for P. tricornutum in water samples taken from the pond alimentation canal.

S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I: ASPECT METHODOLOGIQUE: FILTRATION DE L'EAU UTILISEE DANS DES TESTS BIOLOGIQUES.	2
Introduction	3
Materiel et méthodes	4
Résultats	6
Discussion et conclusion	16
CHAPITRE II: FERTILITE DES EAUX DES CLAIRES POUR LES DIATOMEES PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM BOHLIN ET SKELETONEMA COSTATUM CLEVE.	17
Introduction	18
Materiel et méthodes	20
Résultats	23
Discussion et conclusion	35
CHAPITRE III: FERTILITE DES EAUX DES CLAIRES POUR LA DIATOMEE NAVICULA OSTREARIA BORY	37
Introduction	38
Materiel et méthodes	39
Résultats	40
Discussion et conclusion	45
CONCLUSION	47
BIBLIOGRAPHIE	49

INTRODUCTION

La connaissance du potentiel de croissance de l'eau a une importance primordiale pour le développement de l'ostreiculture qui , jusqu' aujordhui, avait été négligé dans la région ostreicole de Bouin. Pour celà, un programme de recherches a été entrepris.

Dans ce programme nous avons effectué des études de fertilité sur les eaux de trois claires de Bouin, employant la méthode des tests biologiques qui permet de comparer, pour une algue donnée, les biomasses supportées par différentes eaux.

Divers aspects de cette technique restent encore à préciser. L'un d'entre eaux, l'influence de la filtration dans la fertilité d'une eau, a été étudié car on méconnait les limites dans lesquelles on modifierait le milieu par la retention de certaines particules.

Dans le présent travail on étude également les variations de la fertilité des eaux des claires pour trois organismes tests: Phaeodactylum tricornutum Bohlin, Skeletonema costatum Cleve et Navicula ostrearia Bory.

C H A P I T R E I

ASPECT METHODOLOGIQUE: FILTRATION DE L'EAU UTILISEE DANS DES TESTS BIOLOGIQUES

ELIANE GONZALEZ RODRIGUEZ

INTRODUCTION

La comparaison de la fertilité des differentes eaux au moyen des tests biologiques exige que ces eaux soient traitées au même moment et dans conditions identiques. Ceci pose un problème de conservation des échantillons jusqu'à ce que tout le lot à étudier soit recuilli. Certains auteurs ont utilisé cette méthodologie (BERLAND et al, 1972; CHARPY et CHARPY, 1977) et ont toujours procedé à une filtration des eaux, sur membrane, au moment du prélèvement, avant la congélation. Cette façon de procéder présente certains incertitudes:

- Le fait d'éliminer une grande partie du matériel particulaire peut modifier la fertilité d'une eau?
- Quel est la porosité plus adequate pour filtrer les eaux?
- Pourrai-t-on penser à stériliser l'eau en l'autoclavant avant la congélation?

D'après JONES (1967) il y a un changement dans la composition de l'eau de mer pendant la stérilisation par autoclavage due à la formation d'un precipité qui diminue la concentration des éléments traces, ceci pourrait affecter la croissance des organismes.

Le but du présent travail était de montrer l'influence de la filtration et de la stérilisation sur la fertilité des eaux au moyen de tests biologiques.

MATERIEL ET METHODES

Des eaux cotières riches ont été utilisées pour les expe-riences.

Filtres:

Quatre types de filtres ont été utilisés:

- des filtres en Nytrel, de vide de maille égal à: 465 µm, 185µm, 72µm, 45µm, et 20µm.
- des filtres Sartorius (membrane cellulosique) de porosité: 8µm, 3µm, 1,2µm, 0,8µm, 0,45µm et 0,22µm.
- des membranes Nucleopore (en polycarbonate) de porosité: 3µm, 0,8µm, 0,4µm et 0,2µm.
- des filtres Whatman (fibre de verre) types: GF/A, GF/C et GF/F.

Les eaux, après filtration , ont été réparties en Erlenmeyers stériles de 250 ml à raison de 150ml dans chacun. Pour chaque filtre et pour chaque porosité, nous avions quatre échantillons: deux non autoclavés et deux autoclavés à 120°C pendant 20 min.

Sur les filtrats de 465 µm jusqu'à 1,2 µm (Sartorius), nous avons fait des mésures de : chlorophylle-a , carbone et azote particulaires et numération cellulaire.

Deux algues-test ont été utilisées: les Bacillariophycées Phaeodactylum tricornutum Bohlin et Skeletonema costatum (Grev.) Cleve. Les inoculums font partie de la collection de la Station Marine d'Endoume.

Les algues ont été prélèvées dans leur milieu originel durant la phase exponentielle de division et, cultivées pendant deux jours dans une eau de mer pauvre en sels minéraux, suivant le protocole de BERLAND et al (1973$_b$), afin d'appauvrir les algues de leurs substances de réserve et donc augmenter la sensibilité des mésures.

Les inoculums, d'un volume de 1ml, ont été préparés de manière à ce que les densités cellulaires des cultures tests soient 2 000 cell. ml^{-1} pour P. tricornutum et 5 000 cell. ml^{-1} pour S. costatum.

Les cultures ont été incubées à une température de 17°C et à une photo periode de 12 heures de 2 000 lux, dispensé par des tubes fluorescentes. Les cultures ont été soumises tous les jours à une agitation manuelle.

Sels minéraux.

Le dosage a été fait pour le groupe de chimie de l'ISTPM, selon le protocole de STRICKLAND et PARSONS (1972) adaptée à l'Autoanalyser II Technicon.

Paramètres estimatifs de la biomasse.

Un volume de 500 ml des filtrats (dès 465 à 1,2 µm) avant culture a été fixé avec du formol à 4%, la numération et la détermination des espèces ont été effectuées selon la méthode d'Utermöhl (1958).

La croissance des cultures tests a été suivie par estimation des densités cellulaires, par moyen de chambre hematimètrique Neubauer, tous les jours sur 15 % des echantillons. Au sixième jour, période pour laquelle la biomasse maximale a été atteinte pour les èchantillons qui servaient de contrôle, nous avons arreté l'experience et la numération cellulaire a été faite pour tous les échantillons.

Des mesures de chlorophylle-a ont été faites sur les filtrats (dès 465 à 1,2 µm), les inoculums et sur les cultures tests au moment de la biomasse maximale. La filtration a été effectuée sur filtre Sartorius (0,45 µm) en acetate de cellulose. Immediatement, après la filtration, nous avons fait l'extraction de la chlorophylle par une solution d'acetone à 90 % pour eviter la dégradation quand les filtres sont conservés au congélateur pour extraction postérieure, (FORSBERG comm. pers.).

Le dosage a été fait au flourimètre Turner modèle 340, méthode STRICKLAND et PARSONS (1972).

Le dosage de l'adenosine triphosphate (ATP) a été fait sur les cultures test au moment de la biomasse maximale, sur les inoculums et les filtrats (dès 72 à 1,2 µm) de l'experience avec S. costatum. Nous avons utilisée la méthode HOLM-HANSEN et BOOTH (1966) modifiée par Laborde (1972) que consiste à mélanger l'échantillon qu'on veut analyser à une extrait contenant le complexe luciferine-luciferase obtenu à partir des post-abdomens de lucioles americaines Photinus pyralis. Un appareil de la Societé Muka, le "pico-ATP", a été employé.

Le dosage de carbone et azote particulaires a été fait sur les inoculums et les mêmes filtrats ci-dessus mentionés, selon le protocole experimental décrit par KERAMBRUN et SZEKIELDA (1969), en utilisant l'Analyser Perkin Elmer modéle 240.

Le volume cellulaire a été mésuré pour l'experience avec P. tricornutum. Un Compteur Coulter modèle Z accouplé avec un Coulter Channelyser C-1000 a été utilisé. Ces données seront utilisés seulement à titre comparatif, car les volumes cellulaires nous semblent très faibles et jusqu'au moment présent nous n'avons pas moyen de verifier s'ils correspondent à la realité ou à un probléme de calcule.

Analyses statistiques.

Sur les données de densité cellulaire, nous avons employé la technique d'analyse de variance à deux facteurs. Compte tenu de la grande variation de nos données, nous avons utilisée la transformation log (x+1).

RESULTATS

Experience en utilisant P. tricornutum comme algue test.

Une eau de 28°/°°, et ayant une teneur en sels minéraux de 29,4 µg-at l^{-1} de N-(NO_3 + NO_2) et 2,1 µg-at l^{-1} P-PO_4, a été utilisée pour cette experience.

L'eau a été filtrée sur une série de filets de mailles décroissantes à partir de 465 µm. Les filtrats, provennant des filtrations sur les differentes filets et sur les filtres Sartorius jusqu'à la porosité de 1,2 µm, ont été analysées par la méthode Utermöhl, pour estimer les organismes qui étaient passés à travers les differentes filtres (Tableau 1). Les teneurs en chlorophylle-a pour ces mêmes échantillons sont données au tableau 2.

Tableau 1. Abondance des espèces observées dans les filtrats effectués sur filet à plancton de differents vides de de maille et filtre Sartorius de differentes porosités (cellules l^{-1}).

Espèce	Taille (µm)	465µm	185µm	72µm	45µm	20µm	8µm	3µm	1,2µm
Cocconeis sctellum (Ehr.)	20-60 x 12-40	1210				1540			
Coscinodiscus sp.	40-400		1210						
Cylindrotheca closterium(Ehr.) Wm. Smith	50-80 x 5-6	8470	4840	5940			5500		
Grammatophora sp.	60-75 x10-12	1210			1870				
Melosira sp.	10-60						4400		
Navicula ramosissima (Agardh) Cleve	34-42 x 8	3630			1870	3080	2200		
Navicula sp.		3630		990		3080	5500		
Navicula spp.						1540		1980	2310
Nitzschia incurva (Grun)	80 x 6-10	2420			1870		1100		
Nitzschia longissima (Brébison) Ralfs	200-450x 10-12		1210	990	1870	1540			
Nitzschia sigma (Kütz) W. Smith	200-240x 10-12	1210				1540			
Nitzschia sp.		2420			7480	9240	1100		
Nitzschia spp.							3300		
Phaeodactylum tricornutum (Bohlin)	10-35 x 2-5	1210		990	1870		3300	9900[1]	2310[2]
Rhopolodia musculus K.	30-40 X 20	1210					1100		
Skeletonema costatum (Grev.) Cleve	10-20 x 3-15	55660	60500	40590	203830	247940	74800		1540
Stauroneis decipiens Hustedt	25-30 x 6-8	1210					1100		
Pennées indeterminées		1210	7260			1540			
Flagellés		31460	2420	990	1870	6160	1100	1980	2310
Perediniens			1210	990					

[1]Forme triradiée: 8910 cell.

[2]Forme triradiée/ 1540 cell.

Tableau 2. Quantité de chlorophylle-a dans les filtrats effectués sur filet à plancton de diff. vides de maille et filtre Sartorius de diff. porosités.

Vide de maille (µm)	Chl.-a µg l^{-1}
465	4,553
185	4,727
72	4;350
45	3,870
20	3,360
8	0,270
3	0,031

Les analyses faites sur l'inoculum nous donnent une teneur en chlorophylle-a de $3{,}19 \cdot 10^{-9}$ µg $cell^{-1}$ et un rapport C/N de 8,35 , superieur à ceux trouvés par BERLAND et al (1973 b) pour le même temps d'appauvrissement. D'après HEALEY (1975) les cellules que nous avons utilisées etaient plus épuisées que celles utilisées par ces auteurs.

Les teneurs en ATP, chlorophylle-a et de densité cellulaire étant fort divergents, nous utiliserons la densité cellulaire, malgré les forts variations entre les duplicata, comme paramètre estimatif de la biomasse.

Echantillons non autoclavés (Fig.1)

Pour les eaux qui ont été filtrées sur filet, nous n'avons pas observé croissance de Phaeodactylum tricornutum par contre, un dévéloppement de S. costatum et Nitzschia sp. a été constaté. Aucune croissance n'a pas été observée pour l'eau filtrée à 8 µm. C'est à partir du filtre de 3 µm qu'un développement de P. tricornutum commence à être observé. La présence de S. costatum et Nitzschia sp. a été constaté dans les échantillons filtrées sur 8, 1,2, 0,8 et 0,45 µm.

Pour les échantillons filtrées sur filtre Nucleopore, une légere augmentation de la croissance est observée avec la diminution de la taille du pore du filtre. La présence de S. costatum a été remarquée dans tous les echantillons.

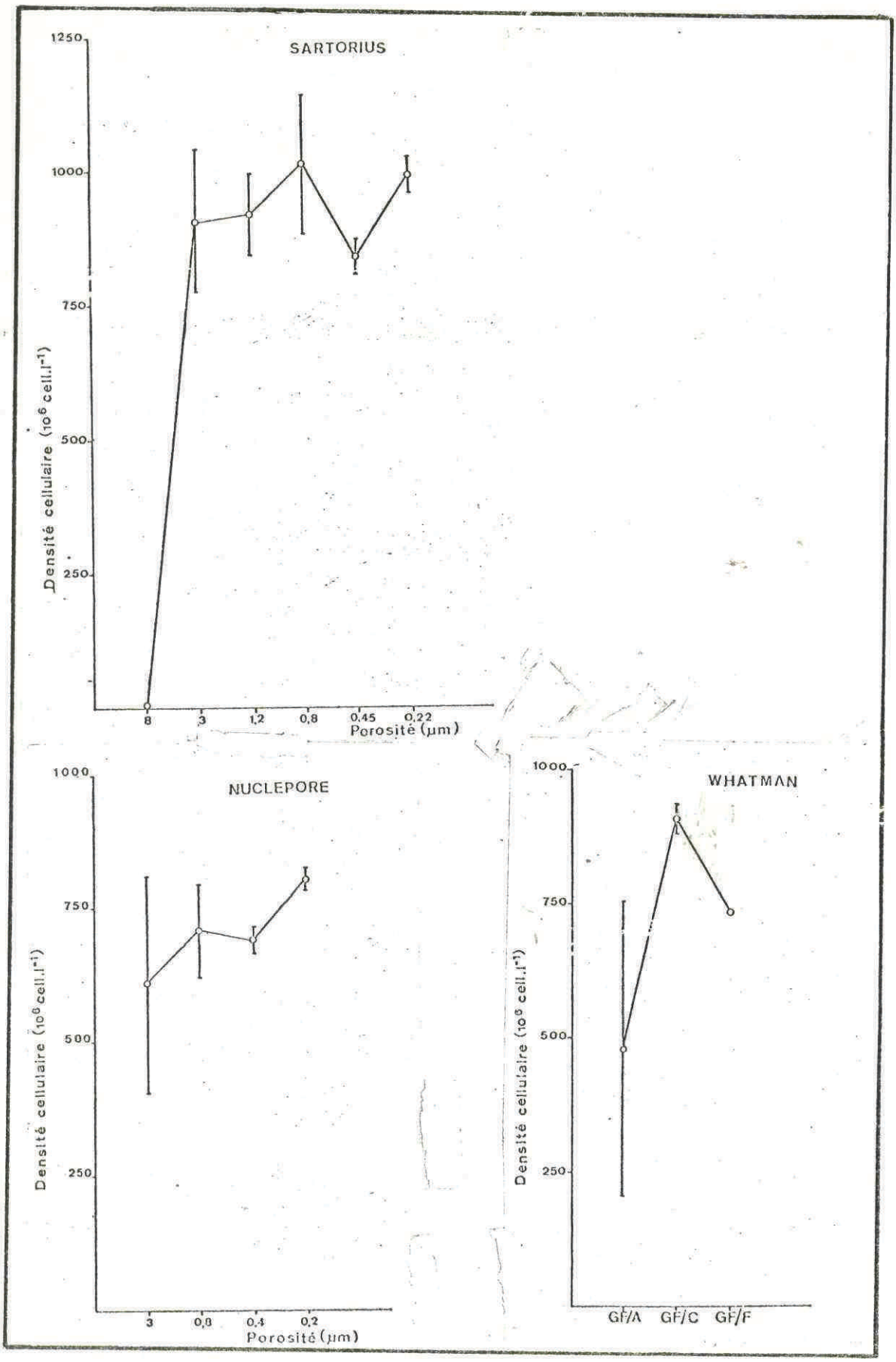


Fig. 1. Densités cellulaires de P.tricornutum dans les échantillons non autoclavés filtrés sur divers filtres de porosités différentes.

Les eaux filtrées sur le filtre type Whatman présentent une densité cellulaire plus élèvée pour le filtre GF/C. S. costatum a été observée aux filtrations sur GF/A et GF/C. Echantillons autoclavés (Fig. 2)

Pour tous les échantillons qui ont été autoclavée, nous avons observé la formation d'un précipité qui diminue avec les filtrations effectuées sur des filtres de porosité plus petites. Exceptant ceux qu'ont été filtrés sur filets et Sartorius de 8 µm, tous les échantillons ont présenté une croissance plus faible par rapport à ceux qui n'ont pas été autoclavés.

La croissance plus importante observée sur les échantillons filtrés sur filets et Sartorius 8µm peut être expliquée par l'élimination des organismes qui étaient en competition avec l'algue inoculée.

Experience en utilisant S. costatum comme algue test.

L'eau utilisée pour cette experience avait une salinité de 31 °/°° et la teneur en sels minéraux etait de 30 µg-at l^{-1} de N-(NO_3 + NO_2) et 1,93 µg-at l^{-1} de P-PO_4.

D'après les resultats de l'experience précedente, les filtrations sur filets de vide de maille supérieurs à 72 µm ont été éliminées.

Les teneurs en chlorophylle-a, carbone et azote particulaires qui ont été analysées sur les filtrats des filets et filtres Sartorius jusqu'à porosité de 1,2 µm, sont donnés dans le tableau 3.

Tableau 3. Quantité de chlorophylle-a, carbone et azote part. dans les filtrats effectués sur filet et filtre Sartorius.

Vide de maille (µm)	Chl.-a µg l^{-1}	C µg.ml^{-1}	N µg.ml^{-1}	C/N
72	7,07	5,88	7,36	7,99
45	6,83	5,93	0,56	10,64
20	5,91	5,46	0,55	9,96
8	0,35	3,24	0,18	17,70
3	0,13	2,11	0,14	15,19
1,2	0,07	1,27	0,11	12,04

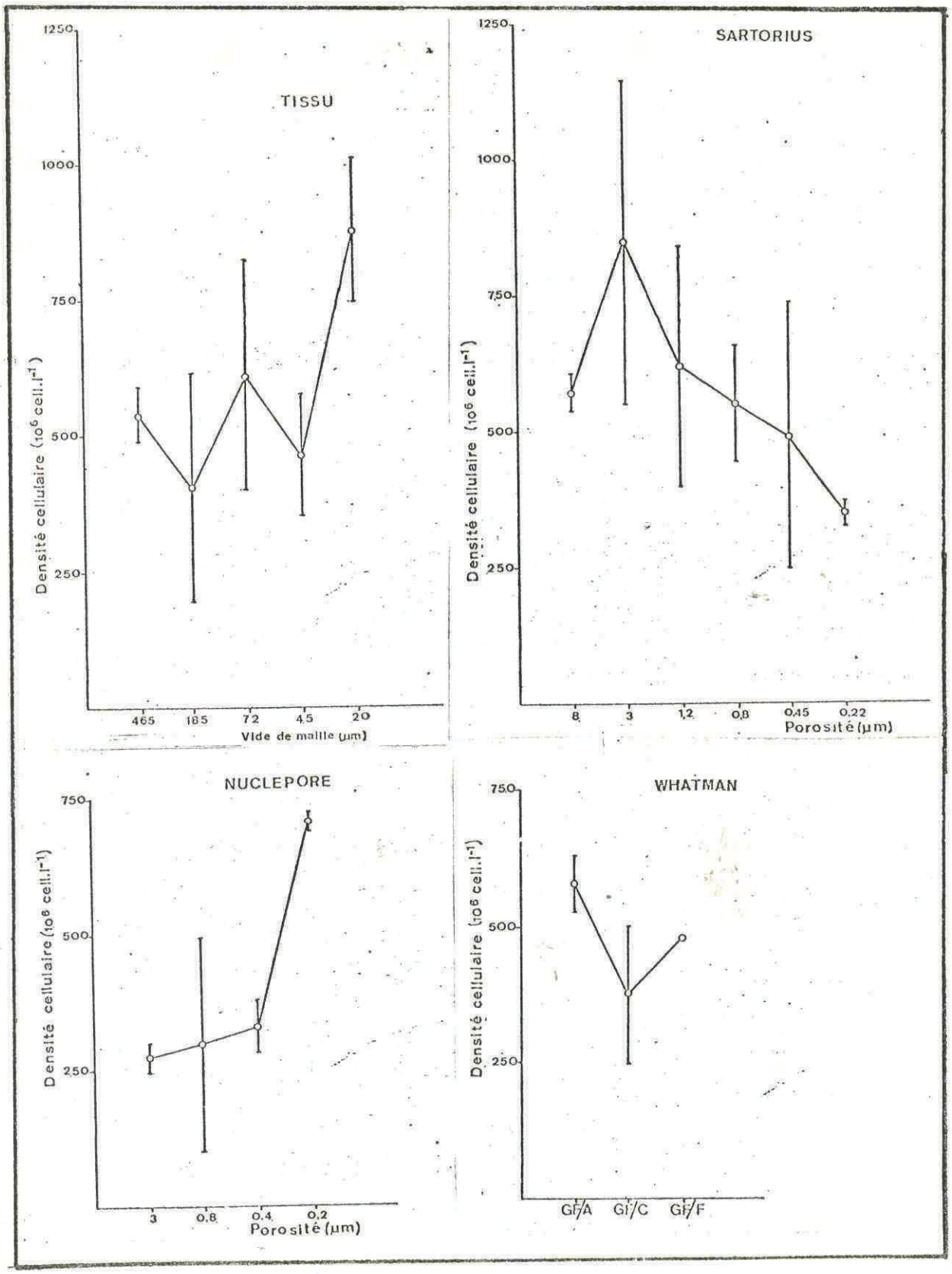


Fig. 2. Densités cellulaires de P. tricornutum dans les échantillons autoclavés filtrés sur divers filtres de porosités différentes.

Sur ces mêmes échantillons, par la méthode Utermöhl, nous avons déterminé les organismes qui ont passés à travers les differente filtres. Les résultats sont données au tableau 4.

Pour les analyses faites sur l'inoculum, après deux jours d'appauvrissement ont obtient 3.10^{-7} ug $cell^{-1}$ de chlorophylle-a et un rapport C/N égal à 6,62 que corresponderait, d'après HEALEY (1975) à des cellules non deficientes.

Comme pour l'experience avec P. tricornutum on n'observe pas une relation entre la chlorophylle, l'ATP et la densité cellulaire.

Echantillons non autoclavés (Fig. 3)

A part des échantillons qui ont été filtres sur filet et que présentent une croissance plus faible, on n'observe pas de variation importante entre les differente types de filtres et les differentes porosités, principalement à partir de la filtration à 3 µm.

Dans les échantillons filtrés sur filet de 72, 45, et 20 µm on a constaté la présence de Nitzschia sp., Navicula sp. et des ciliés.

Echantillons autoclavés (Fig.4)

Les échantillons filtrés sur filet ont montré une croissance plus élèvée que les échantillons non autoclavés.

Pour les échantillons filtrés sur Sartorius et Nucleopore on n'observe pas des variations importantes entre les differentes porosités ni entre les deux types de filtre à l'exception du Sartorius 0,22 µm qui présente une croissance plus élèvée.

Pour le filtre Whatman, une croissance plus importante est trouvée pour les échantillons autoclavés, à l'exception du filtre GF/A.

Tableau 4. Abondance des espèces observées dans les filtrats effectués sur filet à plancton de differents vides de maille et filtre Sartorius de differentes porosités (cellules l^{-1}).

Espèce	Taille (µm)	72 µm	45 µm	20µm	8 µm	3 µm	1,2 µm
Cylindrotheca closterium (Ehr.) W. Smith	50-80 x 5-6				1100	3520	
Grammatophora sp.	60-75 x 10-12			1100			
Gyrosigma sp.	100-150x 10-20		1100		1100		
Navicula ramosissima (Agardh) Cleve					2200		
Navicula sp.					1100	1760	
Navicula spp.		1540	1100	1100	2200		
Nitzschia sp.			2200				
Phaeodactylum tricornutum Bohlin	10-35 x 2-5					5280	1100
Raphoneis amphiceros	40-45	1100					
Skeletonema costatum (Grev.) Cleve	10-20 x 8-15			22000			4400
Suriella sp.	60-130	1540					
Centrale indéterminée			1100				
Flagellés		3080		1100			1100

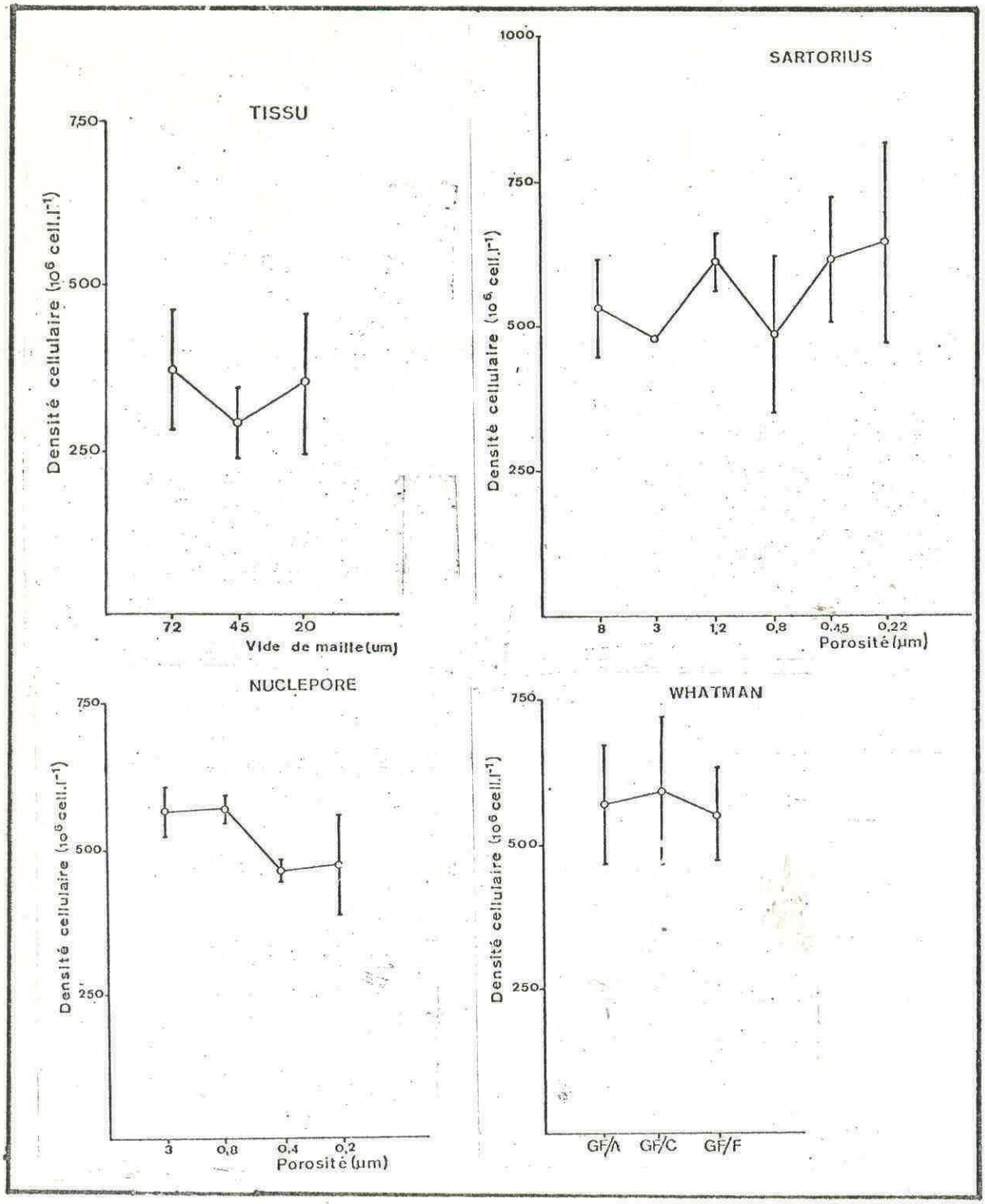


Fig. 3. Densités cellulaires de S. costatum dans les échantillons non autoclavés filtrés sur divers filtres de porosités différentes.

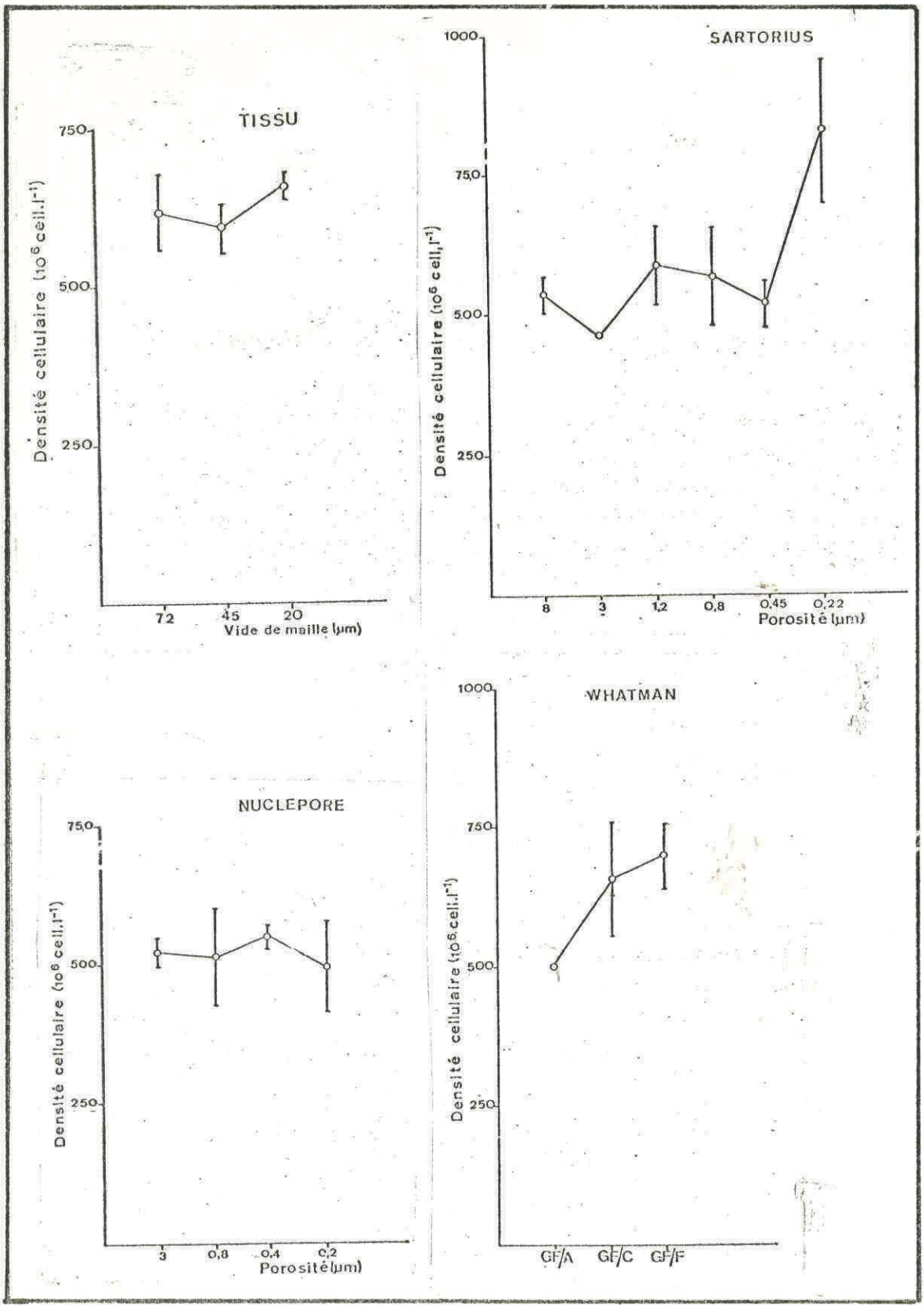


Fig. 4. Densités cellulaires de S. costatum dans les échantillons autoclavés filtrés sur divers filtres de porosité différentes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

En prennant en compte les densités cellulaires, à l'exception des échantillons qui ont été filtrés sur filet à plancton, on observe pour P. tricornutum une diminution de croissance dans les échantillons qui ont été autoclavés. Les cellules qui se sont développées dans ces échantillons présentent un volume légèrement supérieur (4 %) à celles provenant des échantillons non autoclavés.

Le fait de ne pas avoir trouvé une diminution de croissance pour S. costatum dans les eaux autoclavées va contre ce que nous attendions, car cette algue a besoin de vitamine B_{12} . Bien que, les densités cellulaires soient semblables pour tous les échantillons, les cellules présentaient des aspects differents. Celles qui provennaient des eaux autoclavées avaient des chloroplastes réduits.

D'après les figures 1 et 3, on pourrait penser qu'au dessous d'une filtration de 3 µm pour les eaux non autoclavées, filtrées sur Sartorius et Nucleopore, la difference existante serait negligeable.

Certains auteurs qui ont travaillés sur la separation du plancton (SHELDON, 1972; CHRETIENNOT-DINET et VACELET, sous presse) ont constaté que l'efficacité des differents types de filtre varie par rapport aux indications du fabricant et depend de la quantité du matériel en suspension dans l'eau.

Par manque d'analyses, car nous avons fait des observations que sur les filtrats de Sartorius, on ne peut pas comparer l'efficacité des differents types de filtres, mais nous avons constaté pour ceux que nous avons fait, la présence de cellules de taille supérieure à la porosité utilisée.

Les importantes variations trouvées ne nous permettent pas de mettre en évidence l'action des deux facteurs étudiés (Tableau annexe) et nous sommes ammenés à admettre que certains points de notre protocole experimental doivent être revue.

Le mode d'estimation de la biomasse maximale n'est pas un critère rigoureux, car tous les cultures n'atteignent pas qu même moment leur croissance maximale. C'est à cette façon de

proceder que l'on pourrait attribuer une des raisons qui expliquerait la divergence entre les trois paramètres: densité cellulaire, chlorophylle-a et ATP.

Parmis ces paramètres, l'ATP est le plus sensible, car il est rapidement dégradé et peut varier en function de l'activité metabolique des cellules. Chez les algues en culture pendant la phase exponentielle, l'ATP peut être un estimateur de la biomasse, parce que les variations sont negligeables (LABORDE, 1972). Ceci n'est pas verifié pendant la phase de senescence où la variation est très grande. Il est fortement probable que nous ayons effectué des mésures sur des cellules que se trouvaient à des états physiologiques differents.

Les resultats obtenus à partir des échantillons filtrés sur filet nous montrent que ces filtrations ne sont pas suffisantes, car les organismes que ne sont pas éliminés entrent en competition avec les cellules test. Une congélation de l'eau pourrait faire éclater ces organismes et libérer dans l'eau des substances qui la modificaraient.

L'influence de la filtration sur la fertilité présente des aspects à préciser, mais certains points du protocole que nous avons utilisé doivent être revus. Pour pouvoir comparer la reponse de deux algues qui se comportent differement, il faut utiliser la même eau pour les deux. En utilisant deux eaux differentes on fait intervenir un autre facteur, la "qualité de l'eau", qui par elle même peut apporter des reponses differentes.

Tous les filtrats doivent être analysés pour qu'on puisse connaître ce qui passe à travers les differents filtres.

Les filtrations sur filet , des vides de maille comme nous avons utilisés, peuvent être éliminés et l'attention doit porter surtout sur les porosités au dessous de 3µm.

Le choix de la porosité et le type de filtre à employer c'est un autre aspect à preciser selon la richesse de l'eau en particules (SHELDON, 1972).

La stérilisation de l'eau doit être evitée car elle transforme des éléments par précipitation ou dénaturalisation.

ANNEXE

Tableau d'ANOVA. Phaeodactylum tricornutum.

Filtre Sartorius.

Source	SCE	DL	CM	$F_{obs.}$	$F_{0,05}$
Autoclave	0,302	1	0,302	$12,497^{+++}$	4,75
Porosité	6,494	5	1,299	$53,752^{+++}$	3,11
Interaction	6,898	5	1,380	$57,103^{+++}$	3,11
Résidu	0,290	12	0,024		

Filtre Nucleopore.

Source	SCE	DL	CM	$F_{obs.}$	$F_{0,05}$
Autoclave	0,353	1	0,353	$9,874^{++}$	5,32
Porosité	0,204	3	0,068	1,902	4,07
Interaction	0,015	3	0,005	0,140	4,07
Résidu	0,286	8	0,036		

Filtre Whatman.

Source	SCE	DL	CM	$F_{obs.}$	$F_{0,05}$
Autoclave	0,060	1	0,060	1,667	5,99
Porosité	0,021	2	0,011	0,306	5,14
Interaction	0,170	2	0,085	2,361	5,14
Résidu	0,215	6	0,036		

Tableau d'ANOVA. Skeletonema costatum

Filtre Sartorius.

Source	SCE	DL	CM	$F_{obs.}$	$F_{0,05}$
Autoclave	0,002	1	0,002	0,222	4,75
Porosité	0,073	5	0,015	1,667	3,11
Interaction	0,023	5	0,005	0,556	3,11
Résidu	0,112	12	0,009		

Filtre Nucleopore.

Source	SCE	DL	CM	$F_{obs.}$	$F_{0,05}$
Autoclave	0	1			
Porosité	0,009	3	0,003	0,632	4,07
Interaction	0,009	3	0,003	0,632	4,07
Résidu	0,038	8	0,005		

Filtre Whatman.

Source	SCE	DL	CM	$F_{obs.}$	$F_{0,05}$
Autoclave	0,004	1	0,004	0,500	5,99
Porosité	0,012	2	0,006	0,750	5,14
Interaction	0,013	2	0,007	0,850	5,14
Résidu	0,049	6	0,008		

C H A P I T R E I I

FERTILITE DES EAUX DES CLAIRES POUR LES DIATOMEES

PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM BOHLIN ET *SKELETONEMA COSTATUM* CLEVE

MIREYA BAGES

INTRODUCTION

Les études de la fertilité utilisant des tests biologiques sont complétés, souvent, avec des enrichissements différentiels de façon à définir les facteurs limitants le potentiel de croissance de l'eau de mer (SMAYDA, 1970; BERLAND et al., 1973; SMAYDA, 1974 ; CHARPY et CHARPY, 1977) .

Dans le cas présent, on a envisagé d'appliquer cette méthode d'étude de la fertilité à un système de claires à huîtres sans entreprendre la détermination des facteurs limitants .

Si des recherches sur l'écologie et le verdissement des claires de Bouin sont connues (GRAS et GRAS, 1976 ; MOREAU, 1970 ; ROBERT, 1975 ; ROBERT et al., 1975), aucune approche générale n'a été effectuée sur la fertilité de l'eau dans ces régions. Ceci a amené J.M. ROBERT et J.P. DRENO à effectuer des prélèvements des eaux des janvier 1977 à Mars 1978 .

Sur ces échantillons on a estimé la fertilité pour deux algues d'utilisation internationale : Phaeodactylum tricornutum Bohlin et Skeletonema costatum Cleve .

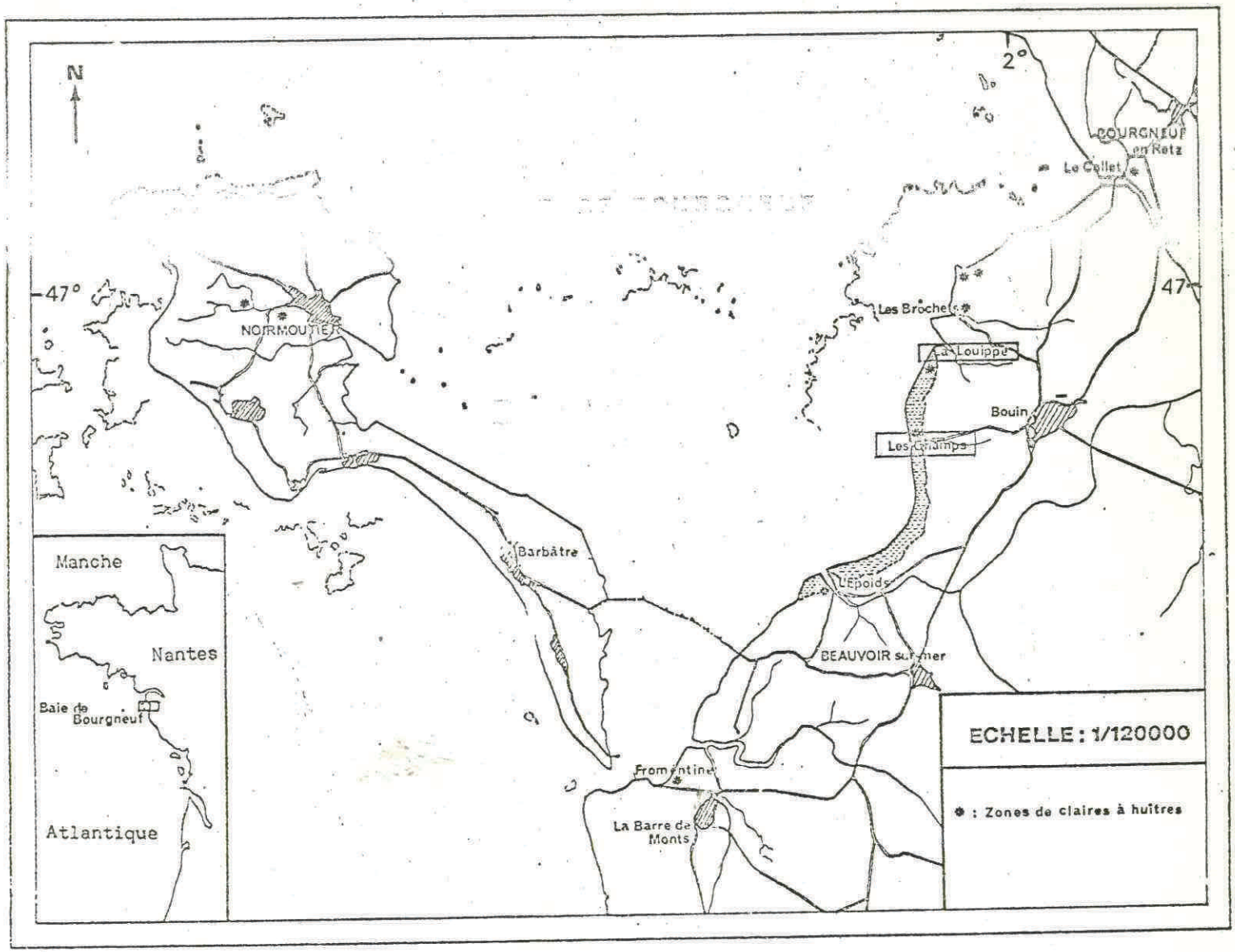


Fig. 1. LOCALISATION DES CLAIRES A HUITRES DANS LA REGION DE BOUIN

IEAPM BIBLIOTECA

MATERIEL ET METHODES

Durant 15 mois, des prélèvements, la pluspart bimensuels, furent effectués dans deux claires et leur canal d'alimentation à "La Louippe" (Fig. 1). Pour la troisième claire étudiée et localisée plus au sud, dans "Les Champs", il n'y a pas eu de prélèvement les mois de mai, juin et juillet 1977. D'autre part, toutes les claires ont été mises à sec de mi-juillet à la fin d'août.

Protegées par la digue de Bouin, les claires se disposent régulièrement le long d'un canal central d'alimentation. Avec une hauteur d'eau entre 25 et 60 cm, chaque claire couvre une surface de 400 m^2, environ, de sédiment argilo-sableux. L'entrée de l'eau dans les claires est sous le contrôle de l'ostreiculteur, mais d'une façon générale, le renouvellement de l'eau s'effectue chaque semaine.

Les prélèvements ont été realisés dans le canal, au moment du remplissage des claires, et dans celles-ci, au moment de l'évacuation. L'eau a été filtrée (filtre Sartorius 1,2 µm de porosité), dosée (NH_3, NO_3, NO_2 et PO_4), séparée dans plusieurs sacs en plastique et congelée à -20°C, jusqu'au moment de leur utilisation.

Pour chaque organisme test, une série des ces aliquota est décongelée à température ambiante pendant une douzaine d'heures. Des volumes de 150 ml sont distribués dans des erlenmeyers stériles et de nouveaux dosage d'ammoniaque et des sels minéraux se font pour contrôler les variations dues à la congélation.

Les algues utilisées sont les Bacillariophycées Phaeodactylum tricornutum Bohlin[1] et Skeletonema costatum Cleve[1]. Des cultures jeunes sur milieu Antia et Cheng (1970) sont lavées et transferées dans de l'eau de la Meditérrannée filtrée (filtre Sartorius à 0,22 µm de porosité) dont la concentration en sels minéraux est très faible. Celà avec le but de minimiser les réserves nutritives de l'algue et l'apport de nutrilites avec

[1]Collection. B. B. M., S. M. E., bacteriennes.

l'inoculum au moment de l'ensemencement (SMAYDA, 1964; BERLAND et al., 1973 b) . P. tricornutum a été ainsi soumis à un appauvrissement de trois jours et S. costatum de deux jours.

L'inoculum utilisé contenait, dans les deux cas, 5 000 cell. ml^{-1}. Les chlorophylle-a, adenosine triphosphate, carbone et azote particulaires ont été mesurés.

Les conditions de culture, aussi bien pour la période d'appauvrissement que pour les bioessais à suivre, ont été les suivants: température de 17°C, intensité lumineuse de 2 000 lx et photopériode de 12 J/12 N. Une agitation manuelle a été administrée quotidiennement.

Les dosages de sels minéraux (NO_3, NO_2, PO_4) ont été repetés à la fin de chaque expérience. Dans ce cas l'ammoniaque n'a pas été dosé, car il a été observé par ailleurs (McCARTHY et al., 1977) que cette forme d'azote est consommée en premier lieu par les algues.

Les expériences ont été arretées au but de huit jours pour P. tricornutum et de six jours pour S. costatum, délais pour lesquels nous considerons, à partir d'une surveillance quotidienne du nombre cellulaire d'environ 15 % des échantillons, que la croissance est terminée. Les paramètres qui ont permis d'estimer la biomasse à cette étape sont les suivants: densité cellulaire, teneur en chlorophylle-a et en adenosine triphosphate (ATP). Le volume cellulaire modal à été mesuré seulement dans le cas de P. tricornutum. Il est certain que la fin de croissance se produit pas en même temps pour les divers échantillons et ainsi, ces paramètres ont pu être mal estimés.

La densité cellulaire est obtenu dans des échantillons fixés avec du formol neutre à 0,2%, par comptage au microscope sur une cellule de numération Neubauer. Le taux journnalier de division a été calculé à partir de la formule:

$$\text{nb div./jour} = \frac{3{,}3\ (\log n - \log n_o)}{t - t_o} \quad ;$$

n = nombre de cell. dans le temps t

n_o = nombre de cell. inoculées

t_o = temps d'inoculation

t = tepps du comptage de n

$t - t_o$: en jours

L'extraction de la chlorophylle-a a été realisée en suivant le protocole décrit par STRICKLAND et PARSONS (1972), mais en effectuant un broyage du filtre (Sartorius en acetate de cellulose à porosité de 0,45 um). Les extraits ont été mesurés au spectrofluoromètre Turner, modèle 430, étalonné avec de la chlorophylle-a pure.

La quantité d'ATP, obtenu par la méthode HOLM-HANSEN (1966) modifiée par LABORDE (1972), a été évaluée a l'aide d'un Pico-ATP Muka.

Les volumes cellulaires furent fournis par un Compteur Coulter modèle Z en combinaison avec un analyseur des tailles des particules, Coulter Channelyzer modèle C-1000.(Ils seront pris comme mesures relatives du fait qu'un des facteurs multiplicatifs necessaires aux calculs est méconnu).

Dans le cas des inocula, la teneur en azote et carbone particulaires est déterminée par un analyseur Perkin Elmer, modèle 240, selon le protocole décrit par KERAMBRUN et SZEKIELDA (1969).

Les divers dosages d'ammoniaque, nitrate, nitrite et phosphate ont été effectuée par le laboratoire de chimie de l'ISTPM à Nantes. L'ammoniaque par la méthode Koroleff et les sels selon STRIKLAND et PARSONS (1972) à l'aide de l'autoanalyser II Technicon.

Pour des raisons d'ordre pratique, tous les échantillons à analyser, sauf la série des eaux du moment d'inoculation et celle de la fin de l'expérience avec S. costatum, ont été soumises à une congélation temporaire avant les analyses.

Constatant que cette traitement introduit des variations qui empêchent de connaître la concentration originale en azote et phosphore, ces valeurs ont été éliminées de l'analyse des résultats.

Vue leur grande abondance, les sels de silicates ne seront pas traitées.

RESULTATS

I. Analyses sur les eaux utilisées.

Les réponses aux tests biologiques seront évaluées en prenant comme base les teneurs en azote total (NO_2, NO_3, NH) et en phosphates de l'eau au moment de son inoculation et non celles du moment de prélèvement, des modofications ayant eu lieu pendant la congélation. Ces dosages ont été effectués sans délais à l'exception de deux échantillons: l'un correspondant à l'eau du canal prélèvé le 5 Déc. 1977 et l'autre à l'eau de la claire III du jour 28 Jan. 1977; tous les deux ont été soumis à un temps réduit de congélation avant les analyses.

En gégéral, la quantité d'azote est bien plus importante dans les eaux du canal que dans celles des claires, elle est comprise entre 4,31 et 61,59 µg-at N (NO_2, NO_3, NH_3)l^{-1}. Sa variation dans le temps est aussi plus marquée. On peut distinguer une période "pauvre" pendant les mois de mai, juin, juillet, août et septembre et des concentrations hautes les premiers mois de 1977 et 1978.(Fig. 1-C).

Par contre, la concentration des phosphates est du même ordre dans toutes les eaux et sa variation est difficilement attribuée à une époque de l'année (Fig. 1-C).

De même, dans l'ensamble de claires, la variations d'azote et phosphore n'apparaissent pas comme étant saisonnières (Fig. 1-CI, C II, C III). Leurs concentrations minimale e t maximale se trouvent dans le tableau 1.

Tableau 1. Concentrations minimale et maximale en azote (NO_2 NO_3, NH_3) et phosphates dans les eaux initiaux.

Lieu de prélèv.	µg-at N l^{-1} Min.	Max.	µg-at P-PO_4 l^{-1} Min.	Max.
Canal	4,31	61,59	0,60	2,23
Claire I	2,43	18,00	1,23	2,23
Claire II	2,54	36,01	0,36	2,23
Claire III	2,33	25,47	0,34	1,43

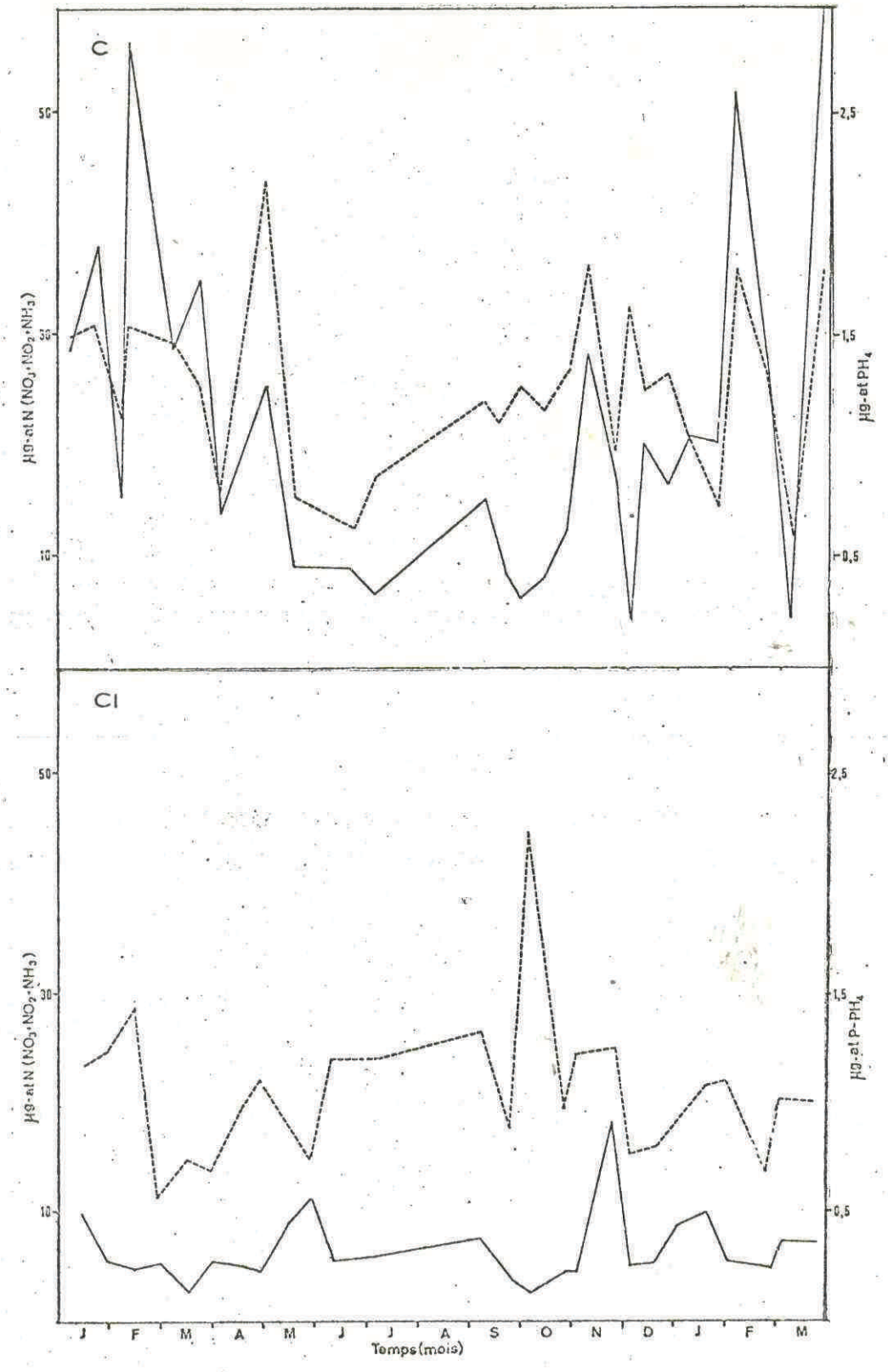


Fig. 1. Variation des concentrations de l'azote (NO_2+ NO_3+ NH_3) et de phosphates dans les eaux du canal (C) et de la claire I (CI) au cours de la période janvier 1977 – mars 1978. Dosages effectués au moment d'utilisation. _____ ug-at N l^{-1}, _ _ _ _ _ ug-at P-PO_4 l^{-1}.

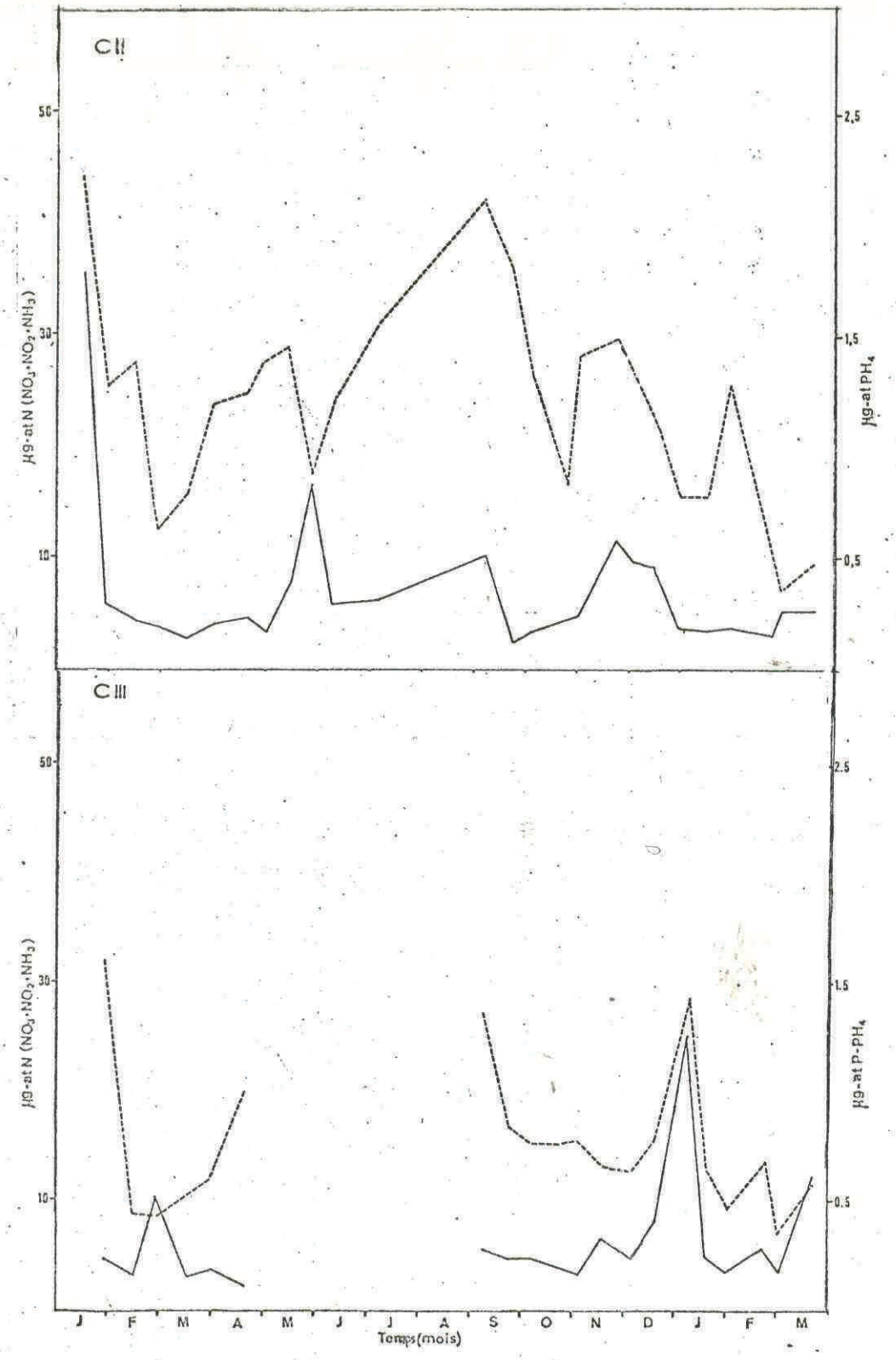


Fig. 1 (Suite). Variations des concentrations de l'azote (NO_2+ NO_3+ NH_3) et de phosphates dans les eaux des claires II et III (CII, CIII) au cours de la période janvier 1977 - mars 1978. Dosages effectués au moment d'utilisation. _____ ug-at N l^{-1}, _ _ _ _ ug-at P-PO_4 l^{-1}.

Dans la claire III, on peut observer une évolution simultanée des deux paramètres durant la période comprise entre Sept. 1977 et Mars 1978. D'autre part, ils semblent avoir une relation inverse pour les prémiers mois des prélèvement (Fig. 1- C III).

II. Analyses sur les experiences tests.

Phaeodactylum tricornutum

La solution inoculum de P; tricornutum présentait, au troisième jour d'appauvrissement, un rapport C/N de 9,23 ce qui indiqaerait, selon HEALEY (1975) une déficience moyenne en nutrilites.

La figure 2 montre l'évolution des quatre paramètres estimatifs de la biomasse à la fin de l'expérience.

C'est seulement dans les eaux du canal que l'on peut observer une fertilité nettement differente selon l'époque de l'année. Elles présentent une courbe bimodal avec dépression estival.

C'est là aussi, que l'on obtient la meilleure corrélation entre le nombre cellulaire et la quantité de chlorophylle-a (r= 0,83, n = 27).

Le même phénomène s'observe dans le cas du volume cellulaire, c'est -à-dire qu'une relation inverse entre ce dernier et la densité cellulaire, a lieu dans les eaux du canal mais devient indéfinie dans les cas des claires.

En ce qui concerne les taux moyens de chlorophylle-a par cellule, ils ne s'eloignent pas beaucoup de ceux de l'inoculum. (Tableau 2).

Tableau 2. Taux moyen et écart type de chlorophylle-a par cell. de B. tricornutum.

Lieu de prélèv.	Chl.-a ($\mu g.10^{-8}.cell.^{-1}$) $\bar{x}$	$\pm$	σ
Canal	5,90		2,7
Claire I	4,68		2,9
Claire II	3,79		2,2
Claire III	5,85		2,9
Inoculum	4,37		

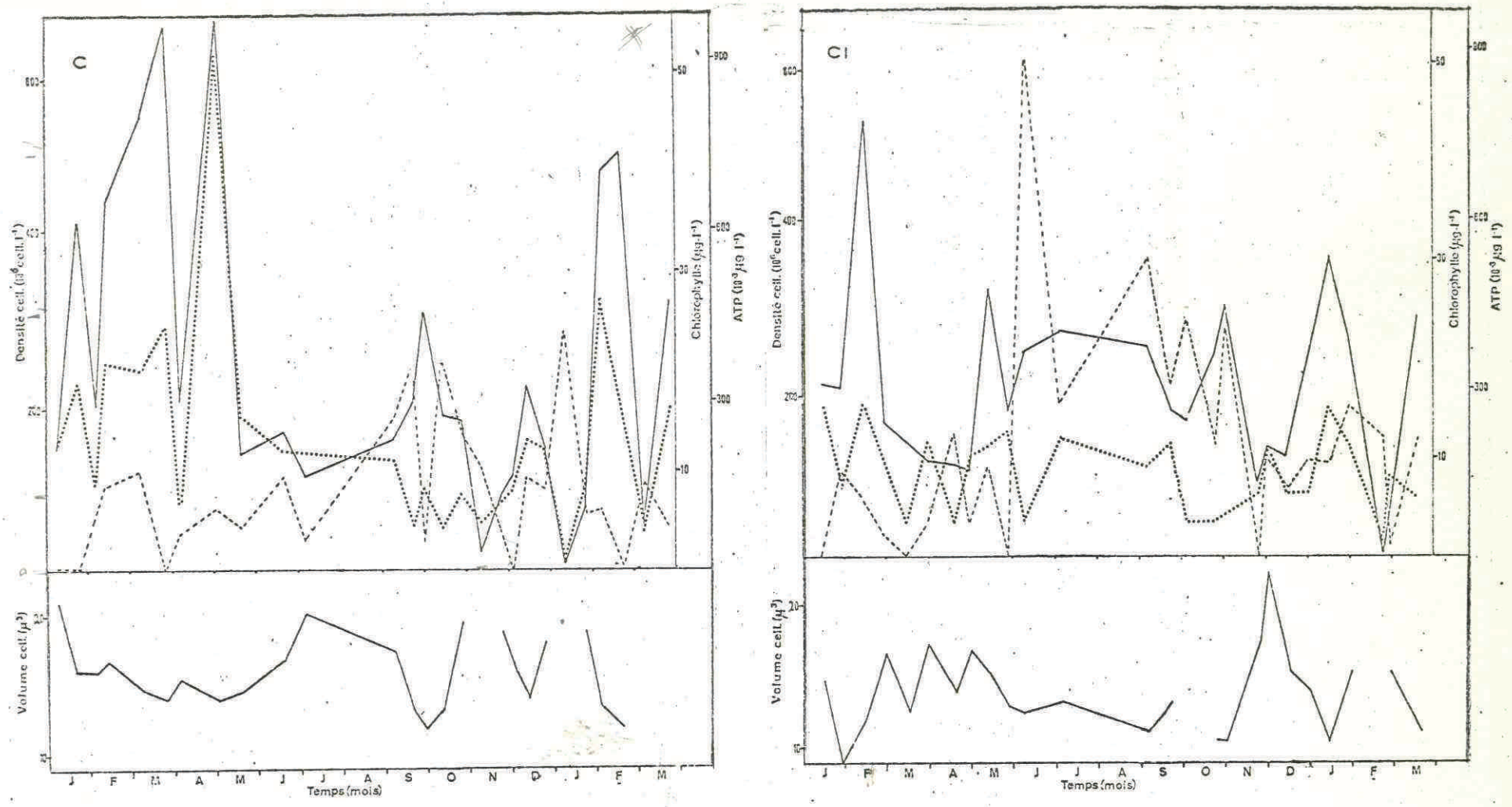


Fig. 2. Evolution des quatre paramètres estimatifs de la biomasse de P. tricornutum dans les eaux du canal (C) et de la claire I (CI) au cours de la période janvier 1977-mars 1978.

_____ Densité cellulaire, ... chlorophylle-a , _ _ _ _ adenosine triphosphate (ATP),

_____ volume cellulaire.

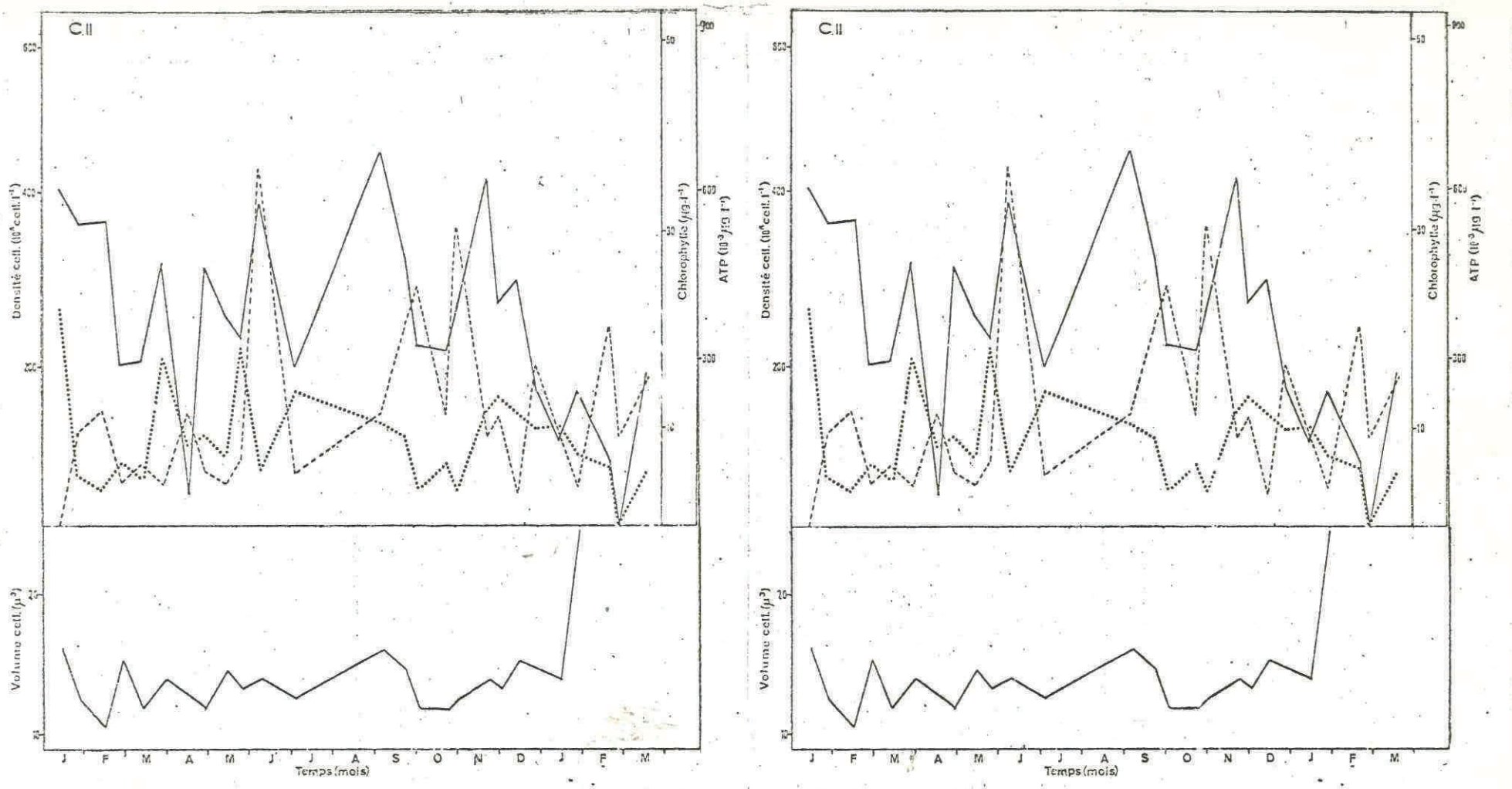
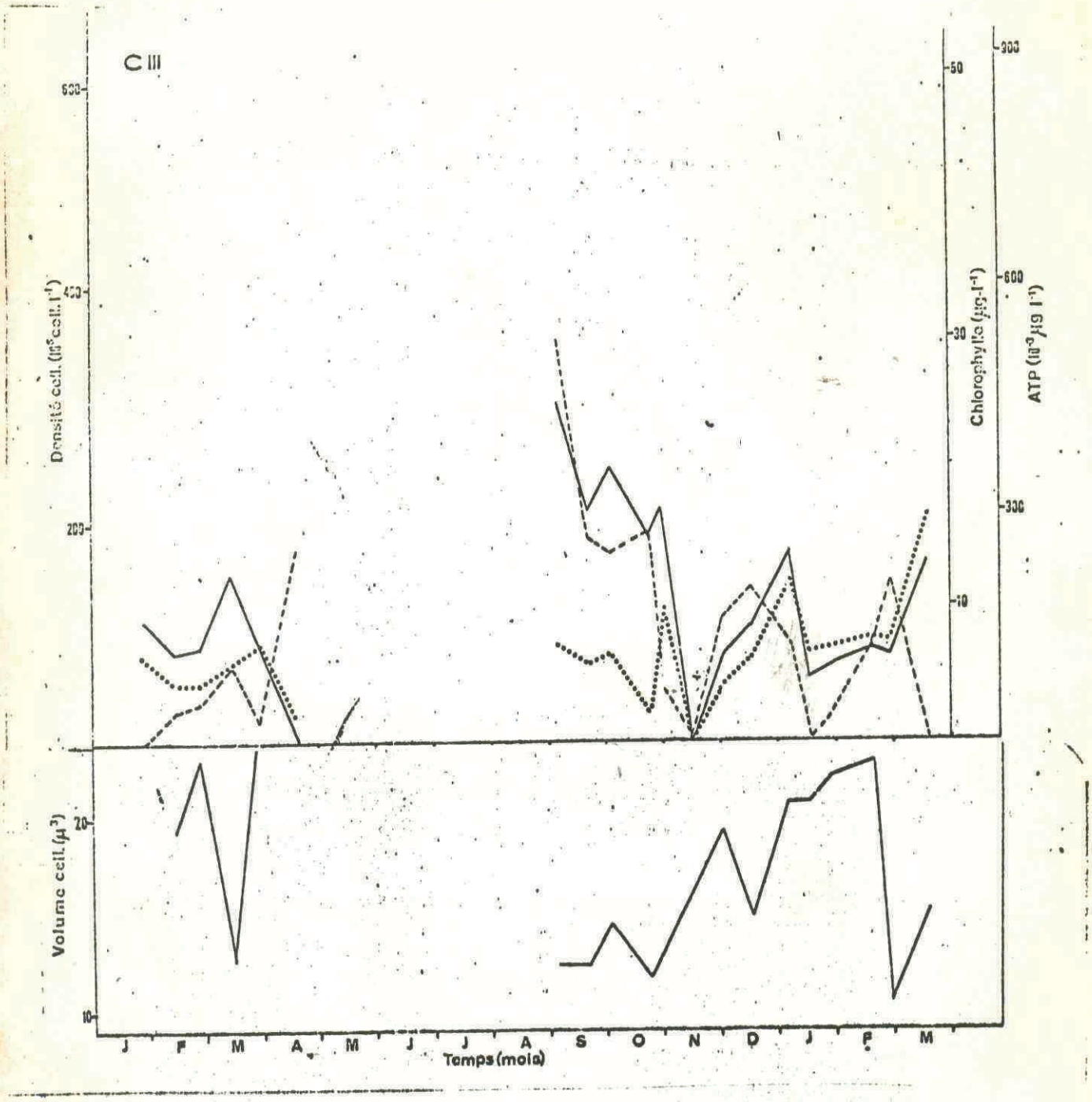


Fig. 2 (Suite). Evolution des quatre paramètres estimatifs de la biomasse de P. tricornutum dans les eaux des claires II et III (CII, CIII) au cours de la période janvier 1977 - mars 1978.
_____ Densité cellulaire, ... chlorophylle-a, _ _ _ _ adenosine triphosphate (ATP),
_____ volume cellulaire.


C III
Densité cell. (10⁵ cell. l⁻¹)
600
400
200
Chlorophylle (µg-l⁻¹)
50
30
10
ATP (10⁻³ µg l⁻¹)
900
600
300
Volume cell. (µ³)
20
10
J F M A M J J A S O N D J F M
Temps (mois)

Le nombre journalier de division, en moyenne, est très proche entre les divers endroits (Tableau 3).

Tableau 3. Moyen et écart type du nombre de divisions par jour de P. tricornutum.

Lieu de prélèv.	nb. div. jour^{-1} $\bar{x}$	$\pm$	σ
Canal	0,64		0,194
Claire I	0,64		0,138
Claire II	0,67		0,167
Claire III	0,52		0,194

Par contre, la quantité d'ATP par cellule était trop variable pour être representée avec une valeur moyenne. LABORDE (1972) met en évidence que la quantité d'ATP dans l'étape stationaire ou sénescente de la croissance d'une algue (état où se trouvaient la plus part des échantillons) est trop inestable pour le considérer comme un bon indicateur de la biomasse.

Skeletonema costatum

L'inoculum de S. costatum avait un rapport C/N égal à 6;34 ce qui indique une absence de déficience nutritionelle dans les cellules (HEALEY, 1975).

La figure 3 montre l'évolution des trois paramètres mesurés. Pour des raisons exposées précédemment on considèrerait la biomasse en termes de la densité cellulaire ou contenu de chlorophylle-a.

Seulement deux caractéristiques sont communs à tous les lieux de prélèvement: une grande augmentation en Sept. suivie d'une diminution vers Oct. 1977. Plus particulièrement pour les eaux des claires I et II, le développement de la biomasse supportée est similaire dès le mois de Sept. 1977.

En ce qui concerne les quantités de sels consommées (NO_2, NO_3 et PO_4) il apparaît, en général, une disproportionnalité entre ces dernières et la croissance produite; mais, on ne pourrait pas nier l'existance d'une certaine relation dans

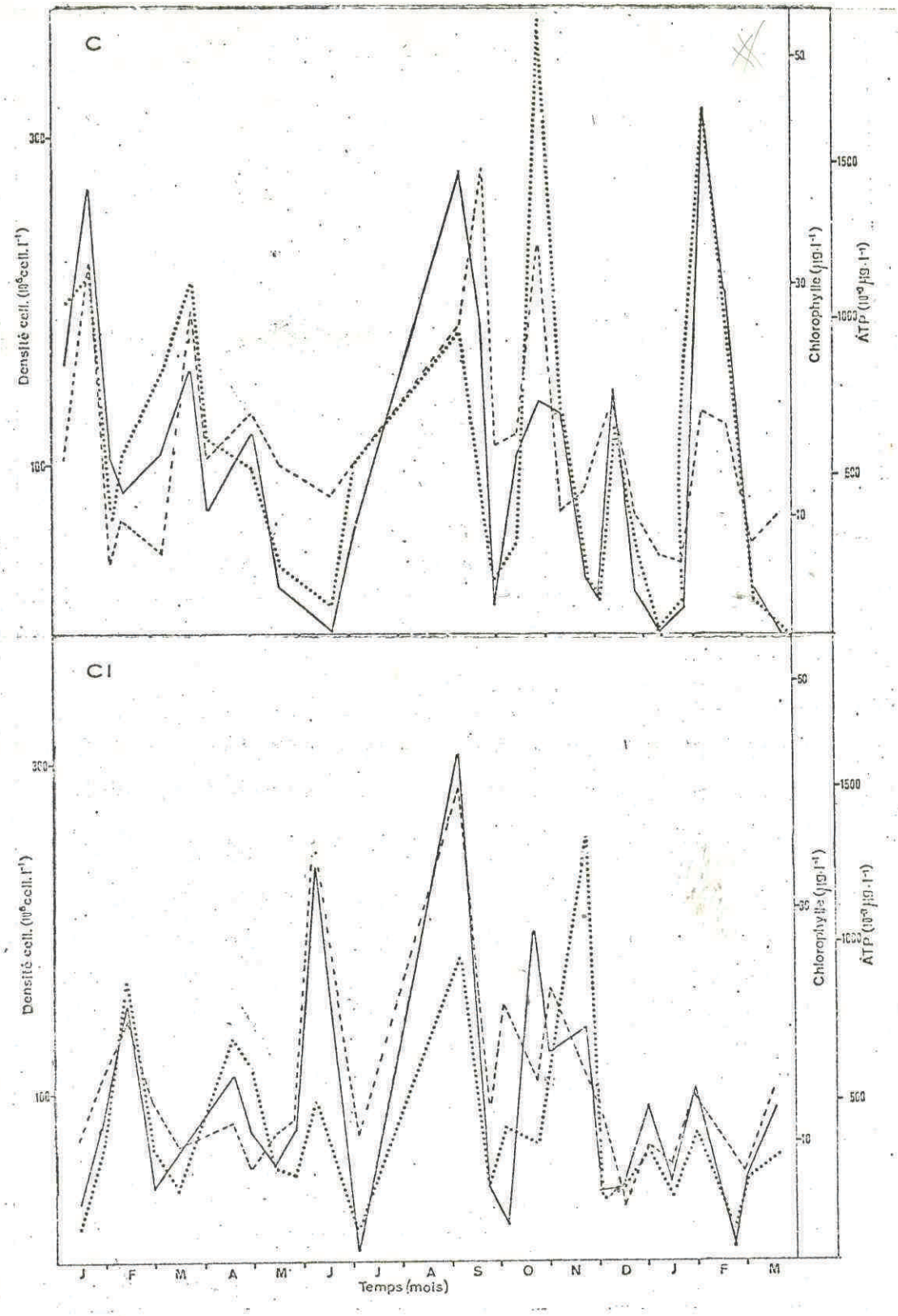


Fig. 3. Evolution des trois paramètres estimatifs de la biomasse de S. costatum dans les eaux du canal (C) et de la claire I (CI), au cours de la période janvier 1977 - mars 1978. _____ Densité cellulaire, ... chlorophylle-a , _ _ _ _ ATP.

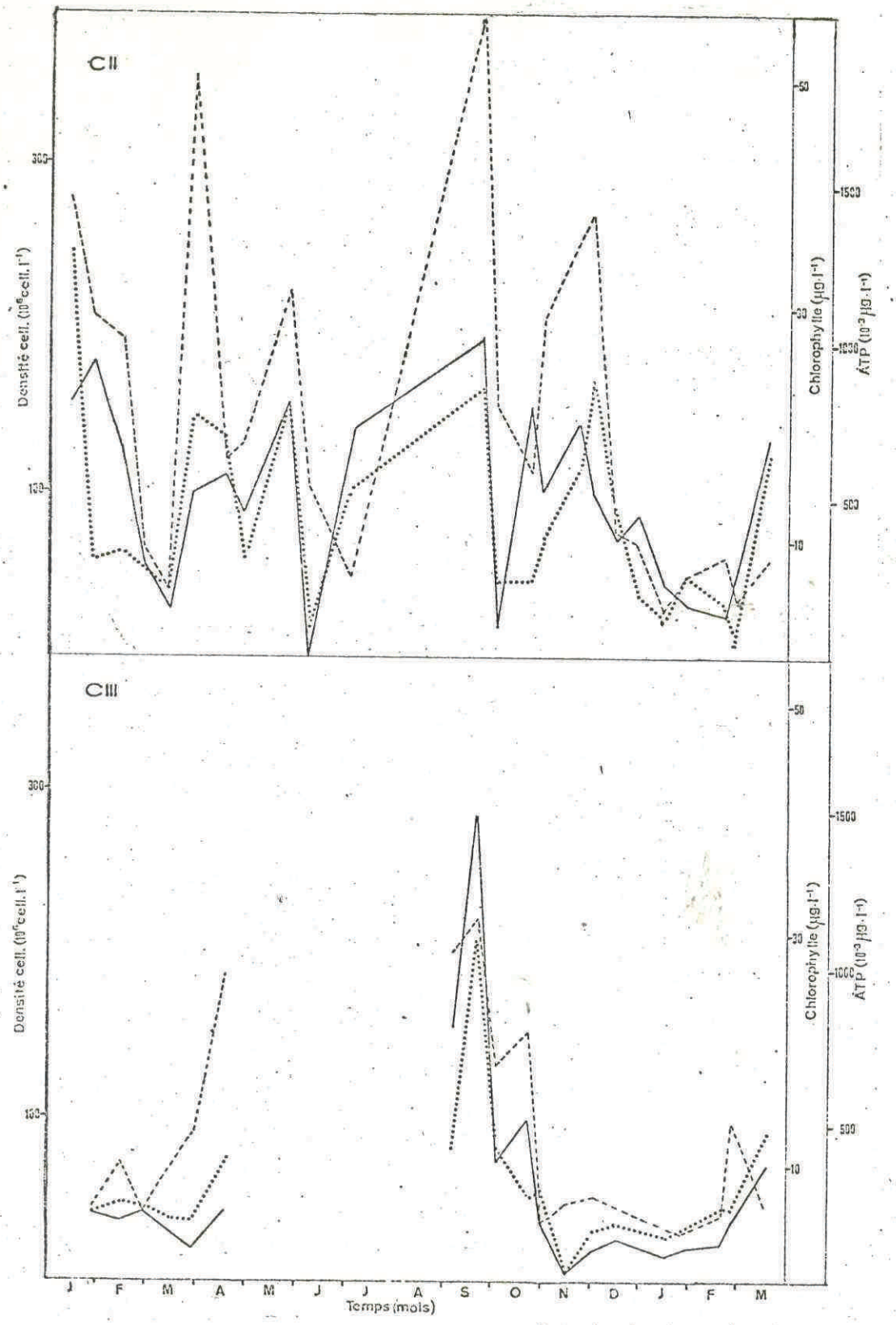


Fig. 3 (Suite). Evolution des trois paramètres estimatifs de la biomasse de S. costatum dans les eaux des claires II et III (CII, CIII), au cours de la période janvier 1977 - mars 1978.
_____ Densité cellulaire, ... chlorophylle-a, _ _ _ _ ATP.

le même sens (Fig. 4).

On remarque que le taux moyen de chlorophylle-a par cellule à la fin de l'expérience est 5 fois plus forte que celui de l'inoculum (Tableau 4).

Tableau 4. Moyenne et écart type de la quantité de chlorophylle-a par cellule de S. costatum.

Lieu de prélèv.	Chl-a ($\mu g \cdot 10^{-8} \cdot cell^{-1}$) $\bar{x}$	$\pm$	σ
Canal	16,96		7,4
Claire I	14,56		9,4
Claire II	13,23		6,2
Claire III	17,45		6,6
Inoculum	3,16		

Le nombre moyen de divisions par jour est légèrement plus bas dans les eaux provenant de la claire III. (Tableau 5).

Tableau 5. Moyenne et écart type du nombre journalier de division pour S. costatum.

Lieu de prélèv.	nb. div. $jour^{-1}$ $\bar{x}$	$\pm$	σ
Canal	0,64		0,31
Claire I	0,64		0,23
Claire II	0,68		0,23
Claire III	0,57		0,21

D'autre part, la variation dans les differents endroits, si bien est faible, est presque idéntique à celle observée pour P. tricornutum.

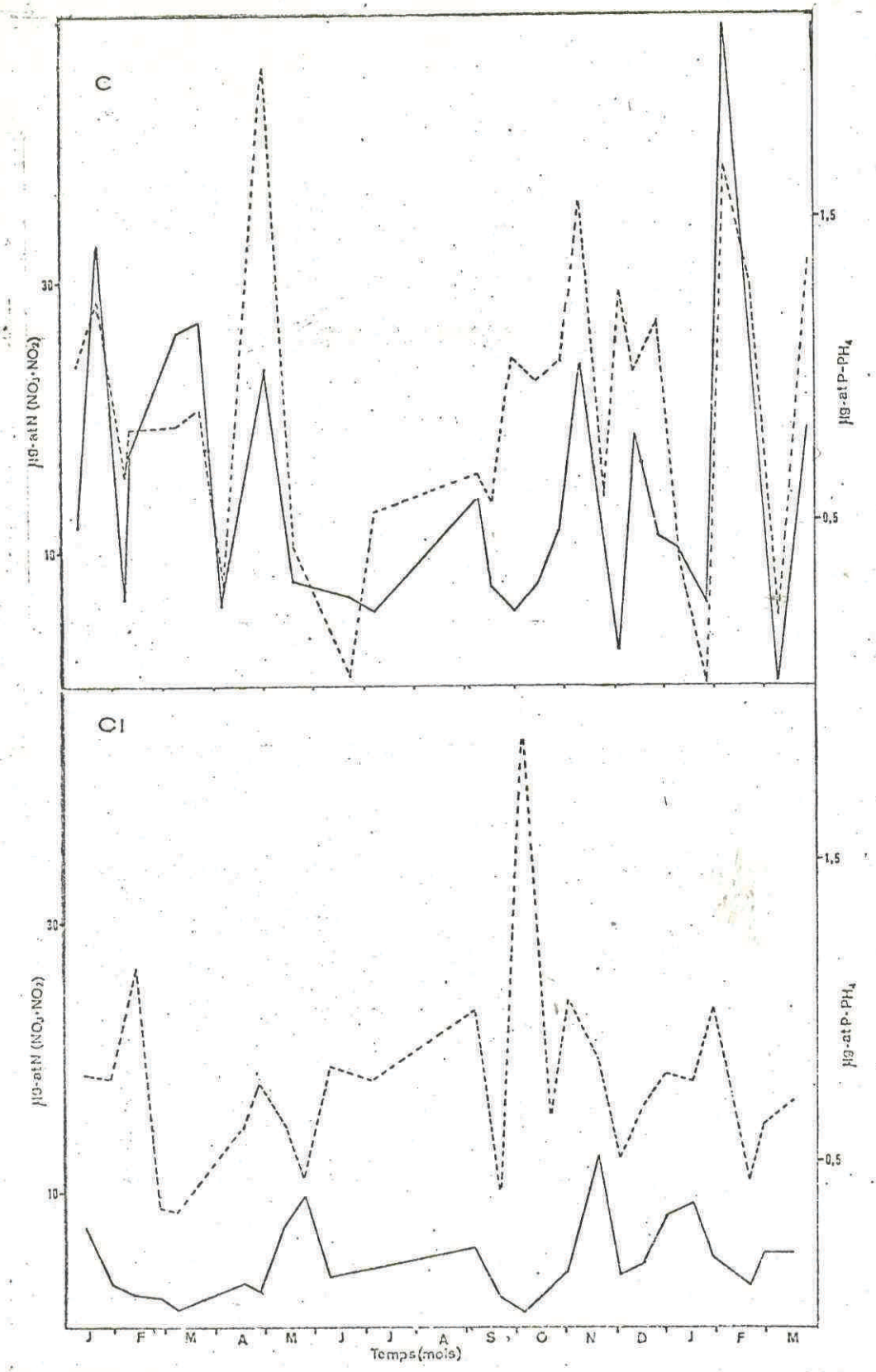


Fig. 4. Evolution de la quantité de sels consomées (NO_2+ NO_3 et PO_4) durant l'expérience avec S. costatum dans les eaux du canal (C) et de la claire I (CI), au cours de la période janvier 1977 - mars 1978. _____ ug-at N-(NO_2+ NO_3) l^{-1}, _ _ _ _ ug-at P-PO_4 l^{-1}.

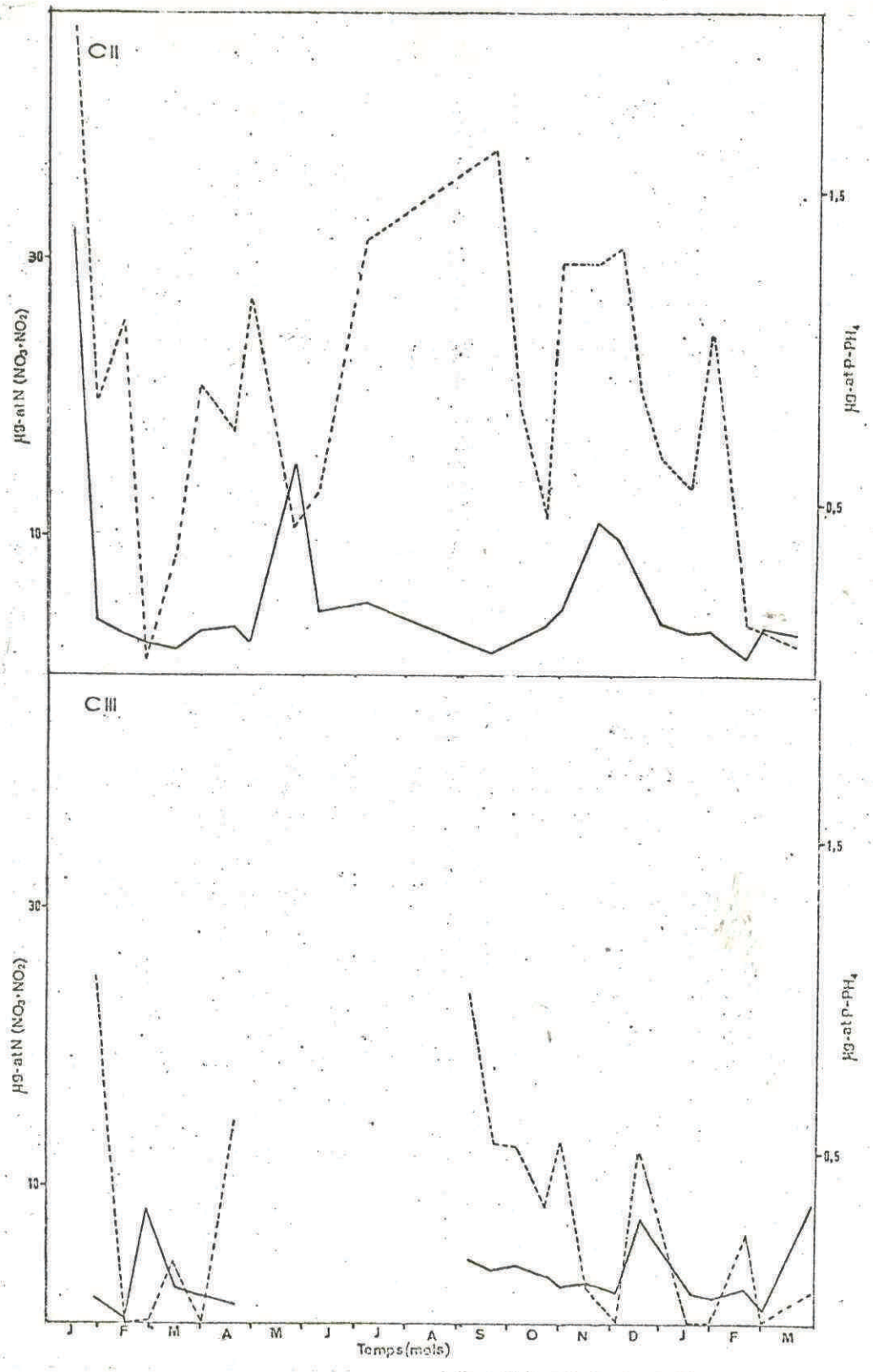


Fig. 4 (Suite). Evolution de la quantité de sels consomées (NO_2+ NO_3 et PO_4) durant l'expérience avec S. costatum dans les eaux des claires II et III (CII, CIII), au cours de la période janvier1977 - mars 1978. ____ ug-at N-(NO_2+ NO_3) l^{-1}, _ _ _ _ ug-at P-PO_4 l^{-1}.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans les deux cas analysés, la numération cellulaire s'affirme comme le meilleur paramètre estimateur de la biomasse maximale. Si bien la chlorophylle-a varie de la même façon dans plusieurs cas, il serait plus convenable de l'utiliser dans des essais où les eaux soient idéntiques (tout en gardant le contrôle des conditions de culture et une souche monoespècifique) car une grande variation liée à certains éléments du milieu à été déjà démontrée.

Par example, pour une série de concentrations differents en nitrates et phosphates, CASTELLVI (1963) observe une variation dans le taux de chlorophylle-a par cellule de S. costatum qui peut atteindre 70 %. Celà expliquerait la différence entre la quantité de ce pigment dans l'inoculum appauvris et celle des échantillons à la fin de l'expérience avec S. costatum. Ce phénomène ne se produit pas pour P. tricornutum qui arrive à utiliser des sels minéraux même quand ils sont en concentrations extrèmement basses (KUENZLER et KETCHUM, 1962), comme c'est le cas du milieu d'appauvrissement.

D'autre part, c'est surprenant que cette espèce, consideré comme étant capable de se développer dans un milieu entièrement minéral (HAYWARD, 1965) ne présente pas une évolution plus liée à celle des sels minéraux initiaux. Les seuls échantillons où on peut constater un développement en fonction de la concentration en azote et, en moindre degré, en phosphates, sont ceux prélèvés dans le canal.

S. costatum présente aussi une meilleure concordance entre la biomasse et les sels minéraux consommés dans les eaux provenant du canal.

Particulièrement pour la claire I et II, on peut accepter avec facilité, l'hypothèse d'un apport par le milieu des composés susceptibles d'être utilisés comme nutrients, cette espèce étant capable d'une forte hétérotrophie (CASTELLVI, 1971).

En exceptuant qulques points où la croissance est similaire,

la fertilité de l'eau pour S. costatum dans le canal et les claires correspondantes est bien différente que celle pour P. tricornutum. Cependant, dans les eaux de la claire III on s'apperçoit d'un développement semblable lors des derniers prélèvements.

Une variation de type saisonnier apparaît seulement dans le cas de l'eau du canal pour P. tricornutum .

La comparaison avec des résultats obtenus ailleurs aurait été interessante pour classifier l'importance de la fertilité trouvé ici.

Premièrement, les cas suceptibles d'être considérés similaires sont très limités.

D'un autre côté, on se verrait obligés de prendre comme seule référence de comparaison, les concentrations en nitrates et phosphates qui ont montré, dans le cas présent, ne pas être déterminantes pour la croissance, ce aui rendrait arbitraire une comparaison de ce type.

Même si nous avons une biomasse potentielle nettement plus importante que celle observé dans le milieu naturel des claires, elle ne correspond pas à une utilisation totale des nitrates et phosphates si l'on prend comme référence un milieu artificiel de culture qui a environ 17 fois plus de nitrates que les eaux ensemencées provenant des claires et qui peut produir une densité cellulaire 80 fois plus élèvée.

On peut concluir de cette étude que, dans les eaux testées, il existe des facteurs qui deviennent limitants pour la croissance de ces deux algues avant l'azote et les phosphates.

C H A P I T R E I I I

FERTILITE DES EAUX DES CLAIRES POUR LA DIATOMEE

NAVICULA OSTREARIA BORY

ELIANE GONZALEZ RODRIGUEZ

MIREYA BAGES

INTRODUCTION

Le "verdissement" fait partie de la phase d'affinage et d'engraissement des huîtres élèvées dans les parcs de la région ostreicole de la Loire Atlantique.

Ce phénomène, dû à la fixation par les branchies du bivalve d'un pigment bleu-vert diffusé dans l'eau, confère à l'huître un goût particulier.

Navicula ostrearia Bory, Bacillariophycée pennée de taille qui varie entre 65 et 113 µm de longeur et entre 6 et 12 µm de largeur, est l'agent responsable de la synthèse de ce pigment appellé "marennine".

Certains auteurs (MOREAU, 1967; DASTE et NEUVILLE, 1970) attribuent la production de la marennine à une reaction pathologique de la cellule due à des carences ou à la présence de substances biogènes dans le milieu.

Les études cytologiques sur cette algue ont définie trois stades de développement pendant lesquels on observe une évolution de la synthèse du pigment bleu des extrémes vers le centre de la cellule:

- Stade planctonique, où la quantité de marennine, si elle existe, est très réduite.
- Stade de transition planctonique-benthique, où la quantité de marennine augmente peu à peu et atteint son maximum.
- Stade benthique, où les chloroplastes sont atrophiés et la marennine se diffuse dans l'eau.

Le verdissement est un phénomène périodique et de caractère aléatoire. Son apparition est simultanée à une diminution des autres espèces végétales, en particulier des diatomées benthiques.

D'après ROBERT(1974) une variation journalière importante de la température, ainsi qu'une augmentation de pH, précédent le verdissement des claires.

MATERIEL ET METHODES

L'inoculum utilisé dans cette expérience de fertilité a été isolé par ROBERT, Faculté des Sciences de Nantes, et a été mantenu sur milieu ES PROVASOLI (1968) dilué un tièrs.

Après avoir testé des differents temps d'appauvrissement sur cette algue, une période de deux jours a été choisie pour éviter une phase de latence prolongée que nous avons constatée pour des appauvrissements plus longs. Pour s'assurer de la viabilité de l'inoculum on a inclus dans l'expérience un échantillon constitué par milieu d'entretien (temoin).

Les cellules ainsi préparées étaient dans le stade "bleu" au moment d'inoculation et sont démeurées à ce stade jusqu'à la fin de l'expérience pour tous les échantillons sauf le temoin où on a observé une révérsibilité du bleuissement. La densité de départ de l'expérience était de 1507 cell. l^{-1}.

La méthodologie utilisée est décrite dans le chapitre précédent, on expose ici seulement les modifications effectuées.

Les échantillons ont été conservés à une température de 14° C.

La croissance a été contrôlée par numération cellulaire quotidienne sur chambre hématimètrique Nageotte, de façon à déterminer le moment où la biomasse maximale a été atteinte pour chaque échantillon.

Les dosages d'ATP ont été réalisés en utilisant des standards internes pour mesurer une eventuelle inhibition de la reaction enzimatique.

RESULTATS

Parmis les paramètres utilisés comme évaluation de la biomasse, l'ATP est le plus divergent. Pour exprimer la fertilité on utilisera lateneur en chlorophylle-a et, surtout, la numération cellulaire. La comparaison entre ces trois paramètres est rapportée dans la figure 1, où on peut aussi observer les variations de la fertilité pendant la période étudiée.

Les variations de fertilité et de concentrations en sels minéraux ne correspondent pas toujours.

Pour les eaux du canal, les biomasses maximales, exprimées aussi bien en chlorophylle-a (87,2 et 86,9 $\mu g \cdot l^{-1}$) qu'en densité cellulaire (20,7 et 23,5 . 10^6 cell . l^{-1}) coïncident avec les plus hautes valeurs d'azote. Celà se retrouve pour la claire III où on peut observer une relation étroite entre la biomasse et les teneurs en azote et phosphates à partir de Sept. 1977.

Des correlations entre les divers paramètres ont été calculées (Tableau 1) et on observe des correlations significatives entre la numération cellulaire et la chlorophylle-a, excepté pour la claire I. Avec les sels minéraux, les correlations, quand elles existent, sont très faibles.

Tableau 1. Correlations entre les paramètres estimatifs de la biomasse (densité cellulaire et chlorophylle-a) et les sels minéraux initiaux (NO_2+ NO_3+ NH_3 et PO_4).

Lieu de prélèv.	n	d.cell./Chl.	N/d.cell.	P/d.cell.	N/Chl.
Canal	27	0,88	0,62	0,33	0,76
Claire I	26	0,39	0,02	0,11	0,13
Claire II	26	0,74	0,39	0,26	0,64
Claire III	20	0,81	0,43	0,54	0,40

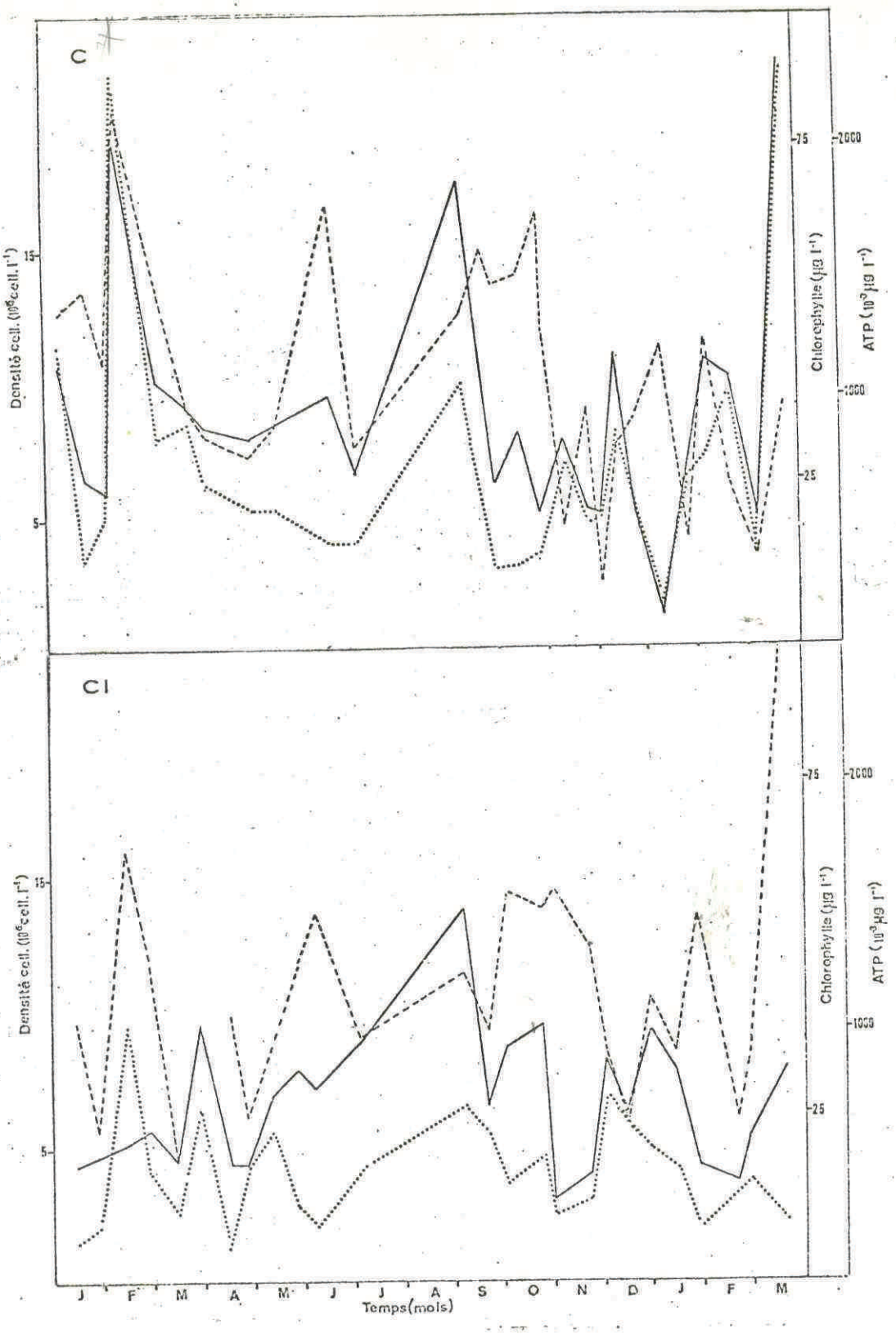


Fig. 1. Evolution des trois paramètres estimatifs de la biomasse de N. ostrearia dans les eaux du canal (C) et de la claire I (CI) au cours de la période janvier 1977 - mars 1978.

_____ Densité cellulaire, ... chlorophylle-a, _ _ _ _ ATP.

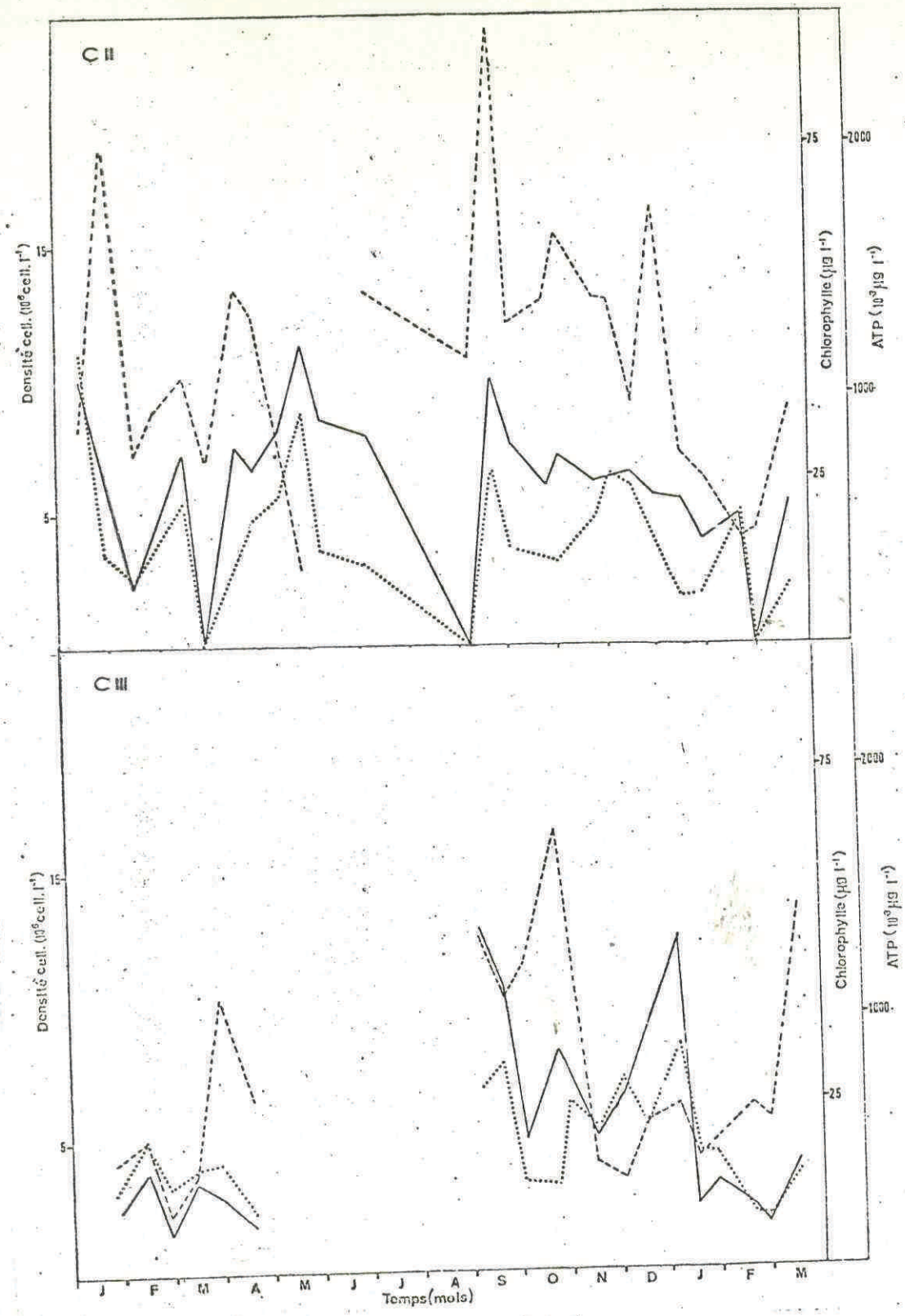


Fig. 1 (Suite). Evolution des trois paramètres estimatifs de la biomasse de N. ostrearia dans les eaux des claires II et III (CII, CIII), au cours de la période janvier 1977 - mars 1978.
_____ Densité cellulaire, ... chlorophylle-a, _ _ _ _ ATP.

Le taux de divisiob par jour est légèrement plus élèvé dans les eaux du canal que dans celles de l'ensamble de claires. La claire III montre un taux de division minimal mais un coeffi-cient de variation plus important (Tableau 2).

Tableau 2. Moyenne et écart type du nombre de divisions par jour de N. ostrearia.

Lieu de prélèv.	nb. div. jour^{-1} $\bar{x}$	$\pm$	σ
Canal	0,28		0;07
Claire I	0,26		0,05
Claire II	0,27		0,04
Claire III	0,21		0,08

La quantité moyenne de chlorophylle-a par cellule est rapporté dans le tableau 3. On remarque pour la claire III, une teneur en chlorophylle-a par cellule plus élèvé ce qui correspond à un taux faible de divisions par jour. Dans les autres cas, les valeurs sont très semblables entre elles.

Tableau 3. Taux moyen et écart type de chlorophylle-a par cellule de N. ostrearia.

Lieu de prélèv.	Chl-a ($\mu g.10^{-6}.cell.^{-1}$) $\bar{x}$	$\pm$	σ
Canal	2,90		0,90
Claire I	2,43		1,26
Claire II	2,37		0,78
Claire III	3,31		0,99

La variation des quantités moyennes d'ATP intracellulaire est très élèvé (Tableau 4).

Tableau 4. Moyenne et écart type de quantité d'ATP par cellule de N. ostrearia.

Lieu de prélèv.	ATP ($\mu g \cdot 10^{-9}$ cell.$^{-1}$) $\bar{x}$	$\pm$	σ
Canal	121,5		57,5
Claire I	181,8		94,9
Claire II	171,5		67,8
Claire III	157,6		90,5

Les valeurs correspondantes à des échantillons où toutes les cellules étaitent mortes, ont été éliminées pour le calcul des moyennes. Nous attribuons la présence d'ATP dans ces échantillons à un dévéloppement bactérien.

DISSCUSION ET CONCLUSION

Les variations de fertilité pour N. ostrearia, comme celles pour S. costatum et P. tricornutum, ne peuvent être associées aux phénomènes saisonnières.

Les fertilités observées ne sont pas identiques pour les trois organismes test, bien qu'on puisse remarquer, à certaines époques, des évolutions semblables.

Au début de l'année 1977 on observe des biomasses élèvées pour les trois algues dans les claires I et II, tandis que dans les eaux du canal, N. ostrearia présente une croissance opposée à celles de S. costatum et P.tricornutum.

En Sept. 1977, S. costatum montre une augmentation de biomasse dans le canal ainsi que dans les trois claires. Cette augmentation est suivie par N. ostrearia dans trois cas: canal, claire I et claire III. Dans la claire II, il n'y a pas eu de croissance. P. tricornutum a un comportement similaire dans les claires I et III.

De Déc. 1977 au début de mars 1978, la même variation de fertilité se trouve pour les trois algues dans les eaux du canal. Ce phénomène réapparaît en mars 1978 dans l'ensamble de claires.

En ce qui concerne les sels minéraux, la grande difference qui existe entre la teneur en azote des eaux du canal et celle des claires ne se reflète pas dans les biomasses produites. Malgré des quantités d'azote minéral plus faibles dans les claires que dans le canal, celles-ci ont une fertilité équivalente.

Ce potentiel de croissance des eaux relativement pauvres (la concentration minimale dans les claires est 2,4 µg-at N l^{-1}) a déjà été mis en évidence par plusieurs auteurs (BARBER et RYTHER, 1969; BERLAND et al., 1973c ; ANTIA et al., 1976).

BERLAND et al. (1973d) trouvent pour des tests de fertilité effectués avec des eaux du débouché du Rhône, des densités cellulaires de 690.10^6 cell. l^{-1} pour P. tricornutum et de

52 . 10^6 cell.l^{-1} pour S. costatum.

La biomasse que nous avons obtenue pour des concentration en sels minéraux voisines (9,8 µg-at $N-NO_3$ et 1,08 µg-at $P-PO_4$) est moins élèvée dans le cas de P. tricornutum , et du même ordre pour S. costatum.

D'autre part, sur les eaux mediterranéennes du large, ayant des concentrations en nitrates et phosphates beaucoup plus faibles (1,5 et 0,1 µg-at l^{-1} respectivement) la densité cellulaire obtenue pour P. tricornutum de 500.10^6 cell. l^{-1} est aussi importante que celle trouvée au débouché du Rhône (BERLAND et al., 1973 a).

Comme dans ces cas antérieurs , nous avons aussi des eaux où la concentration en azote et phosphates ne produisent pas des croissances proportionelles.

Il apparaît évident que la fertilité d'une eau est function non seulement des éléments minéraux mais également d'autres composés biogènes non dosés.

Compte tenu de la quantité très élèvée de matière dissoute et en suspension des eaux étudiées ici, on s'incline à penser à la présence de substances biologiquement actives (theorie des metabolites externes de Lucas) qui peuvent jouer un rôle stimulateur ou bien inhibiteur, sur la croissance des organismes (JONES, 1964).

Celà expliquerait la floraison d'une espèce capable de profiter de ce type de substances et l'élimination des autres moins adaptées. Phénomène qui a été observé lors de poussées de N. ostrearia dans leur milieu naturel.

C O N C L U S I O N

Certaines interprétations des résultats obtenus deviennent difficiles à cause d'impérfectionsdans le protocole expérimental utilisé; ce qui nous empêche, en premier lieu, d'évaluer les modifications que la filtration peut apporter sur la fertilité des eaux.

Il existe, en suite, le problème de conservation de l'eau. Le protocole exige que les eaux soient traitées simultanément et, pour cette raison elles ont dû étrecongélés après filtration. Nous avons observé que ce procédé de conservation apporte des modifications dans la concentration de nitrates et phosphates de l'eau que sont difficiles de contrôler et surtout, de déterminer dans quelle mesure elles ont altéré les échantillons. C'est pourquoi nous pensons qu'il est préférable d'éviter toute conservation et de tester les eaux inmédiatement après leur prélèvement; bien que l'utilisation d'inocula pas strictement idéntiques puisse introduire une erreur expérimentale modérée.

Un autre problème que nous avons affronté c'est l'estimation de la biomasse maximale. Il est évident que les divers échantillons n'arrivent pas en même temps à la phase du plateau de la courbe de croissance. En arrêtant tous les échantillons au même moment on mesure la biomasse à différents phases du développement. Dans la dernière expérience nous avons établi une surveillance plus stricte en realisant des comptages quotidiennes pour éviter cette source d'erreur.

Ce façon de procéder est laborieuse quand on dispose d'une quantité élèvé d'échantillons. Le travail de SLOVACEK et HANNAN (1977) sur la détermination de la chlorophylle_a *in vivo* offre une méthode plus commode d'effectuer le

contrôle de croissance des algues. C'est un critère qu'on peut utiliser aussi comme estimateur de la biomasse, bien que la numération cellulaire soit un paramètre plus précis. Cependant, ce dernier néglige les variations des volumes cellulaires.

Les eaux étudiées présentent une fertilité plus faible que celle que nous aurions attendu par ses teneurs en sels minéraux (NO_2, NO_3, NH_3 et PO_4) se qui nous ammène à penser à d'autres facteurs qui agissent sur la croissance.

Enfin, pour avoir une idée de la fertilité propre des claires, nous proposons une autre stratégie de prélèvements.

Des prélèvements plus fréquents entre le remplisage et l'évacuation de l'eau de la claire, donneraient une meilleure idée de l'évolution subie par l'eau dans ce milieu semi-fermé bien particulier. Elle permettrait d'apprécier, par exemple, le rôle presque certain de la nature du sédiment et de la population d'huîtres.

Vu l'importance économique de N. ostrearia, des recherches sur sa physiologie demandent donc d'être approfondies.

IEAPM
BIBLIOTECA

B I B L I O G R A P H I E

ANTIA, N.J. et CHENG, J.Y.; 1970. The survival of axenic cultures of marine planktonic algae from prolonged exposure to darkness at 20° C. Phycologia, 9:179 - 184.

ANTIA, N.J.; BERLAND, B.R.; BONIN, D.J. et MAESTRINI, S.Y.; 1976. Utilisation de la matière organique dissoute en tant que substrat par des algues unicellulaires marines. Act. de Bioch. mar. GABIM.

BARBER, R.T. et RYTHER, J.H.; 1969. Organic chelators: factors affecting primary production in Cromwell current upwelling. J. exp. mar.biol. ecol. 3: 191-199.

BERLAND, B.R.; BONIN, D.J.; MAESTRINI, S.Y. et POINTIER, J.P.; 1972. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. I. Comparaison des méthodes d'estimation. Int. Rev. ges. Hydrobiol. 57 (6): 933-944.

BERLAND, B.R.; BONIN,D.J.; COSTE, B.; MAESTRINI, S.; MINAS,H.J. 1973 a. Influence des conditions hivernales sur les productions phyto- et zooplanctoniques en Méditerranée Nord-Occidentale. III. Caractérization des eaux de surface au moyen de cultures d'algues. Mar.Biol. 23: 267-274.

BERLAND, D.R.; BONIN, D.J.; MAESTRINI, S.Y. et POINTIER, J.P. 1973 b. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. II. Limitation nutritionnelle et viabilité de l'inoculum. Int. Rev. ges. Hydrobiol. 58 (2): 203-220.

BERLAND, B.R.; BONIN,D.J.; MAESTRINI, S.Y. et POINTIER, J.P. 1973 c. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. III. Réponses de la diatomée Skeletonema costatum à différentes concentrations d'éléments nutritifs. Int.Rev. ges. Hydrobiol. 58 (3): 401-416.

BERLAND, B.R.; BONIN, D.J.; MAESTRINI, S.Y. et POINTIER, J.P. 1973 d. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. IV. Etude d'eaux côtières méditerranéennes. Int. Rev. ges. Hydrobil. 58 (4): 473-500.

CASTELLVI, J.; 1963. Pigmentos de la diatomea marina Skeletonema costatum (Grev.) en su dependencia de los factores ambientales y de la dinamica de las poblaciones. Invest. Pesq. 24: 129-137.

CASTELLVI, J.; 1971. Contribucion a la biologia de Skeletonema costatum (Grev.) Cleve. Invest. Pesq. 32 (2): 365-520.

CHARPY, C. et CHARPY, L.; 1977. Biomasse phytoplanctonique, production primaire et facteurs limitant la fertilité des eaux du golfe "San José" (Péninsule Valdes, Argentine) Thèse 3e cycle, Univ. d'Aix-Marseille II. 172 pp.

CHRETIENNOT-DINET, M.J. et VACELET, E. (sous presse). Filtration différentielle et separation du micro-nano et ultraplancton dans l'eau de mer.

DASTE, Ph. et NEUVILLE, D.; 1970. Premières observations concernant la culture unialgale et souches de Diatomées provenant de claires ostréicoles de l'île d'Oléron. C.R. Acad. Sc. Paris 270: 2486-2488.

GRAS, M.P. et GRAS, P.; 1976. Essais d'amelioration de l'engraissement et du verdissement des huîtres creuses Crassostrea gigas en milieu naturel (Claires). Sc. et Pêche, Bull. Inst. Pêches mar. (263): 1-10.

IPqM.
IEAPM BIBLIOTECA

HAYWARD, J.; 1965. Studies on the growth of Phaeodactylum tricornutum (Bohlin) I. The effect of certain organic nitrogenous substances on growth. Physiol. Plant 18: 201-207.

HAYWARD, J.; 1968. Studies on the growth of Phaeodactylum tricornutum. IV. Comparison ef different isolates. J. mar. biol. Ass. U.K. 48: 657-666.

HEALEY, F.P.; 1975. Physiological indicators ef nutrient deficiency algae. Tech. Rep. Fish. mar. service, Environ. Can., 585- 30 pp.

HOLM-HANSEN et BOOTH. 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. Limnol. Oceanogr. 11: 510-519.

JONES, G.E.; 1964. Effect of chelating agent on the growth of Escherichia coli in sea water. J. Bact. 87: 483-499.

JONES, G.E.; 1967. Precipitates from autoclaved sea water. Limnol. Oceanogr. 12: 165-167.

KERAMBRUN, P. et SZEKIELDA, K.A.; 1969. Dosage simultané du carbone et de l'azote dans le matériel en suspension dans l'eau de mer. Note technique. Théthys 1: 581-584.

*

LABORDE, P.L.; 1972. L'adénosine triphosphate des microorganismes marins planctoniques. Rapports avec la biomasse et la productivité primaire. Thèse de specialité. Univ. d'Aix-Marseille II . 108 pp.

McCARTHY,J.J.; ROWLAND TAYLOR W.; TAFT, J.L.. 1977. Nitrogenous nutrition of the plankton in the Chesapeake Bay. I. Nutrient availability and phytoplankton preferences. Limnol. Oceanogr. 22 (6): 996-1011.

MOREAU, J.; 1970. Contribution aux recherches ecologiques sur les claires à huîtres du Bassin de Marennes-Oleron. Rev. des trav. de l'Inst. des Pêches Mar. 34 (4): 381-467.

ROBERT, J.M.; 1974. Biomètrie cytologique appliquée à l'étude des stades de développement du Navicula ostrearia Bory en rapport avec le verdissement des claires dans la Baie de Bourgneuf. Thèse de III^{éme} Cycle. Univ. de Nantes. 49 pp.

ROBERT, J.M.; 1975. Le verdissement des huîtres dans les claires de la Baie de Bourgneuf. Bull. Soc. Sc. nat. Ouest de la France. 73: 123-129.

ROBERT, J.M.; PAGES,J.; PRAT, D.; 1975. Applications de la biomètrie cytologique à la définition des stades de développement du Navicula ostrearia Bory: incidences de de l'évolution pigmentaire sur le verdissement des claires à huîtres. Physiol. Vég. 13 (2): 225-241.

ROBERT, J.M.; 1977. Premières données écologiques sur les claires à huîtres de la Baie de Bourgneuf. Bull. Ecol. 8 (1): 57-62.

SHELDON, R.W.; 1972. Size separation of marine seston by membrane and glass-fiber filters. Limnol. Oceanogr. 17 (3): 494-498.

SLOVACEK, R.E. et HANNAN, P.J.; 1977. In vivo flourescence determinations of phytoplankton chlorophylle-a . Limnol. Oceanogr. 22 (5): 919-924.

SMAYDA, T.J.; 1970. Growth potential bioassay of water masses using diatom cultures: Phosphorescent Bay (Puerto Rico) and Caribbean waters. Hel. wiss. Meer. 20: 172-194.

SMAYDA, T.J.; 1974; Bioassay of the growth potential of the surface water of Lower Narragansett Bay over an annual cycle using the diatom Thalassiosira pseudonana (oceanic clone 13-1). Limnol. Oceanogr. 19 (6): 889-901.

STRICKLAND, J.D.H. et PARSONS, T.P.; 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fish. Res. Board of Can. Bull. 167, second ed.

UTERMOHL, 1958. Zur vervolkommung der quantitatieven phytoplankton. Methodik. Mitt. in Verein. theor. angew. Limnol. 9: 1-38.

*KUENZLER, J.E. et KETCHUM, B.H.; 1962. Rate of phosphorus uptake by Phaeodactylum tricornutum. Biol. Bull. 123: 134-145.