

Vitamine B<sub>12</sub>  
 Dosage biologique  
 Diatomées  
 Besoin en vitamines  
 Thermocline  
 Méditerranée nord-occidentale

Vitamin B<sub>12</sub>  
 Bioassay  
 Diatoms  
 Vitamin requirements  
 Thermocline  
 North-West Mediterranean

# Vitamine B<sub>12</sub> et phytoplancton au niveau de la thermocline en Méditerranée nord-occidentale

M. Fiala  
 Laboratoire Arago, 66650 Banyuls-sur-Mer, France.

Reçu le 23/11/81, révisé le 1/3/82, accepté le 18/3/82.

## RÉSUMÉ

La distribution de la vitamine B<sub>12</sub> et des communautés phytoplanctoniques a été suivie durant l'été près des côtes de Banyuls (Méditerranée nord-occidentale). La vitamine B<sub>12</sub> a été déterminée par dosage biologique selon le protocole préconisé par Droop auquel quelques améliorations ont été apportées. C'est au tiers inférieur de la thermocline que l'on observe des floraisons de diatomées dans les eaux riches en réserves nutritives et en vitamine B<sub>12</sub>. Cette richesse est due à une remontée inhabituelle d'eau « profonde » jusqu'au niveau de cette thermocline. On note, à trois périodes, l'apparition concomitante de fortes concentrations en B<sub>12</sub> et de floraisons de diatomées. Les espèces dominantes appartiennent essentiellement au groupe des *Pseudonitzschia*. Cinq diatomées (*Nitzschia cuspidata*, *N. subpacificica*, *N. sp.*, *Leptocylindrus danicus* et *Cylindrotheca closterium*) caractéristiques de ces floraisons estivales, ont été isolées puis testées, afin de déterminer leurs besoins en vitamines. Seule la vitamine B<sub>12</sub> s'avère être indispensable à la croissance de ces 5 algues. Ceci met en évidence le rôle de cette vitamine dans la détermination de la spécificité des communautés phytoplanctoniques estivales dans cette région.

*Oceanol. Acta*, 1982, 5, 3, 339-347

## ABSTRACT

Vitamin B<sub>12</sub> and phytoplankton at the thermocline level  
 in the North-West Mediterranean

The distribution of vitamin B<sub>12</sub> and phytoplankton communities was studied over the summer period close to the coast at Banyuls (North-West Mediterranean). Vitamin B<sub>12</sub> was measured in a bioassay according to an improved procedure adapted from Droop's method. In the lower third of the thermocline, diatom blooms were observed in water rich in nutrients and vitamin B<sub>12</sub>. This enrichment is due to an exceptional upwelling of "deep" water to the thermocline level. At three different times, high B<sub>12</sub> concentrations occur concomitantly with the diatom blooms. Dominant species belong chiefly to the *Pseudonitzschia* group. 5 diatoms (*Nitzschia cuspidata*, *N. subpacificica*, *N. sp.*, *Leptocylindrus danicus* and *Cylindrotheca closterium*) typical of these summer blooms were isolated and tested for their vitamin requirements. Only vitamin B<sub>12</sub> was found to be indispensable for the growth of these algal species. The results demonstrate the role of vitamin B<sub>12</sub> in determining the specificity of summer phytoplankton communities in this area.

*Oceanol. Acta*, 1982, 5, 3, 339-347

## INTRODUCTION

Parmi les éléments présents dans le milieu à l'état de traces, trois vitamines, la cyanocobalamine (ou vitamine B<sub>12</sub>), la thiamine (B<sub>1</sub>) et la biotine sont indispensables à la croissance de la majorité des algues.

Ce besoin en vitamines (ou auxotrophie), découvert par Lwoff et Dusi (1937 a, b, c) chez quelques flagellés, fut mis en évidence par la suite chez de nombreuses algues marines et d'eau douce. Actuellement, sur près de 400 espèces recensées (Provasoli, Carlucci, 1974), plus de la moitié sont auxotrophes avec une prédominance dans les besoins de la vitamine B<sub>12</sub> (85% des espèces); viennent ensuite, la thiamine (40%) et la biotine (7%). Du fait de son importance, la vitamine B<sub>12</sub> a fait l'objet d'un grand nombre de recherches dont celles de Droop (1954; 1955 a; 1957; 1961; 1966; 1968; 1970) qui a été l'un des pionniers de ces études chez les algues en culture.

Par contre, nos connaissances sur le rôle écologique des vitamines dans le milieu marin sont plus réduites. Ceci tient à la complexité du problème, mais aussi aux difficultés particulières de leur dosage. En effet, les teneurs en vitamines de l'eau de mer étant très faibles, elles ne peuvent être détectées par des méthodes chimiques. Elles sont mesurées par dosages biologiques, ou bioessais, faisant intervenir un micro-organisme-test.

Les premières méthodes utilisant des bactéries et algues d'eau douce furent progressivement abandonnées car elles nécessitaient un traitement préalable des échantillons (extraction chimique ou dialyse) susceptible d'engendrer une altération ou une perte d'une partie des vitamines. Les recherches s'orientèrent vers l'utilisation d'algues marines plus sensibles vis-à-vis de la vitamine B<sub>12</sub> qui permettaient un dosage direct à partir de l'échantillon. Ainsi, actuellement, des concentrations de l'ordre du dixième de nanogramme de B<sub>12</sub> par litre d'eau de mer peuvent être détectées (tableau 1).

Jusqu'à présent, la plupart des travaux effectués sur le milieu marin se sont surtout orientés vers la recherche des relations entre les vitamines, en particulier la B<sub>12</sub>, et certains paramètres caractéristiques du milieu: sels nutritifs (Vishniac, Riley, 1961; Natarajan, 1967), oxygène dissous (Daisley, Fisher, 1958), biomasse chlorophyllienne (Carlucci, Silbernagel, 1966; Ohwada, Taga, 1972). Les caractéristiques des biotopes étudiés ayant été incomplètement définies, ces résultats restent fragmentaires et difficiles à synthétiser. Cependant, quelques études plus compétes ont mis en évidence l'influence de la vitamine B<sub>12</sub> sur la succession de certaines espèces phytoplanctoniques (Menzel, Spaeth, 1962; Souprounov, Muravskaïa, 1964; Propp, 1970; Bruno, Staker, 1978). L'interprétation des relations vitamine-phytoplancton demeure cependant incomplète du fait de l'absence de connaissances des besoins vitaminiques de la plupart des algues rencontrées dans le milieu.

Notre étude avait pour but de suivre l'évolution de la vitamine B<sub>12</sub> dans la zone euphotique en fonction des caractéristiques écologiques du milieu. Elle a été menée durant l'été 1970 sur les côtes de Banyuls.

A cette époque, l'établissement d'une thermocline, à une trentaine de mètres de profondeur, a pour effet de séparer deux masses d'eau aux caractéristiques opposées (Cahet *et al.*, 1972):

— au-dessus de la thermocline, l'eau superficielle méditerranéenne de salinité voisine de 38 ‰ qui est épuisée en sels nutritifs. Cette eau renferme moins de 0,1 µg Chl *a*. l<sup>-1</sup> et la production ne dépasse pas 4 mg. m<sup>-3</sup> (pour 6 heures d'incubation à 12 000 lx);

— au-dessous, des eaux ayant une salinité élevée qui peut dépasser 38,30 ‰. Elles sont riches en réserves nutritives avec plus de 3 µatg N-NO<sub>3</sub>. l<sup>-1</sup> et 0,25 µatg P-PO<sub>4</sub>. l<sup>-1</sup>. Biomasse et production sont élevées avec respectivement plus de 0,2 µg Chl *a*. l<sup>-1</sup> et 8 mg C. m<sup>-3</sup>, mais le rapport production/Chl *a* est bas, ce qui indique un rendement médiocre du phytoplancton (Jacques, 1974).

Durant l'été 1970, on observe des conditions hydrologiques inhabituelles. En effet, l'eau intermédiaire normalement située vers 200 m de profondeur, remonte jusqu'à la thermocline où, du fait de sa forte densité, elle est arrêtée. Cette remontée d'eau provoque un enrichissement en sels nutritifs qui favorise un accroissement de la biomasse phytoplanctonique au tiers inférieur de la thermocline. C'est ainsi que la teneur en chlorophylle *a* dépasse 0,5 µg. l<sup>-1</sup> et que la production est de l'ordre de 10 mg C. m<sup>-3</sup> (maximum 18 mg à 40 m en août).

L'originalité de ce travail est d'associer une étude complète des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de l'écosystème et une analyse des besoins en vitamines des espèces dominantes des floraisons estivales isolées du milieu naturel.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Prélèvements

Dix-sept sorties hebdomadaires ont été effectuées entre juin et octobre 1970 au large des côtes de Banyuls-sur-Mer (Méditerranée nord-occidentale) par 42°29'N et 3°18'E sur des fonds de 80 m.

Les échantillons d'eau sont prélevés par pompage à six niveaux entre 10 et 60 m; une sonde de température fixée à l'embout du tuyau de pompage permet le choix précis des immersions. Les niveaux sont déterminés en fonction de la position de la thermocline; l'écart moyen entre les niveaux inférieurs et supérieurs de la thermocline est de 15 m avec des valeurs extrêmes de 8 et 24 m.

### Dosage de la vitamine B<sub>12</sub>

#### Conservation des échantillons

Après leur prélèvement, les échantillons d'eau sont filtrés sur membrane de 0,2 µm de porosité sous vide léger. Les filtrats sont conservés à -20°C à l'obscurité dans des flocons en polypropylène préalablement nettoyés à l'acide chlorhydrique dilué. Dans ces conditions, les échantillons peuvent être conservés

Tableau 1

La vitamine B<sub>12</sub> dans les eaux marines. Concentrations trouvées par les différents auteurs et modes de dosage utilisés.Vitamin B<sub>12</sub> on seawater. Concentrations found by different authors; methods used.

Auteurs	Traitement des échantillons	Micro-organisme-test	Localisation et type d'eau	Concentration en vitamine B <sub>12</sub> (ng. l <sup>-1</sup> )
Kashiwada <i>et al.</i> (1957 a)	Dialyse	<i>Euglena</i>	Pacifique Nord	0 à 100 m : 0,3 à 1,5 200 à 1200 m : 0,5 à 2,5.
Kashiwada <i>et al.</i> (1957 b)	Dialyse	<i>Euglena</i>	Baie de Kagoshima (Mer de Chine)	Moy. entrée baie : 3,8 Moy. milieu baie : 6,3 Moy. fond de baie : 6,7.
Inoue <i>et al.</i> (1973)	Dialyse	<i>Lactobacillus leichmanii</i>	Mer Intérieure du Japon (côte)	Concentrations de surface comprises entre 0,42 et 6,43; maxiums en été et en automne.
Cowey (1956)	Extraction phénolique	<i>Ochromonas malhamensis</i> et <i>Lactobacillus leichmanii</i>	Baie d'Aberdeen Mer du Nord Butt of Lewis (Nouvelle Ecosse) Côtes de Norvège Atlantique Nord	0,4-0,6; 0,1 (août)-1,2 (octobre.); 0,4 (avril)-2 (février.); 0,5 (août)-2 (avril); 0,25-0,1.
Burkholder et Burkholder (1958)	Extraction phénolique	<i>Escherichia coli</i>	Bahia Fosforescente (Porto-Rico)	3-3,5 dans la baie; 1,3 à l'extérieur de la baie.
Souprounov et Muravskaja (1964)	Extraction avec orthocrésol + tétrachlorure de carbone	Mutant <i>Escherichia coli</i> , 113-3	Baie de Sébastopol (Mer Noire)	Dans les 15 premiers mètres = concentrations moyennes maximales en automne (1,33) et en hiver (1,88).
Souprounov <i>et al.</i> (1966)	Extraction avec orthocrésol + tétrachlorure de carbone	Mutant, <i>Escherichia coli</i> , 113-3	Mer Noire	Pas de différences sensibles entre la côte et le large. Augmentation avec la profondeur : 0,22 en surface et 3,16 à 100 m.
Propp (1970)	Extraction avec orthocrésol + tétrachlorure de carbone	Mutant, <i>Escherichia coli</i> , 113-3	Mer de Barents (côte)	Dans la zone euphotique, variations saisonnières; 2 pics : en février (2,16) et en octobre (1,92).
Daisley et Fisher (1958)	Dosage direct (sur échantillon dilué)	<i>Euglena gracilis</i>	Atlantique Nord-Est	Surface : 0,57 (moy.), 190-2 100 m : 2,26 (moy.).
Vishniac et Riley (1961)	Dosage direct	<i>Thraustochytrium globosum</i> (champignon non filamenteux)	Long Island Sound (côte)	Variations saisonnières marquées : maximum en hiver (14,6) puis chute printanière (4,5).
Menzel et Spaeth (1962)	Dosage direct	<i>Cyclotella nana</i> clone 3 H	Mer des Sargasses	0 à 100 m; 0,01 à 0,1; maximum à 500 m : 0,1 à 0,22.
Carlucci et Silbernagel (1966)	Dosage direct	<i>Cyclotella nana</i> clone 13-1	Océan Pacifique	Entre 0 et 50 m : 0 à 2,5. Augmentation avec la profondeur avec maximum entre 100 et 500 m (3,7), ensuite décroissance.
Natarajan (1967)	Dosage direct	<i>Cyclotella nana</i> clone 3 H	Océan Pacifique subarctique (Péninsule d'Alaska)	Concentration dans la couche euphotique entre 0 et 3,39.
Carlucci (1970)	Dosage direct	<i>Cyclotella nana</i> clone 13-1	Océan Pacifique	Quai la Jolla : 2,9 (moy.); Côtes : 1,3 à 2,2 (moy.); Large : 0,1 (moy.); Variations saisonnières : maximum en été (6).
Ohwada et Taga (1972)	Dosage direct	<i>Cyclotella nana</i> clone 3 H	Côte Pacifique du Japon (Baie Sagami)	Variations saisonnières avec en été, maximums en surface : 4,8 (moy.) et entre 20 et 200 m : 1,8 (moy.). Valeur maximale en surface (14,3). Décroissance avec la profondeur avec pic à 20 m, puis uniformité entre 50 et 150 m.
Cattell (1973)	Dosage direct	<i>Amphidinium carterae</i>	Détroit de Georgie (Colombie Britannique, Pacifique)	Dans les 100 premiers mètres : maximum en hiver et en été (moy. 8).
Swift (1973)	Dosage direct	<i>Thalassiosira pseudonana</i> (= <i>C. nana</i> ), clone 3 H	Golfe de Maine (Atlantique)	Maximum en hiver (1,6 à 20 m), diminution au printemps (0,1) puis remontée modérée en été (0,3-0,8).
Martin et Vacelet (1975)	Dosage direct	<i>Monochrysis lutheri</i>	Flaques supralittorales de Méditerranée	Maximums au printemps, été, automne. Concentrations supérieures à 20 ng. l <sup>-1</sup> .
Carlucci et Cuhel (1977)	Dosage direct	<i>Cyclotella nana</i> clone 13-1	Secteur antarctique de l'Océan Indien	Valeurs comprises entre 0 et 3,3; 0-75 m : 0,2 (moy.); 125-495 m : 0,6 (moy.); au-delà de 900 m : 0,7 (moy.); 20% échantillons ont des concentrations indétectables.
Bruno et Staker (1978)	Dosage direct	<i>Thalassiosira pseudonana</i> clone 3 H	Baie de Napeague (Long Island)	Dans les 6 premiers mètres : valeurs maximales l'été (10,6); concentrations indétectables durant l'hiver.
Nishijima et Hata (1979)	Dosage direct	<i>Euglena gracilis</i> souche Z	Baie de Tosa (Océan Pacifique) côte polluée	En surface, valeurs comprises entre 0,92 et 56. Maximum en hiver, et minimum au printemps et à l'automne.

plusieurs mois sans que la concentration en vitamine ne subisse de modifications (Carlucci, Silbernagel, 1966; Carlucci *et al.*, 1969).

### Protocole expérimental

#### Principes

La détermination de la vitamine B<sub>12</sub> a été effectuée selon la méthode préconisée par Droop (1955 c) qui est fondée sur les principes de l'essai en six points décrit par Finney (1952). Cette méthode, jusque-là inutilisée, a été testée et quelques améliorations y ont été apportées afin de la rendre plus efficace.

Rappelons brièvement les principes de cette méthode. Un échantillon d'eau de mer contenant Z ng de B<sub>12</sub> par litre est divisé en deux parties A et B. Si on dilue r fois la partie A, la différence M de concentration en B<sub>12</sub> entre A et B sera :

$$M = Z \cdot \frac{r-1}{r}, \quad \text{d'où} \quad Z = M \cdot \frac{r}{r-1}. \quad (1)$$

Après enrichissement en éléments nutritifs (sels minéraux et métaux), on ajoute aux deux parties aliquotes 3 doses graduelles de B<sub>12</sub> : e, 2e, 3e, et on inocule une souche d'algue. Après la croissance de cette dernière, on obtient 3 réponses pour chacune des parties A et B, ce qui permet de tracer 2 droites de régression de type réponse (Y)/dose (X).

En tenant compte de la raison de la progression des doses de B<sub>12</sub> ajoutées (ici e) et du facteur de dilution d dû à l'addition de la solution nutritive, l'équation (1) devient :

$$Z = M \cdot \frac{r}{r-1} \cdot e \cdot d, \quad (2)$$

M peut être calculé selon la formule (Finney, 1952) :

$$M = (\bar{X}_A - \bar{X}_B) - \frac{(\bar{Y}_A - \bar{Y}_B)}{b}.$$

$\bar{X}_A$  et  $\bar{X}_B$  sont les moyennes des doses (ici  $\bar{X}_A = \bar{X}_B$ , les doses de B<sub>12</sub> pour A et B étant identiques);  $\bar{Y}_A$  et  $\bar{Y}_B$  : moyennes des réponses; b est le coefficient de régression des deux droites.

On peut traiter statistiquement les résultats afin de tester la validité des dosages en inoculant plusieurs tubes par série. L'analyse de variance et le calcul de M sont grandement facilités par l'utilisation des coefficients factoriaux (Finney, 1952). Les calculs complets ont été décrits par ailleurs (Lison, 1968; Fiala, 1980).

#### Eau de mer sans vitamine

Comme nous l'avons signalé précédemment, la partie A de l'échantillon est diluée. Nous avons utilisé de l'eau de mer sans vitamine préparée selon la méthode de Strickland et Parsons (1968), plutôt que de l'eau de mer synthétique comme le fait Droop (1955 c). En effet, les essais effectués sur un même échantillon d'eau de mer

ont montré que la valeur de B<sub>12</sub> trouvée varie en fonction du titre de dilution quand celle-ci est faite avec de l'eau de mer synthétique, ce qui n'est pas le cas avec de l'eau de mer sans vitamine (Fiala, 1980). Ceci peut s'expliquer par un apport de B<sub>12</sub> par les produits chimiques et par le fait que l'eau de mer synthétique autoclavée est plus favorable à la croissance des algues que l'eau de mer naturelle.

#### Solution nutritive

Afin de permettre la croissance de l'algue-test, chacune des deux parties A et B est enrichie avec un volume égal d'une solution nutritive composée de : KNO<sub>3</sub> : 0,2 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,02 g; glycine : 0,5 g; glycyglycine : 1 g; vitamine B<sub>1</sub> : 0,001 g; solutions métalliques TM 2 : 20 ml et SW 2 : 10 ml (*cf.* Droop, 1955 b); eau distillée : 1 000 ml. Le pH des deux parties aliquotes est ensuite ajusté à 8.

#### Doses de B<sub>12</sub> ajoutées

La validité des dosages biologiques effectués avec des animaux comme organismes-tests repose sur le fait que l'effet est proportionnel au logarithme de la dose administrée. En ce qui concerne les algues, et donc la Chrysofycée *Pavlova* (*Monochrysis*) *lutheri* utilisée dans cet essai, la croissance varie linéairement avec les concentrations en B<sub>12</sub> du milieu (Droop, 1961). C'est pour cette raison que les doses de vitamine ajoutées sont en progression arithmétique : 3, 6, 9 ng. l<sup>-1</sup>, ce qui correspond à 18, 36 et 54 pg de B<sub>12</sub> pour un volume de 6 ml délivré dans chaque tube. On utilise 4 tubes par série, soit 24 tubes pour le dosage d'un échantillon.

#### Stérilisation

Le temps d'autoclavage doit être le plus court possible, mais cependant assurer une stérilité parfaite. Ceci peut être réalisé avec un autocuiseur ménager qui permet une stérilisation plus douce qu'un autoclave classique. Des essais comparatifs (Fiala, 1980) ont montré une perte de B<sub>12</sub> en fonction du temps. Le temps minimum correspondant au début de la rotation de la soupape de l'autocuiseur est suffisant pour assurer la stérilisation des échantillons. Celle-ci est contrôlée systématiquement sur tous les échantillons par inoculation sur le milieu organique E 6 (Provasoli *et al.*, 1957).

#### Algue-test

Dans chaque tube on inocule 0,02 ml (soit une goutte de pipette Pasteur) d'une culture axénique de *Pavlova* (*Monochrysis*) *lutheri* contenant entre 10 000 et 15 000 cellules par millilitre. Les tubes à essais sont incubés à 18 ± 2°C sous éclairage continu (tube Sylvania Grolux) de 25 μE. m<sup>-2</sup>. s<sup>-1</sup> durant 21 jours. Les densités optiques sont alors mesurées au spectrophotomètre « Spectronic 700, Bausch et Lomb » à 750 nm dans des cuves de 1 cm de trajet optique.

## Isolement et besoins en vitamines des espèces phytoplanctoniques

### Isolement

L'isolement des algues est effectué soit directement à partir de l'eau de mer, soit après son enrichissement. Dans ce dernier cas quelques dizaines de millilitres d'eau de mer sont inoculées dans le milieu *f* (Guillard, Ryther, 1962) dilué de 2 à 10 fois, puis mis à incuber 8 à 10 jours à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  sous éclairage fluorescent continu (tubes Sylvania Grolux) de  $35 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Chaque cellule est ensuite isolée sous microscope inversé à l'aide d'une micropipette puis transférée dans le milieu de culture approprié. Après plusieurs repiquages, les cultures sont décontaminées afin de les rendre axéniques à l'aide d'un mélange d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine et chloramphénicol) selon le protocole décrit par Droop (1967). Des contrôles réguliers de stérilité sont effectués à chaque repiquage sur milieu organique E 6 (Provasoli *et al.*, 1957).

Cinq diatomées caractéristiques des floraisons estivales ont été ainsi isolées et maintenues en culture axénique : *Leptocylindrus danicus*, *Cylindrotheca closterium* (= *Nitzschia closterium*) et trois espèces de *Nitzschia* : *Nitzschia cupidata*, *N. subpacificica*, *Nitzschia* sp. La détermination des différentes *Nitzschia* a été effectuée après examen au microscope électronique à transmission (Fiala, 1980).

### Détermination des besoins en vitamines

Les algues sont repiquées lors de leur phase exponentielle à raison de 0,1 ml de culture dans 100 ml de milieu *f*/2 préparé avec de l'eau de mer sans vitamine (Strickland, Parsons, 1968), auquel on ajoute stérilement les différentes vitamines. On compte cinq erlen par série : milieu complet ( $B_{12} + B_1 + \text{Biotine}$ ); milieu sans  $B_{12}$ ; milieu sans  $B_1$ ; milieu sans biotine et milieu sans aucune vitamine (0). Les souches sont repiquées régulièrement dans ces différents milieux et les courbes de croissance sont dressées après comptage à l'aide des divers hématimètres : Agasse-Lafont, Fuchs-Rosenthal, Malassez et Thoma.

## RÉSULTATS

### Teneurs des eaux en vitamine B<sub>12</sub> et évolution des populations phytoplanctoniques durant l'été

Les concentrations en vitamine B<sub>12</sub> des eaux côtières méditerranéennes sont comprises entre 0 et  $10 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ . Elles sont du même ordre de grandeur que celles observées dans d'autres régions (tableau 1). Sur les 105 échantillons analysés, 73% ont des valeurs supérieures à  $0,1 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  (limite de détection de la méthode). On observe, tout au long de l'été, une augmentation des concentrations en B<sub>12</sub> avec la profondeur (tableau 2). Voisines de  $1 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  dans les 30 premiers mètres, les valeurs moyennes augmentent fortement vers l'horizon 35 m, ce qui confirme « l'effet thermocline » déjà observé pour les autres paramètres (Cahet *et al.*, 1972). C'est à 60 m que les valeurs moyennes atteignent leur maximum avec  $2,5 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ , ce qui semble indiquer un

Tableau 2

Teneurs en vitamine B<sub>12</sub>, densité des populations phytoplanctoniques et des diatomées. Valeurs moyennes pour chaque niveau.

Vitamin B<sub>12</sub> concentrations, phytoplanktonic communities and diatom densities. Mean values for each level.

Profondeur moyenne (m)	Concentration en vitamine B <sub>12</sub> ( $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ )	Phytoplancton total ( $\text{cell} \cdot \text{l}^{-1}$ )	Nombre de diatomées ( $\text{cell} \cdot \text{l}^{-1}$ )
10	0,95	57 000	34 000
25	0,96	60 000	41 000
29	1,12	60 500	41 000
34	1,54	84 000	75 500
38	2,42	84 500	32 000
60	2,52	42 500	9 000

apport de cyanocobalamine par les eaux de remontée. Au-dessus de la thermocline, les eaux superficielles ont des teneurs en B<sub>12</sub> relativement faibles mais toujours au-dessus de la limite de détection ( $0,1 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ ), à l'exception de la période comprise entre le 25 août et le 9 septembre. On note parfois quelques valeurs supérieures à  $1 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  entre 10 et 20 m à la mi-août, voire à plus de  $2 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  à la mi-septembre et au début d'octobre où elles atteignent près de  $3 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  (fig. 1). Au-dessus de la barrière thermique, les eaux sont toujours relativement riches en B<sub>12</sub>. C'est au début de l'été, lors de l'établissement de la thermocline, que la B<sub>12</sub> atteint son maximum avec  $10 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  à 60 m de profondeur. On observe, par la suite, durant de brèves périodes, quelques foyers d'eaux riches en B<sub>12</sub> : à la fin juillet avec près de  $4 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  entre 30 et 40 m, à la mi-août ( $5,3 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$  à 40 m le 18 août) et à la fin

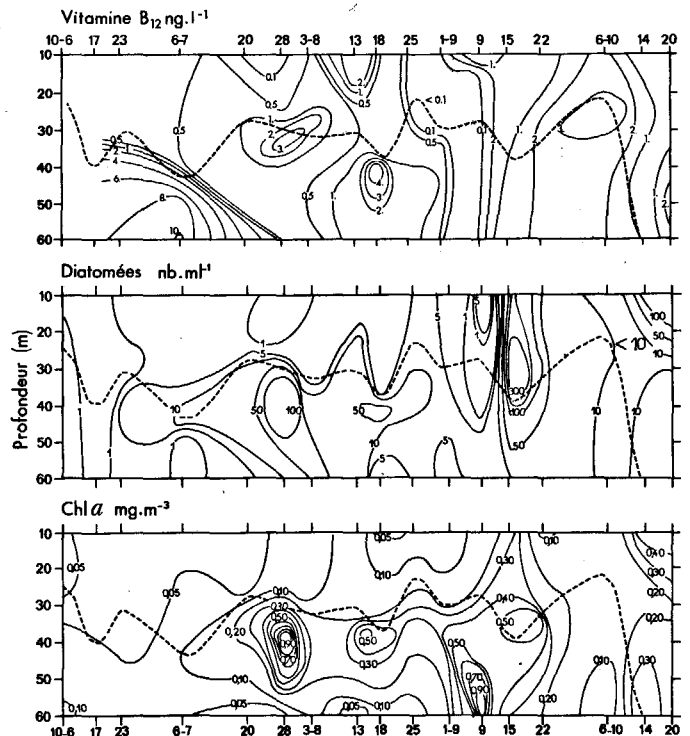


Figure 1

Vitamine B<sub>12</sub>, diatomées, biomasse chlorophyllienne pendant l'été 1970 à Banyuls. Le trait pointillé figure l'immersion de l'isotherme  $15^\circ\text{C}$ .

Vitamin B<sub>12</sub>, diatoms and chlorophyll during summer 1970 in Banyuls. The dotted line shows the depth of the  $15^\circ\text{C}$  isotherm.

septembre-début octobre ( $4 \text{ ng.l}^{-1}$  à  $26 \text{ m}$ ). Durant cette dernière période, sur toute la colonne d'eau, les concentrations en  $B_{12}$  dépassent  $1 \text{ ng.l}^{-1}$  (fig. 1).

L'influence de la thermocline se fait également sentir sur la distribution des diatomées. Ce groupe représente de l'ordre de 60 à 70% du phytoplancton total, sauf en profondeur où le nanoplancton est prépondérant (tableau 2). C'est au niveau de la thermocline que les diatomées atteignent leur maximum avec une moyenne de 75 500 cellules par litre, alors qu'en surface leur densité est faible. Contrairement à certaines autres années (Jacques, 1969), il n'y a pas de différences qualitatives notables entre les communautés superficielles et celles des eaux profondes.

Au cours de l'été, on observe au-dessous de la thermocline plusieurs floraisons dominées par le groupe des *Pseudonitzschia*. Bien que modérés, ces développements phytoplanctoniques estivaux n'en sont pas moins caractéristiques et s'observent régulièrement dans la région de Banyuls (Jacques, 1970). Durant l'été 1970, on note trois floraisons de très brève durée qui coïncident avec la présence de trois foyers de vitamine  $B_{12}$  (fig. 1) :

— la première, fin juillet, entre 30 et 40 m, avec un maximum de  $192\,000 \text{ c.l}^{-1}$  à 34 m, dominée par « *Nitzschia delicatissima* » ( $67\,000 \text{ c.l}^{-1}$ ), *Leptocylindrus danicus* ( $35\,400 \text{ c.l}^{-1}$ ), « *N. pungens* » ( $32\,400 \text{ c.l}^{-1}$ ) et *Schröderella delicatula* ( $23\,000 \text{ c.l}^{-1}$ );

— la seconde, très modérée, à la mi-août, entre 30 et 40 m ( $50\,000 \text{ c.l}^{-1}$  à 39 m), est composée de nombreuses espèces : *Chaetoceros curvisetus*, *C. pseudo-curvisetus*, « *Nitzschia delicatissima* », « *N. pungens* », *Thalassiothrix frauenfeldii*, *Leptocylindrus danicus*... Bien que peu abondant, ce phytoplancton est particulièrement productif ( $18 \text{ mg C.m}^{-3}$  à 39 m, valeur maximale trouvée durant l'été);

— la troisième, numériquement la plus importante, à la mi-septembre entre 10 et 45 m. On enregistre le 15 septembre une moyenne de  $272\,000 \text{ c.l}^{-1}$  avec un pic à 35 m ( $367\,000 \text{ c.l}^{-1}$ ); une semaine plus tard ce bloom s'atténue avec  $262\,000 \text{ c.l}^{-1}$  à 31 m. Deux espèces dominent « *N. pungens* » et « *N. delicatissima* », qui représentent 92% du nombre total de diatomées.

Une relation incontestable existe entre la richesse des eaux en vitamine  $B_{12}$  et ces floraisons de diatomées. En effet, lors de ces trois périodes, on trouve au niveau de la thermocline des teneurs élevées en  $B_{12}$  avec des maximums supérieurs ou égaux à  $4 \text{ ng.l}^{-1}$  (fig. 1). Cette relation a été également observée en mer des Sargasses où la présence de diatomées auxotrophes coïncide avec celle de  $B_{12}$  (Menzel, Spaeth, 1962). De même, dans la Baie de Sébastopol, les floraisons de *Skeletonema costatum* et de *Chaetoceros curvisetus* sont consécutives à l'apparition de concentrations élevées en  $B_{12}$  (Souprounov, Muravskaja, 1964). Dans les eaux de la mer de Barents, Propp (1970) attribue également la disparition de la  $B_{12}$  à d'importantes floraisons de *Skeletonema costatum* et de *Leptocylindrus danicus*. Cependant, l'interprétation de ces travaux écologiques reste incomplète par le manque de connaissances concernant les besoins en vitamines des espèces d'algues

rencontrées dans le milieu. Ainsi, dans les travaux précités, seule l'auxotrophie de *Skeletonema costatum* vis-à-vis de la  $B_{12}$  a été mise en évidence.

#### Nature des besoins en vitamines de quelques diatomées caractéristiques des floraisons estivales méditerranéennes

Les expériences de privation en différentes vitamines ont porté sur cinq diatomées qui ont été isolées lors de floraisons estivales : *Leptocylindrus danicus*, *Cylindrotheca closterium* var. *closterium* (*Nitzschia closterium*) et 3 espèces du groupe des *Pseudonitzschia* : *N. cuspidata*, *N. subpacificica* et *N. sp.*

En ce qui concerne le groupe des *Pseudonitzschia*, Hasle (1965) l'a divisé en deux complexes : le complexe *N. seriata* et le complexe *N. delicatissima*. Cette division repose sur des critères de taille et surtout de morphologie du frustule qui ne sont perceptibles qu'au microscope électronique. Il est en effet difficile d'identifier les différentes espèces de *Nitzschia* au microscope optique où l'on peut essentiellement se fonder sur la longueur et la largeur du frustule.

Chez ces 5 espèces, l'effet de privation en  $B_{12}$  se fait ressentir dès le premier repiquage malgré l'apport de vitamines associé à l'inoculum et les réserves intracellulaires des algues. Dans les milieux privés en  $B_{12}$ , le nombre de cellules en fin de croissance est de 10 à 100 fois inférieur à celui des milieux complets, ou privés en  $B_1$ , ou en biotine. Le deuxième repiquage accentue encore cette tendance (fig. 2). C'est au bout du troisième ou du quatrième repiquage que la croissance s'arrête complètement en l'absence de  $B_{12}$ .

Seule, parmi les trois vitamines testées, la cyanocobalamine est obligatoirement requise pour la croissance de ces cinq diatomées. En ce qui concerne le clone de *Cylindrotheca closterium*, nos résultats confirment ceux de Guillard (1968). Il s'avère donc que les principales espèces responsables des floraisons estivales méditerranéennes, comme la majorité des diatomées, sont auxotrophes vis-à-vis de la vitamine  $B_{12}$ . Une autre espèce, *Skeletonema costatum*, qui, bien que présente dans ces floraisons estivales, mais en nombre réduit, requiert également la  $B_{12}$  (Droop, 1955 a).

#### DISCUSSION

Lors de l'été 1970, la remontée d'eau intermédiaire a eu pour effet d'enrichir les eaux sous-jacentes en sels nutritifs. Il est fortement probable que la vitamine  $B_{12}$  soit également amenée par cette eau de remontée comme en témoignent les fortes concentrations enregistrées sous la thermocline. Ceci est confirmé par les observations de Kashiwada *et al.* (1957 a), Daisley et Fischer (1958) et Menzel et Spaeth (1962), qui ont trouvé des concentrations maximales de  $B_{12}$  dans les eaux océaniques entre 200 et 500 m.

L'eau de remontée est freinée par la thermocline et ne permet pas à la  $B_{12}$  d'atteindre les horizons supérieurs. Dans la couche de surface les teneurs en cyanocobala-

mine demeurent relativement basses mais non limitantes sauf peut être à la fin août où elles sont inférieures au seuil de détection. Cette présence de vitamine B<sub>12</sub> est vraisemblablement due à une excrétion ayant pour origine les bactéries participant à la dégradation de la matière organique (Berland *et al.*, 1978), mais aussi à une libération lors de la mort des algues. Cette vitamine, bien qu'en quantité faible, pourrait cependant être suffisante pour induire un développement phytoplanc-

tonique modéré. Celui-ci s'avère être impossible du fait de l'extrême oligotrophie des eaux. En effet, la carence en sels nutritifs, nitrates et phosphates, a un effet limitant sur la production phytoplantonique comme l'ont montré les expériences de fertilisation réalisées dans cette région (Jacques *et al.*, 1973; Fiala *et al.*, 1976).

Au-dessous de la thermocline, l'arrivée d'éléments nutritifs crée des conditions favorables au développe-

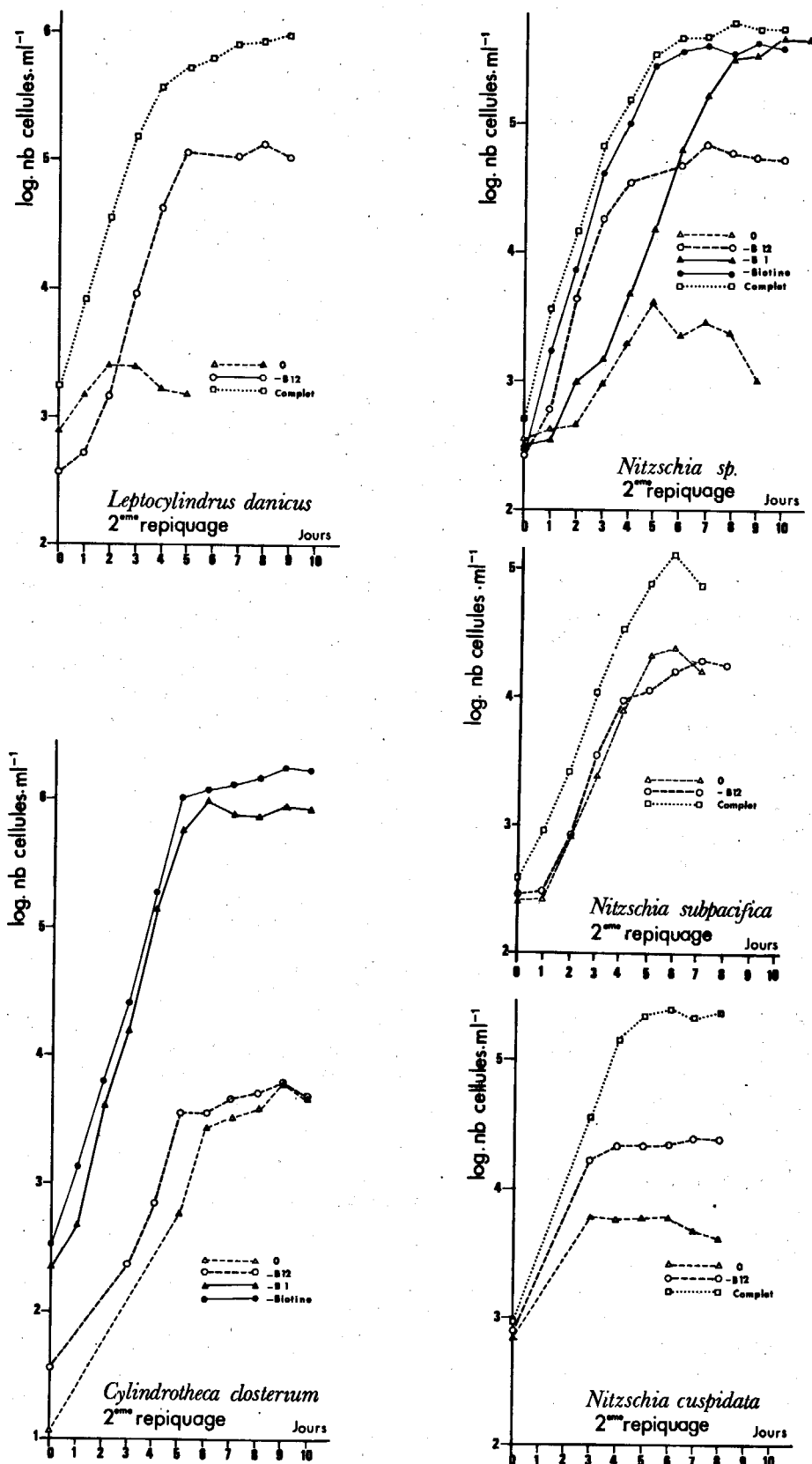


Figure 2

Croissance de *Leptocylindrus danicus*, *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia sp.*, *N. subpacific* et *N. cuspidata* dans le milieu f/2 privé en différentes vitamines (deuxième repiquage). Le milieu « complet » comporte les trois vitamines (B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub>, biotine), le milieu « 0 » aucune.

Growth of *Leptocylindrus danicus*, *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia sp.*, *N. subpacific* et *N. cuspidata* in f/2 medium lacking different vitamins (second transfer). The "complete" medium contains the three vitamins (B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub> and biotin), the medium "0", none of these.

ment de diatomées. La présence concomitante de foyers de  $B_{12}$  et leur disparition rapide à la fin des floraisons permettent de penser que cette vitamine a été utilisée par ces algues. Bien que l'auxotrophie des diatomées vis-à-vis de la  $B_{12}$  soit généralement admise, il faut souligner que fort peu d'études sur les besoins en vitamines des algues planctoniques ont été réalisées. En ce qui concerne les diatomées, seulement une vingtaine d'espèces a été étudiée (Guillard, 1963; Guillard, 1968; Guillard, Cassie, 1963). Ce manque d'informations a conduit la plupart des auteurs travaillant sur l'écologie des vitamines à émettre des hypothèses sur la nature des besoins des espèces caractéristiques. Mais il est dangereux de généraliser; la présence simultanée de vitamines et d'algues caractéristiques ne signifie pas obligatoirement que ces dernières en ont un besoin absolu. Ainsi, Swift et Guillard (1978) ont montré que chez 12 clones de diatomées centriques, la  $B_{12}$  était assimilée et favorisait leur croissance bien que ces espèces ne soient pas auxotrophes. De plus, cette présence de vitamine dans le milieu peut être due à une excrétion de la part des algues elles-mêmes, comme cela a été démontré en culture (Carlucci, Bowes, 1970 a et b; Aaronson *et al.*, 1971; Berland *et al.*, 1974; Carlucci, 1974).

Il est donc nécessaire dans toutes études écologiques de connaître la nature des besoins vitaminiques des algues présentes dans le milieu afin de pouvoir interpréter les phénomènes.

Cependant, la détermination des besoins peut être affinée, notamment en ce qui concerne la  $B_{12}$ . En effet, cette vitamine se présente sous différentes formes ayant une structure chimique voisine appelées analogues. Chaque algue possède une spécificité de réponse vis-à-vis des différents analogues. Ceci a une conséquence au niveau du dosage de la vitamine; en effet, la forme de  $B_{12}$  dosée dépend de la spécificité de réponse de l'algue utilisée comme organisme-test. Ainsi, *Pavlova lutheri* a une réponse du type *Lactobacillus*, c'est-à-dire qu'elle est exclusivement sensible aux analogues dont la molécule possède un nucléotide ayant pour base, soit le benzimidazole ( $B_{12}$  vraie), soit l'adénine ou une base purique similaire (pseudovitamine  $B_{12}$ ).

L'importance des divers analogues de la vitamine  $B_{12}$  dans l'eau de mer est difficile à évaluer car il faut utiliser, pour un même échantillon, trois micro-organismes ayant des spécificités complémentaires. Cowey (1956), utilisant *Ochromonas malhamensis* et *Lactobacillus leichmanii*, obtient, pour un même échantillon, des valeurs de  $4 \text{ ng.l}^{-1}$  pour la  $B_{12}$  vraie et  $6 \text{ ng.l}^{-1}$  pour l'ensemble  $B_{12}$  + pseudovitamine  $B_{12}$ . Pour un échantillon testé avec trois diatomées différentes, Swift et Guillard (1977) trouvent  $1 \text{ ng.l}^{-1}$  de  $B_{12}$  vraie,  $1,6 \text{ ng.l}^{-1}$  de pseudovitamine  $B_{12}$  et  $0,4 \text{ ng.l}^{-1}$  de facteur B. Ces mêmes auteurs mentionnent des rapports cobamides totales/ $B_{12}$  vraie variant de 1,4 en surface à 2,3 à 150 m, dans les eaux du Golfe de Maine. Par ailleurs, Guillard (1968) a montré que, chez les diatomées, la spécificité de réponse vis-à-vis des analogues n'est pas du type tout ou rien; en fait, elles répondent de façon variable aux différents analogues et la classification n'est pas absolue mais dépend du degré

de réponse choisi. Ainsi, les analogues sont considérés comme actifs si  $4 \text{ ng.l}^{-1}$  donnent plus de 10% de la croissance obtenue avec une quantité équivalente de  $B_{12}$  vraie.

Dans les études écologiques importantes, il est difficile pour des raisons pratiques, de pousser aussi loin la connaissance de la spécificité des besoins en  $B_{12}$  ainsi que celle des différentes formes d'analogues présentes dans le milieu.

Par contre, il est important de savoir si la vitamine est assimilable ou non par les algues. En effet, les tests biologiques prennent en compte aussi bien les formes de vitamine  $B_{12}$  libres qu'associées. En ce qui concerne notre étude, il est légitime de penser que la quantité de  $B_{12}$  associée est faible, étant donné le nombre relativement peu élevé de cellules présentes dans le milieu. En effet, si l'on se réfère aux expériences de Droop (1968), on constate qu'il faut de l'ordre d'un million de *Pavlova* pour produire entre 0,1 et 1 pg de  $B_{12}$  associée par jour.

Il apparaît donc que durant l'été, l'arrivée d'eau intermédiaire, riche en sels nutritifs, jusqu'au niveau de la thermocline, a pour effet de favoriser le développement de floraisons phytoplanctoniques dont la composition spécifique est déterminée par la présence de vitamine  $B_{12}$ .

#### Remerciements

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont apporté leur aide dans la réalisation de ce travail: le Dr. M. R. Droop pour ses judicieux conseils, le Dr. G. R. Hasle pour son aide dans la détermination des diatomées, G. Jacques qui a effectué les comptages de phytoplancton ainsi que M<sup>mes</sup> L. Oriol et M. J. Nattero pour leur assistance technique et M<sup>me</sup> T. Vendroux pour la dactylographie du manuscrit. Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrat LA 117 du CNRS.

#### RÉFÉRENCES

- Aaronson S., DeAngelis B., Franck O., Baker H., 1971. Secretion of vitamins and amino acids into the environment by *Ochromonas danica*. *J. Phycol.*, 7, 215-218.
- Berland B. R., Bonin D. J., Maestrini S. Y., 1974. Étude expérimentale de l'influence de facteurs nutritionnels sur la production du phytoplancton de Méditerranée, *Thèse Doct. État, Univ. Aix-Marseille*, 239 p.
- Berland B. R., Bonin D. J., Fiala M., Maestrini S. Y., 1978. Importance des vitamines en mer. Consommation et production par les algues et les bactéries, in: *Les substances organiques naturelles dissoutes dans l'eau de mer*, éd. CNRS, Paris, 121-146.
- Bruno S. F., Staker R. D., 1978. Seasonal vitamin  $B_{12}$  and phytoplankton distribution near Napeague Bay, New York (Block Island Sound), *Limnol. Oceanogr.*, 23, 1045-1051.
- Burkholder P. R., Burkholder L. M., 1958. Studies on B vitamins in relation to productivity of Bahia Fosforescence, Puerto-Rico, *Bull. Mar. Sci. Gulf Caribb.*, 8, 201-223.
- Cahet G., Fiala M., Jacques G., Panouse M., 1972. Production primaire au niveau de la thermocline en zone néritique de Méditerranée nord-occidentale, *Mar. Biol.*, 14, 32-40.
- Carlucci A. F., 1970. The ecology of the plankton off La Jolla, California, in the period April through September, 1967, II. Vitamin  $B_{12}$ , thiamine and biotin, *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.*, 17, 23-30.
- Carlucci A. F., 1974. Production and utilization of dissolved vitamins by marine phytoplankton, in: *Effect of ocean environment on microbial activities*, edited by R. R. Colwell and R. Y. Morita, Univ. Park Press, Baltimore, 449-456.



- Carlucci A. F., Silbernagel S. B., 1966. Bioassay of seawater. III. Distribution of vitamin B<sub>12</sub> in the North-East Pacific Ocean, *Limnol. Oceanogr.*, 642-646.
- Carlucci A. F., Bowes P. M., 1970a. Production of vitamin B<sub>12</sub>, thiamine and biotin by phytoplankton, *J. Phycol.*, 6, 351-357.
- Carlucci A. F., Bowes P. M., 1970b. Vitamin production and utilization by phytoplankton in mixed culture, *J. Phycol.*, 6, 393-400.
- Carlucci A. F., Cubel R. L., 1977. Vitamins in the South Polar Seas: distribution and significance of dissolved and particulate vitamin B<sub>12</sub>, thiamine and biotin in the Southern Indian Ocean, in: *Adaptation within Antarctic ecosystems. IIIrd SCAR Symposium Antarct. Biol.*, edited by G. A. Llano, Smithsonian Inst., 115-128.
- Carlucci A. F., Silbernagel S. B., McNally P. M., 1969. Influence of temperature and solar radiation on persistence of vitamin B<sub>12</sub>, thiamine and biotin in seawater, *J. Phycol.*, 5, 302-305.
- Cattell S. A., 1973. The seasonal cycle of vitamin B<sub>12</sub> in the Strait of Georgia, British Columbia, *J. Fish. Res. Board Can.*, 30, 215-222.
- Cowey C. B., 1956. A preliminary investigation of the variation of vitamin B<sub>12</sub> in oceanic and coastal waters, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 35, 609-620.
- Daisley K. W., Fisher L. R., 1958. Vertical distribution of vitamin B<sub>12</sub> in the sea, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 37, 683-686.
- Droop M. R., 1954. Cobalamin requirement in Chrysothryx, *Nature*, 174, 520.
- Droop M. R., 1955a. A pelagic marine diatom requiring cobalamin, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 34, 229-231.
- Droop M. R., 1955b. Some new supra littoral prostrata, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 34, 233-245.
- Droop M. R., 1955c. A suggested for the assay of vitamin B<sub>12</sub> in the sea water, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 34, 435-440.
- Droop M. R., 1957. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology, *Nature*, 180, 1041-1042.
- Droop M. R., 1961. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology: the response of *Monochrysis lutheri*, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 41, 69-76.
- Droop M. R., 1966. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. III. An experiment with a chemostat, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 46, 659-671.
- Droop M. R., 1967. A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotic, *Br. Phycol. Bull.*, 3, 295-297.
- Droop M. R., 1968. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochrysis lutheri*, *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 48, 689-733.
- Droop M. R., 1970. Vitamin B<sub>12</sub> and marine ecology. V. Continuous culture as an approach to nutritional kinetics, *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, 20, 629-636.
- Fiala M., 1980. Vitamine B<sub>12</sub> et phytoplancton dans diverses régions marines, *Thèse Doct. État, Univ. P.-et-M.-Curie*, 132 p.
- Fiala M., Cabet G., Jacques G., Neveux J., Panouse M., 1976. Fertilisation de communautés phytoplanctoniques. I. Cas d'un milieu oligotrophe : Méditerranée nord-occidentale, *J. Exp. Mar. Biol. Écol.*, 24, 151-163.
- Finney D. J., 1952. Symmetrical designs for parallel line assays, in: *Statistical method in biological assay*, edited by C. Griffin and Co, London, 139-157.
- Guillard R. R. L., 1963. Organic sources of nitrogen for marine centric diatoms, in: *Marine microbiology*, edited by C. H. Oppenheimer, Thomas C. C. Publ. Springfield, 93-104.
- Guillard R. R. L., 1968. B<sub>12</sub> specificity of marine centric diatoms, *J. Phycol.*, 4, 59-64.
- Guillard R. R. L., Ryther J. H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve), *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-239.
- Guillard R. R. L., Cassie V., 1963. Minimum cyanocobalamin requirements of some marine centric diatoms, *Limnol. Oceanogr.*, 8, 161-165.
- Hasle G. R., 1965. *Nitzschia* and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudonitzschia*, *Skr. Nor. Vidensk.-Akad., Mat.-Naturv. Kl.*, 18, 1-45, 1-17.
- Inoue A., Koyama H., Asawaka S., 1973. Vitamin B<sub>12</sub> contents in sea water along the coast of Fukuyama in 1970 and 1971, *J. Fac. Fish. Anim. Husb., Hiroshima Univ.*, 12, 13-20.
- Jacques G., 1969. Aspects quantitatifs du phytoplancton de Banyuls-sur-Mer (Golfe du Lion). III. Diatomées et dinoflagellés de juin 1965 à juin 1968, *Vie Milieu*, 20, 91-126.
- Jacques G., 1970. Aspects quantitatifs du phytoplancton de Banyuls-sur-Mer (Golfe du Lion). IV. Biomasse et production, 1965-1969, *Vie Milieu*, 31, 37-102.
- Jacques G., 1974. La thermocline dans l'écologie du phytoplancton, *Oceanis*, 1, 1-76.
- Jacques G., Cabet G., Fiala M., Panouse M., 1973. Enrichissement de communautés phytoplanctoniques néritiques de Méditerranée nord-occidentale, *J. Exp. Mar. Biol. Écol.*, 11, 287-295.
- Kashiwada K., Kakimoto D., Morita T., Kanazawa A., Kawagoe K., 1957a. Studies on vitamin B<sub>12</sub> in sea water. II. On the assay method and the distribution of this vitamin B<sub>12</sub> in the ocean, *Bull. Jpn Sci. Fish.*, 22, 637-640.
- Kashiwada K., Kakimoto D., Kawagoe K., 1957b. Studies on vitamin B<sub>12</sub> in sea water. III. On the diurnal fluctuation on vitamin B<sub>12</sub> in the sea and its vertical distribution in the lake, *Bull. Jpn Sci. Fish.*, 23, 450-453.
- Lison L., 1968. *Statistique appliquée à la biologie expérimentale*, Gauthier-Villars, Paris, 346 p.
- Lwoff A., Dusi H., 1937a. La pyrimidine et le thiazol, facteurs de croissance pour le flagellé *Polytoma coeca*, *C.R. Acad. Sci., Paris*, 205, 630.
- Lwoff A., Dusi H., 1937b. Le thiazol, facteur de croissance pour les flagellés *Polytoma caudatum* et *Chilomonas paramecium*, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 205, 756.
- Lwoff A., Dusi H., 1937c. Le thiazol, facteur de croissance pour le flagellé *Polytoma ocellatum*, *C. R. Acad. Sci., Paris*, 205, 882.
- Martin J. L. Y., Vacelet E., 1975. Le rôle des vitamines dans les relations bactéries-plancton en eau de mer littorale et dans les flaques supra-littorales. III. Relations entre la quantité de vitamine B<sub>12</sub> et les peuplements qui en font la synthèse, *Cah. Biol. Mar.*, 16, 511-519.
- Menzel D. W., Spaeth J. P., 1962. Occurrence of vitamin B<sub>12</sub> in the Sargasso Sea, *Limnol. Oceanogr.*, 7, 151-154.
- Natarajan K. V., 1967. Distribution and significance of vitamin B<sub>12</sub> and thiamine in the subarctic Pacific Ocean, *Limnol. Oceanogr.*, 15, 655-657.
- Niskijima T., Hata Y., 1979. Seasonal variation in the concentration of dissolved vitamin B<sub>12</sub>, thiamine and biotin in Susaki Harbor and Nomi Inlet, *Rep. USA Mar. Biol. Inst.*, 1, 1-8.
- Ohwada K., Taga N., 1972. Distribution and seasonal variation of vitamin B<sub>12</sub>, thiamine and biotin in the sea, *Mar. Chem.*, 1, 61-73.
- Propp L. N., 1970. Seasonal dynamics of vitamin B<sub>12</sub> and variability of phytoplankton in Dal'niye Zelentsy inlet of Barents Sea, *Oceanology*, 10, 676-681.
- Provasoli L., Carlucci A. F., 1974. Vitamins and growth regulation, in: *Algal physiology and biochemistry*, edited by W. D. P. Stewart, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 741-787.
- Provasoli L., McLaughlin J. J. A., Droop M. R., 1957. The development of artificial media for marine algae, *Arch. Mikrobiol.*, 25, 392-428.
- Souprounov A., Muravskaja Z. A., 1964. Teneur en vitamine B<sub>12</sub> de l'eau de la Baie de Sébastopol et son importance écologique, *Tr. Sevastop. Biol. Stn.*, 17, 342-345 (en russe).
- Souprounov A., Benijitsky A., Bougaeva L., 1966. Quelques données sur la teneur en vitamine B<sub>12</sub> et sa distribution dans les mers du bassin méditerranéen, *XX<sup>e</sup> Congrès CIESM (17-22 octobre 1966)*, Bucarest (résumé communication).
- Strickland J. D. H., Parsons T. R., 1968. A practical handbook of seawater analysis, *Bull. Fish. Res. Board Can.*, 167, 311 p.
- Swift D. G., 1973. Vitamin B<sub>12</sub> as an ecological factor for centric diatoms in the Gulf of Maine, *Ph. D. Thesis, The Johns Hopkins Univ. Baltimore, Md.*, 182.
- Swift D. G., Guillard R. R. L., 1977. Diatoms as tools for assay of total B<sub>12</sub> activity and cyanocobalamin activity in seawater, *J. Mar. Res.*, 35, 309-320.
- Swift D. G., Guillard R. R. L., 1978. Unexpected response to vitamin B<sub>12</sub> of dominant centric diatoms from the spring bloom in the Gulf of Maine (North-East Atlantic Ocean), *J. Phycol.*, 14, 377-386.
- Vishniac H. S., Riley G. A., 1961. Cobalamin and thiamine in Long Island Sound: patterns of distribution and ecological significance, *Limnol. Oceanogr.*, 6, 36-41.