

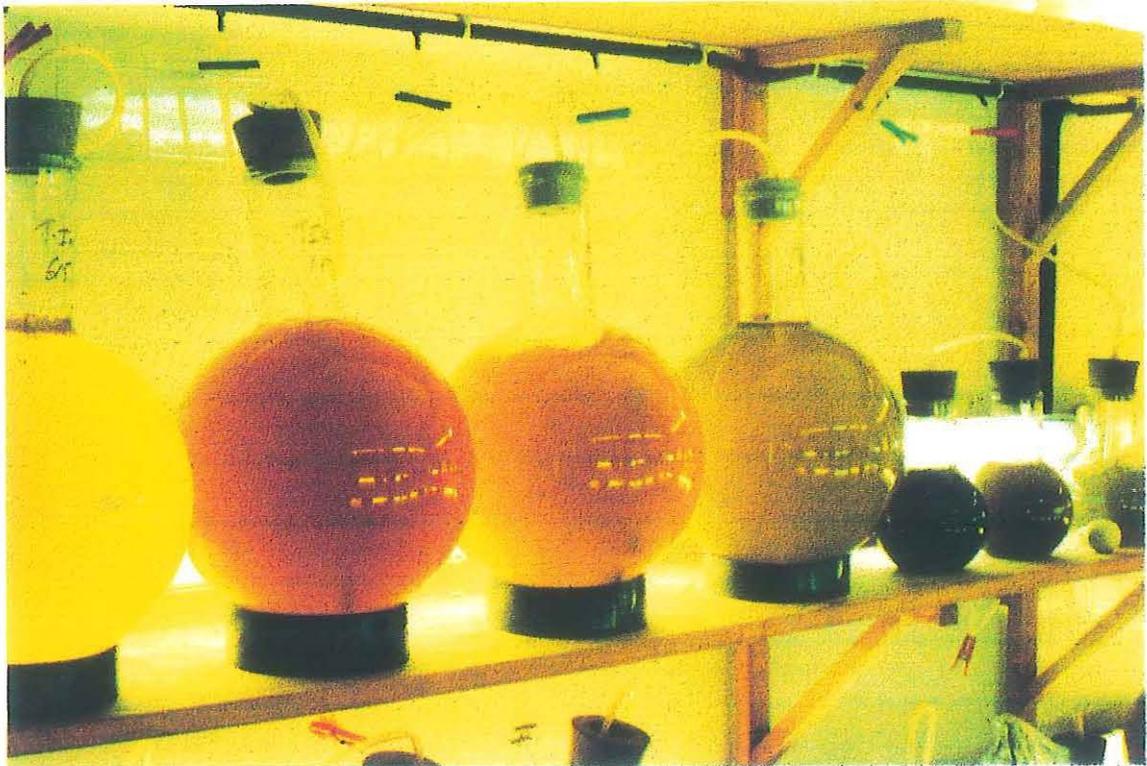
La Rochelle

Rapport de Stage

Détermination des sels nutritifs limitant la
production primaire dans les bassins conchylicoles
du Pertuis Breton et de Marennes-Oléron

par

Sylvie BROSSARD



Réalisé à IFREMER (UREA)
Mus de loup
17390 La Tremblade

Juin 1994

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION.....	1
I. L'INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER.....	2
1. Historique.....	2
2. Présentation générale.....	2
3. La station de la Tremblade.....	2
4. U.R.E.A.....	3
II. PRESENTATION DU SUJET.....	3
III. PRESENTATION DES SITES ETUDIES.....	5
1. Le bassin de Marennes-Oléron.....	5
- Situation.....	5
- Cultures.....	5
2. Le Pertuis Breton.....	7
- Situation.....	7
- Cultures.....	7
IV. PREMIERE EXPERIMENTATION.....	8
1. Matériel et méthodes.....	8
1.1. Echantillonnage.....	8
- Définition des stations.....	8
- Pertuis Breton.....	8
- Marennes-Oléron.....	8
1.2. Protocole expérimental.....	9
- Méthodes d'analyses et dosages.....	10
a. Paramètres physiques.....	10
b. Dosages des sels nutritifs.....	10
c. La chlorophylle et les phéopigments.....	10
d. Le carbone et l'azote particulaire.....	12
- Protocole.....	12
- Principe.....	12
réduction.....	12
séparation des gaz.....	13
mesures et calculs.....	13
e. Taille des particules.....	13
- Principe.....	13
f. Comptage cellulaire et systématique phytoplanctonique.....	13
2 Résultats.....	13
2.1. Teneurs initiales en sels nutritifs.....	13
2.2. Impact de la période de mise en équilibre thermique.....	14
2.3. Evolution des sels nutritifs.....	14
A. Pertuis Breton.....	18
a. Azote.....	18
b. Phosphore.....	18
c. Silicium.....	20

B. Marennes Oléron.....	20
a. Azote.....	20
b. Phosphore.....	22
c. Silicium.....	22
2.4. Chlorophylle.....	22
A. Pertuis Breton.....	22
B. Marennes Oléron.....	24
2.5. Carbone et azote particuliers.....	24
A. Pertuis Breton.....	24
B. Marennes Oléron.....	25
2.6. Analyse des tailles de particules.....	25
A. Pertuis Breton.....	25
B. Marennes Oléron.....	29
3. Critiques du premier protocole.....	31
V SECONDE EXPERIMENTATION.....	33
1. Matériel et méthodes.....	33
1.1. Echantillonnage.....	33
1.2. Second protocole expérimental.....	33
- In situ.....	33
- Au laboratoire.....	33
a. Culture de la flore naturelle.....	33
b. Culture monospécifique de la diatomée <i>Skeletonema costatum</i>	33
c. Analyses.....	34
2 Résultats.....	34
2.1. Evolution des sels nutritifs.....	34
A. Pertuis Breton.....	34
* Station C.....	34
a. Azote.....	34
b. Phosphore.....	36
c. Silicium.....	36
* Station D.....	36
a. Azote.....	36
b. Phosphore.....	36
c. Silicium.....	36
B. Marennes Oléron.....	38
a. Azote.....	38
b. Phosphore.....	38
c. Silicium.....	38
2.2. Chlorophylle.....	38
A. Pertuis Breton.....	38
* Station C.....	28
* Station D.....	41
B. Marennes Oléron.....	41
2.3. Carbone et azote particuliers.....	41
A. Pertuis Breton.....	41
* Station C.....	41
* Station D.....	43
B. Marennes Oléron.....	43

2.4. Analyse des tailles de particules.....	43
A. Pertuis Breton.....	43
* Station C.....	43
* Station D	43
B. Marennes Oléron.....	48
2.5. Culture de Skeletonema costatum.....	48
A. Pertuis Breton.....	48
* Station C.....	48
* Station D.....	51
B. Marennes Oléron.....	51
VI. DISCUSSION.....	54
1. Evolution des protocoles.....	54
2. Evolutions des sels nutritifs.....	54
3. Paramètres estimateurs de la biomasse.....	55
4. Effets des mélanges enrichissants.....	55
A. Pertuis Breton.....	55
B. Marennes Oléron.....	57
VII CONCLUSIONS.....	59
BIBLIOGRAPHIE.....	61
ANNEXES	

INTRODUCTION

La station IFREMER de La Tremblade m'a accueilli dans son laboratoire de l'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles (U.R.E.A.) du 18 avril 1994 au 24 juin 1994.

J'ai pu, au cours de ces 10 semaines, prendre part à un programme de recherche sur la modélisation d'un bassin conchylicole faisant l'objet d'une thèse portant sur l'écologie mytilicole du Pertruis Breton. J'ai donc pu participer, dans le cadre de ces travaux, à la détermination de la nature de l'élément nutritif limitant la production primaire de phytoplancton dans le Pertuis Breton et dans le bassin de Marennes-Oléron.

La première semaine a été consacrée à l'étude bibliographique du sujet et à l'élaboration d'un protocole expérimental.

Les semaines suivantes, ont eu lieu les prélèvements en mer, la mise en oeuvre de l'expérimentation, le suivi quotidien et les dosages chimiques.

Enfin, le traitement informatique des résultats a été effectué à la fin de la manipulation.

La même expérimentation a été mise en oeuvre, un mois plus tard, suivant les mêmes étapes.

I. L'INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

1. Historique

Un laboratoire de recherche existe à La Tremblade depuis 1913, il dépendait alors de l'Association d'Encouragement des Industries Ostréicoles (A.E.I.O.). A partir de 1918, le contrôle sanitaire des coquillages et tous les travaux de recherche liés aux ressources vivantes sont effectués par l'Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (O.S.T.P.M.) qui remplace alors l'A.E.I.O.. L'O.S.T.P.M. change d'appellation en 1953 et devient alors l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (I.S.T.P.M.).

Cet institut, après fusion avec le Centre National pour l'Exploitation des Océans (C.N.E.X.O.), en 1984, devient l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (I.F.R.E.M.E.R.).

2. Présentation générale

L'IFREMER dépend du Ministère de la Recherche et du Ministère chargé de la Mer. Il s'agit d'un institut public à caractère industriel et commercial.

Son organisation est décentralisée : le siège social à Paris et 5 centres, 15 stations rattachées, 5 délégations Outre-Mer. (Annexe I)

3. La Station de La Tremblade

Située en Charente-Maritime, au coeur du bassin de Marennes-Oléron, elle est rattachée au centre de Nantes. Elle présente 2 services :

- Le Département Environnement Littoral (DEL),
- Le Département Ressources Aquacoles qui se compose lui-même des unités :
 - * L'Unité de Recherche en Pathologie et Immunologie Générales (URPIG),
 - * L'Unité de Recherche en Génétique et Eclosion (URGE),
 - * L'Unité de Recherche Régionale Aquacole (URRA),
 - * L'Unité de Recherche en Ecosystèmes Aquacoles (UREA).

4. L'UREA

L'Unité de Recherche des Ecosystèmes Aquacoles basée à La Tremblade est un laboratoire national. Ce dernier est responsable au niveau national de la filière "huîtres" et est également chargé de l'étude:

- _ des techniques d'évaluation des stocks,
- _ du modèle de gestion du bassin,
- _ du bilan énergétique des mollusques cultivés et de leurs compétiteurs,
- _ des modèles analytiques des relations trophiques.

II. PRESENTATION DU SUJET

Le Pertuis Breton est actuellement le bassin de production mytilicole le plus important de la façade atlantique. Tous les sites exploitables sur estran sont actuellement occupés par des cultures de moules sur bouchot et d'huîtres sur tables au nord de l'île de Ré.

L'implantation de cultures supplémentaires nécessite la conquête de nouveaux espaces moins abrités, à l'aide de structures adaptées. La culture de moules sur filières a donc été mise en place en 1991 avec 240 filières de 100 m réparties sur 400 hectares

Afin de s'assurer que cette augmentation du stock de moules cultivées n'entre pas en compétition trophique avec les autres cultures préexistantes et pour optimiser la production du bassin, il est nécessaire d'étudier la capacité trophique du bassin. Il sera alors possible d'estimer la biomasse maximale de mollusques pouvant être cultivée dans le Pertuis Breton, tout en conservant un bon rendement en croissance. Cette étude nécessite, entre autre, la détermination du ou des éléments nutritifs limitant la production primaire du bassin, afin d'établir un modèle mathématique traduisant les interactions écologiques au sein de l'écosystème du Pertuis Breton, basé sur le cycle de ce ou ces éléments nutritifs.

Dans la plupart des cas, la simple mesure des teneurs en sels minéraux ou celle des substances organiques présentes dans le milieu ne permettent pas de déterminer le facteur limitant principal de la croissance du phytoplancton (Fiala et al., 1976). C'est pourquoi, cette recherche s'effectue selon une méthode biologique fondée sur des enrichissements différentiels en sels nutritifs qui permet de définir l'ordre d'importance des facteurs qui limitent la productivité phytoplanctonique. D'autre part, seuls les effets de l'azote, du phosphore et du silicate sont étudiés, en effet, ces trois éléments sont responsables de la limitation de la croissance phytoplanctonique dans la plupart des sites étudiés (tableau 1). La détermination de l'élément nutritif limitant la production primaire dans le bassin de Marennes-Oléron est également effectuée, à titre de comparaison.

SITE ETUDIE	FACTEURS LIMITANTS	SOURCE (1)
Mer Baltique	1.N	GRANELI et GRANELI, 1983
Eaux côtières nord patagoniques	1.N	CHARPY-ROUBAUD, 1982
Bayou Texas (U.S.A.)	1.N	HANNAH et al., 1973
Eaux côtières de Géorgie (U.S.A.)	1.N	BISHOP et al., 1984
Clares ostréicoles de Marennes-Oléron	1.N	ROBERT, 1962
Mer du Nord	1.N	SAKSHAUG et al., 1983
More Coast - Trondheimsfjord	1.N ou P	SAKSHAUG et al., 1983
Fjords norvégiens saumâtres (S 25 ‰)	1.P	SAKSHAUG et al., 1983
Fjord d'Oslo	1.P ou N	GRAY et PAASCHE, 1984
Baie de New-York	1.N	YENTSCH, 1977
Baie de New-York	1.N (été) 1.Si (printemps)	GARSDALE, 1981
Georges River (Australie)	pas de réelle hiérarchie, malgré N/P faibles	HEATH et al., 1980
Manche	1.P	DAVIES et SLEEP, 1981
Estuaire du Golfe du Mexique	1.P	MYERS et IVERSON, 1982
Baie d'Alger	1.P, 2.Fe-Si, 3.N (mars à octobre) 1.N, 2.P-Si, 3. P-Si-Vit. (novembre à avril)	GAUMER, 1981
Méditerranée	1.P, 2.N	BERLAND et al., 1980
Golfe du Lion	1.N ou P	FIALA et al., 1976
Océan Pacifique (est, zones tropicales)	1. Si	THOMAS et DODSON, 1975
Océan Indien	1.Fe	TRANter et NEWELL, 1967
Rade de Brest	Surface : 1.Si, 2.N ou P Fond : 1.Si-N, 2.P	HAFSAOUI, 1984
Manche Occidentale	1.Si	MARTIN-JEZEQUEL, 1981
Estuaire du Potomac	1.P	JAWORSKI, 1981
Moriches Bay, South Bay,	1.N	RYTHER, 1954
Long Island, New-York		
Potomac estuary	1.N	JAWORSKI, 1972
Clares à huîtres Vendée	1.N	
Upwelling de Labofrio (Brésil)	1.N	GONZALEZ-RODRIGUEZ et al.

Tab 1:Facteurs limitants la production primaire dans le monde

L'évolution, qualitative et quantitative, d'espèces phytoplanctoniques naturelles, cultivées dans de l'eau enrichie en différents éléments nutritifs a été contrôlée régulièrement pendant 10 jours à l'aide de différentes techniques. Un compteur de particules (Multisizer Coulter) a permis de suivre l'évolution des classes de taille au cours du temps. Les dosages du carbone (C), de l'azote (N), qui donnent des indications sur l'évolution de la biomasse bactérienne et permettent de qualifier l'état physiologique des populations par l'estimation du rapport C/N, ont été réalisés sur un appareil de dosage CHNS0 Analyser Perkin Elmer. L'évolution des sels nutritifs a été contrôlée régulièrement par des dosages sur une chaîne d'analyse automatique, de type SKALAR. Le développement des cultures phytoplanctoniques a été suivi quotidiennement par une lecture directe sur fluorimètre (Turner). Ces valeurs sont étalonnées par de fréquents dosages de chlorophylle. Enfin, l'identification des principales espèces phytoplanctoniques a été réalisée par une lecture et un comptage sur microscope inversé (Olympus).

III. PRESENTATION DES SITES ETUDIÉS

1. Le bassin de Marennes-Oléron

- *Situation*

Le bassin de Marennes-Oléron d'une superficie de 15 000 ha est limité au nord par l'estuaire de la Charente et le Pertuis d'Antioche, au sud par le Pertuis de Maumusson, à l'est par le continent et à l'ouest par l'île d'Oléron (fig. 1). Le bassin est protégé des vents du large et de la houle océanique par l'île d'Oléron. La Charente, la Seudre et la Gironde adoucissent l'eau du bassin par des apports fluviaux riches en nutriments.

- *Cultures*

Dans le bassin de Marennes-Oléron, où 3 200 hectares du bassin sont consacrés à la conchyliculture, l'huître japonaise (*Crassostrea gigas*) est élevée depuis 1967, elle a alors remplacé l'huître portugaise (*Crassostrea angulata*) décimée par une épizootie dans les années 70.

Les huîtres sont cultivées selon 2 techniques :

- La culture à plat : les huîtres sont épanchées directement sur le sol à raison de 300 à 400 kg/are,
- La culture en surélevé : les huîtres sont cultivées dans des poches à une hauteur de 50 cm, à raison de 9 à 11 kg/poche, disposées sur des tables.

Après l'élevage qui dure de deux à quatre ans, les huîtres peuvent être affinées en claires dans lesquelles se développe une algue microscopique (*Haslea ostrearia*) diffusant

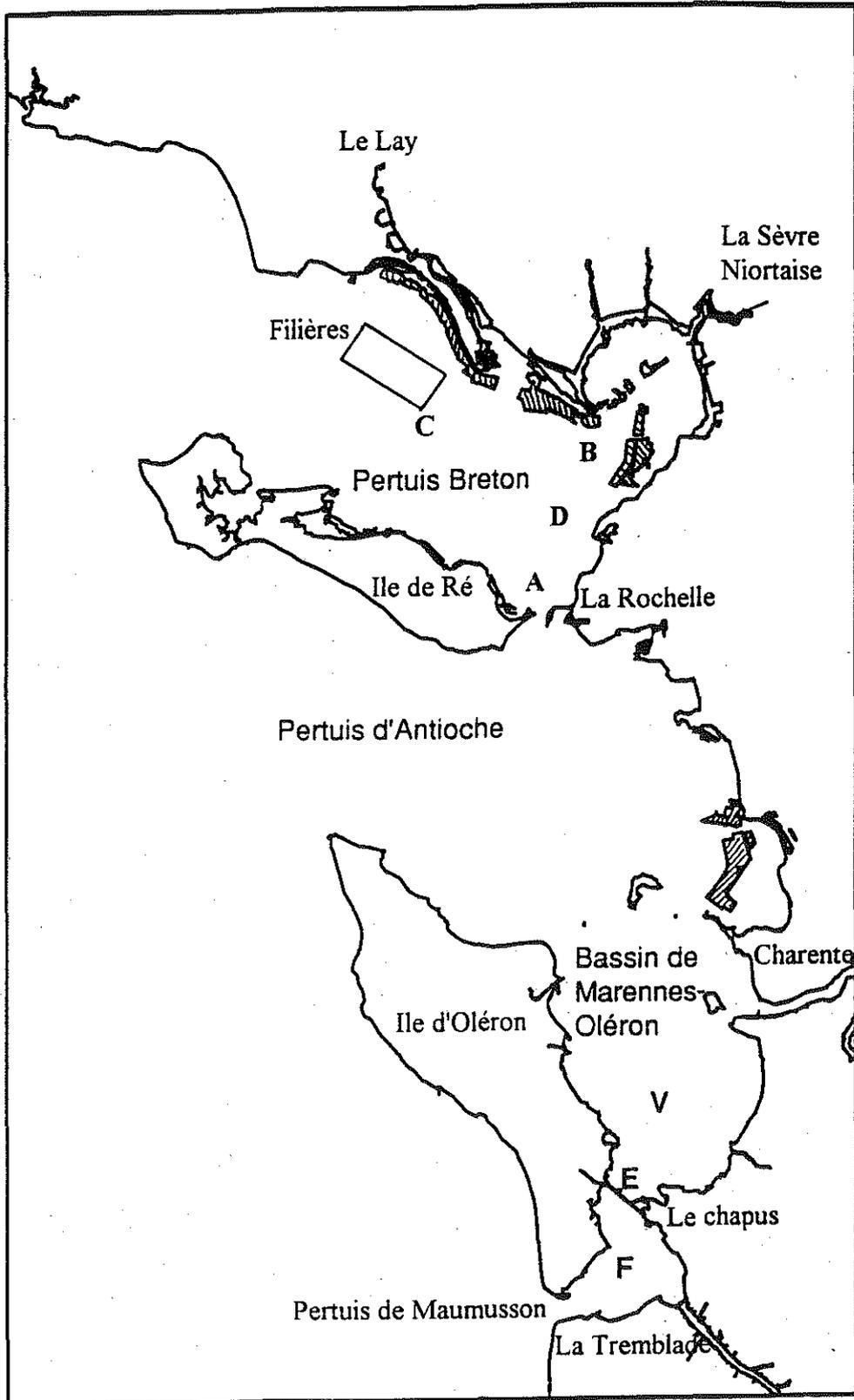


Fig. 1: Présentation du site et localisation des stations de prélèvement (les cultures de moules sur bouchot sont représentées en hachuré).

à sa mort son pigment bleu-verdâtre. L'huître, en l'absorbant, prend une coloration verte, caractéristique des huîtres de Marennes-Oléron.

2. Le Pertuis Breton

- Situation

C'est un milieu estuarien d'environ 350 km², limité au sud par l'île de Ré et au nord par la côte vendéenne, alimenté en eau douce par la Sèvre Niortaise et le Lay.

- Cultures

L'élevage traditionnel est celui des moules de bouchot *Mytilus edulis*, qui existe dans la baie de l'Aiguillon depuis le XIII^{ème} siècle. Les bouchots sont des rangées de pieux de pin ou de chêne sur lesquels les moules grossissent. Les moules peuvent se fixer directement ou être récoltées ailleurs sur des cordes (filières) puis transplantées sur les pieux. La culture de ces moules sur des filières permet d'exploiter de nouveaux espaces moins abrités, en pleine mer. On utilise des filières subflottantes : la filière est maintenue sous la surface de l'eau à l'aide de flotteurs élancés.

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

IV. PREMIERE EXPERIMENTATION

1. Matériels et méthodes

1.1. Echantillonnage

- Définition des stations

Tous les enrichissements sont réalisés avec l'eau d'une seule station, pour chacun des deux bassins ; toutefois, pour s'assurer que l'échantillon sera assez représentatif du bassin, des prélèvements en trois points dans chaque bassin sont effectués à trois profondeurs, le long de la colonne d'eau : surface (- 1 m), milieu, profondeur (1 m du fond).

Les stations sont choisies selon leur hydrobiologie (fig. 1) :

- Pertuis Breton

- Station A :

Située près du pont de l'île de Ré, elle permet d'étudier la sortie des eaux du Pertuis Breton vers le Pertuis d'Antioche.

- Station B :

A proximité de la pointe de l'Aiguillon, elle a été choisie pour suivre l'influence de la Sèvre Niortaise sur l'écosystème.

- Station C :

Elle se trouve au milieu des cultures de moules sur filières. C'est cette eau qui sera enrichie.

- Marennes-Oléron

- La Mortanne (V) :

Située au nord du pont de l'île d'Oléron, elle reçoit les eaux légèrement plus turbides de la Charente.

- Le Chapus (E) :

Point central du bassin de Marennes-Oléron, cette station se trouve dans la zone où le balancement des marées est le plus remarquable,

- "Trompe-sot" (F) :

Au sud du bassin, cette station peut être influencée par les eaux océaniques provenant de la pointe de Maumusson.

L'échantillonnage dans le Pertuis Breton a eu lieu le 27 avril 1994 lors d'une marée de coefficient 112. L'échantillonnage dans le bassin de Marennes-Oléron a eu lieu le 28 avril 1994, le coefficient de marée était de 105.

1.2. Protocole expérimental

- L'eau est prélevée à l'aide d'une bouteille à renversement en PVC de 2,5 l. Elle est aussitôt filtrée sur un tamis de 200 µm de vide de maille pour éliminer le zooplancton herbivore qui pourrait modifier la composition en phytoplancton de l'échantillon par broutage. La température et la salinité sont immédiatement mesurées avec une sonde électronique ; un premier échantillon est prélevé à bord pour déterminer les conditions initiales. L'eau est ensuite conservée à l'obscurité en recouvrant les bidons d'un sac noir, pour éviter la photosynthèse.

- Au laboratoire, l'eau de chaque station est répartie de façon homogène dans six ballons de 2 l et à température (17°C) et luminosité constante pendant 24 h de mise en équilibre thermique.

- Enrichissements : Cinq enrichissements plus un témoin sont réalisés. Les diverses combinaisons d'enrichissements sont : N (Azote), P (Phosphore), Si (Silicates), N + P, N + P + Si.

Le rapport de Redfield est de N/P = 15 pour du phytoplancton vivant (Bougis, 1976), cependant la plupart des auteurs ayant procédé à des enrichissements artificiels utilisent un rapport N/Si/P de 10/10/1 (Robert et al., 1982 ; Fiala et al., 1976 ; Gonzalez-Rodriguez et al., 1985). D'autre part, la concentration maximale en nitrates observée dans le Pertuis Breton est de l'ordre de 80 µmoles.l⁻¹ (Barillé A.L., com. pers.), l'enrichissement doit donc être de cet ordre de grandeur.

Elément	Formule chimique	Concentration produit (mg/l)		Concentration élément (µg.at.l ⁻¹² ou µM.l ⁻¹)	
		PB	MO	PB	MO
N	NH ₄ N ₀₃	5,27	5,56	127,7	138
P	NaH ₂ P ₀₄ (2H ₂ O)	2,77	2,22	17,7	14,3
Si	Na ₂ Si ₀₃ (SH ₂ O)	33,3	37,2	156,7	175
N + P		5,5 + 2,77	6,5 + 2,94	138,8 + 17,8	162,5 + 18,8
N + P + Si		5,56 + 3,33 + 38,8	3,55 + 2,67 + 32,2	138,8 + 21,3 + 183,4	88,8 + 17,1 + 151,9

Tab 2: Enrichissements réalisés

Le milieu sont alors incubés à 17°C sous éclairage constant (inférieur à l'éclairage d'inhibition), avec un bullage d'air enrichi en CO₂. L'expérience se prolonge 10 jours.

- Méthodes d'analyse et dosages

a) Paramètres physiques

Température et salinité sont quotidiennement relevées à l'aide d'une sonde électronique ; la température est exprimée en degré Celsius et la salinité en g.l⁻¹.

b) Dosage des sels nutritifs

Tous les deux jours, 50 ml d'eau sont filtrés sur filtre Whatman GFC ≈ 2 μm, les filtrats sont conservés au congélateur dans des piluliers en PVC. Les dosages sont effectués dans un délai de 3 semaines par un analyseur automatique SKALAR.

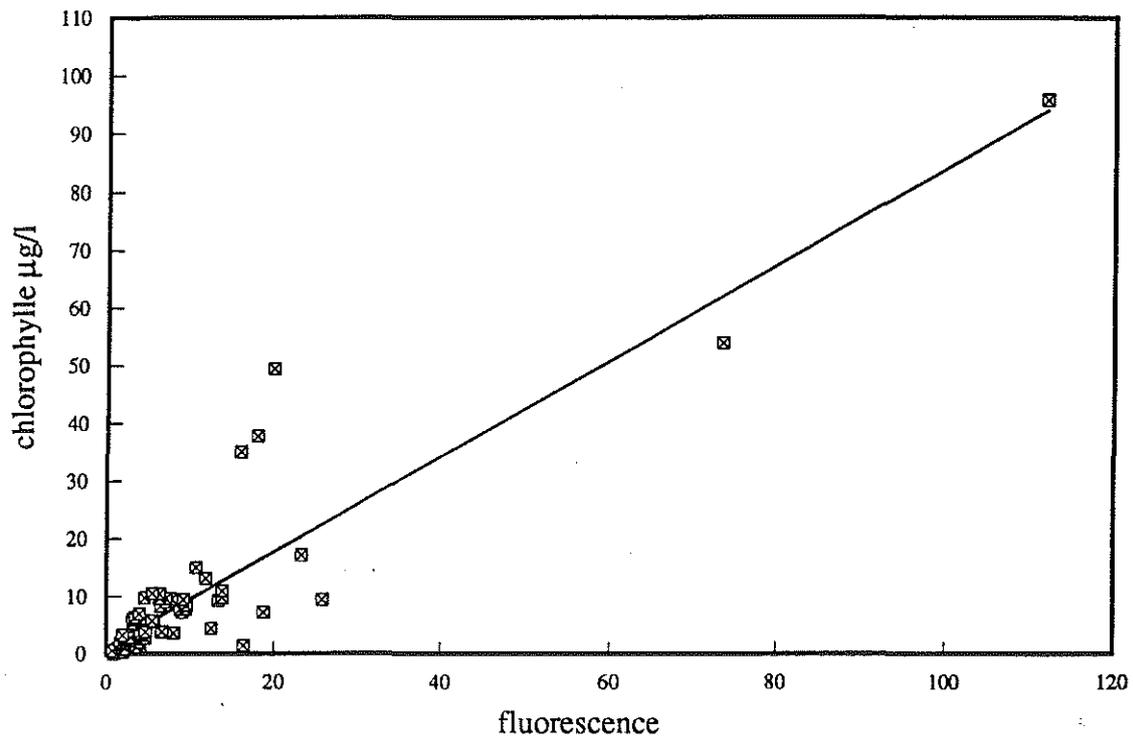
- Phosphates : méthode de Murphy et Rilley, 1962
- Silicate : méthode de Mullin et Rilley, 1955
- Ammonium : méthode de Koroleff, 1969
- Nitrate : méthode de Grasshoff, 1964
- Nitrites : méthode de Bendschneider et Robinson, 1952
- Urée : méthode de Strickland et Parson, 1968
- Azote total : méthode de Collos et Mornet, 1993.

c) La chlorophylle et les phéopigments

Une évaluation quotidienne de la biomasse phytoplanctonique est donnée par la lecture directe de la fluorescence de la chlorophylle a sur un fluorimètre Turner 112, d'après la méthode de Lorenzen. (Annexe II) D'autre part, une courbe étalon, mettant en relation les fluorescences directes et les quantités de chlorophylle, est établie (fig. 2).

Tous les deux jours, des dosages de chlorophylle sont effectués selon la méthode de Yentsch et Menzel (1963), elle repose sur la mesure d'une chute de fluorescence avant et après acidification d'une solution acétonique de chlorophylle a :

- filtration de 50 ml d'eau sur filtre Whatman GF/C,
- stockage des filtres dans des tubes à vis, au congélateur (-18°C) pendant 10 jours maximum,
- broyage des filtres dans les tubes avec 5 ml d'acétone à 90 %,
- extraction pendant 4 heures au réfrigérateur,
- centrifugation pendant 15 mn à 3 000 tours/mn,
- transfert du surnageant dans un tube à hémolyse,



Régression linéaire :

R = 0.90

Degré de liberté = 64

$$\text{Chlorophylle}(\mu\text{g/l}) = 0.8293 \text{ fluorescence} + 1.11587$$

Fig. 2: Corrélation entre les lectures directes de fluorescence et les dosages de chlorophylle a par la méthode de Yentsch et Menzel (1963).

- lecture de la fluorescence (Fa),
- acidification avec 50 µl d'HCl 1N,
- lecture de la fluorescence (Fb).

Le traitement de ces données par étalonnage de l'appareil, permet d'évaluer quantitativement la chlorophylle a présente (cf. annexe III).

d) Le carbone et l'azote particulaires

Le dosage des composants organiques est effectué par le PE 2400 II CHNSO Analyser de Perkin Elmer. Cet appareil peut déterminer les éléments organiques suivants :

- carbone, hydrogène, azote (CHN),
- carbone, hydrogène, azote, soufre (CHNS),
- oxygène (O).

Pour cette expérimentation, seuls le carbone et l'azote sont déterminés.

Protocole

- filtration de 10 à 50 ml d'eau homogénéisée sur filtre Whatman GF/C préalablement calciné à 450°C pour éliminer toute la matière organique du filtre,
- le filtre est maintenu 20 secondes dans les vapeurs d'HCl pur afin d'éliminer les carbonates de l'eau,
- stockage des filtres dans des boîtes de pétri, sur du papier aluminium (pour éviter tout relargage par le plastique) à l'étuve à 60°C,
- emballage des filtres dans une feuille d'étain, l'échantillon doit être le plus compact possible.

Principe

L'analyse comporte quatre grandes étapes : combustion, formation des gaz, purification . L'échantillon est propulsé par un injecteur dans un tube à combustion à une température proche de 1 000°C. Une combustion flash a lieu quand de l'oxygène est mis en présence du milieu réactionnel. Tous les gaz simples (CO₂, H₂O, N₂) issus de cette combustion sont poussés par un gaz vecteur neutre : l'hélium.

Réduction (annexe V)

L'oxygène présent en excès pour ne pas être limitant lors de combustion, est réduit dans la colonne de réduction par du cuivre en oxyde de cuivre (qui devient noir : CuO).

Séparation des gaz (Annexe IV)

Les gaz CO₂, H₂O, N₂ (le N₂O corrosif est réduit en N₂) passent alors dans une colonne de chromatographie en phase gazeuse, véhiculés par l'hélium. Les gaz sont alors séparés et sortent de la colonne par ordre décroissant de densité : N₂, CO₂, H₂O.

Mesures et calculs

Les gaz sont identifiés et dosés par mesure de leur conductivité thermique par un catharomètre. Celui-ci détermine la résistivité de chaque gaz, qui est inversement proportionnelle à la quantité. La chromatographie étant frontale, les gaz sortent par palliers. Les quantités de carbone, hydrogène, azote sont déterminées par différence (annexe).

e) La taille des particules

Les particules en suspension dans l'eau peuvent être comptées par classes de taille par le Multisizer (Coulter) 256 canaux dotée d'un orifice dont le diamètre est de 100 µm. Elle permet la mise en évidence de particules comprises entre 2 et 70 µm. (Annexe VI)

Principe

Le principe du comptage est basé sur la variation de la résistivité entre deux électrodes de platine. Cette résistivité reste constante tant qu'aucune particule ne passe entre les électrodes. La présence d'une particule augmente la résistivité proportionnellement au volume de la particule. La différence de résistivité est traduite en volume par l'appareil qui présente le résultat en diamètre équivalent sphère. Les particules sont alors triées par classes de taille : 256 classes sont définies, de 2 µm à 64 µm suivant une distribution logarithmique .

f) Comptage cellulaire et systématique phytoplanctonique

Le comptage est réalisé selon la méthode Uthermohl : le plancton est fixé avec 7 ml de lugol par litre d'eau et observé au microscope inversé. Les échantillons lugolés sont conservés au réfrigérateur une à deux semaines avant observation.

2. RESULTATS

2.1 Teneurs initiales en sels nutritifs

Les stations A et B du Pertuis Breton et les stations du bassin de Marennes-Oléron semblent avoir des teneurs en nitrates et en ammoniacque relativement proches, mais la station C se distingue par une large déficience en sels minéraux, vis à vis des autres

stations du Pertuis Breton (fig. 3). En comparaison, les stations du bassin de Marennes-Oléron sont relativement homogènes pour les teneurs en sels nutritifs. Enfin, pour une même station, le prélèvement de surface est généralement plus riche en sels nutritifs que les prélèvements de fond ou à mi-hauteur d'eau (excepté pour la station C). Les teneurs des deux bassins sont comprises entre 20 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ et 50 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ pour les nitrates et entre 1,5 et 2,5 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ pour l'ammoniaque. Si l'on excepte les valeurs de la station C, caractéristiques de conditions plus océaniques, les valeurs rencontrées en nitrate et en ammoniaque dans les 2 bassins sont sensiblement les mêmes. En revanche le Pertuis Breton est beaucoup moins riche en silicates (3 - 7 $\mu\text{moles.l}^{-1}$) et en phosphore (0,2 - 0,35 $\mu\text{moles.l}^{-1}$) que le bassin de Marennes-Oléron (10 - 18 $\mu\text{moles Si/l}$) et 0,35 - 0,48 $\mu\text{moles P/l}$).

2.2 Impact de la période de mise en équilibre thermique

L'eau, après répartition dans les ballons, est laissée 36 à 48 heures en équilibre thermique à la lumière (24 h/24 h) et à température constante (18°C). Des prélèvements ont été effectués juste avant enrichissement, permettant de déterminer l'impact de cette période d'adaptation. Les graphes réalisés permettent de visualiser le taux de chlorophylle et la teneur en sels nutritifs avant et après cette mise en équilibre thermique.(fig4).

D'une façon générale, il apparaît nettement qu'une forte quantité de chlorophylle est produite, en particulier dans l'eau de Marennes-Oléron puisque la teneur en chlorophylle passe de 0,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ à 6 $\mu\text{g.l}^{-1}$ dans certains ballons (fig. 4a).

Dans le bassin du Pertuis Breton, cette production est plus hétérogène selon le ballon puisqu'il y a encore 1,75 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de chlorophylle en plus dans la culture P et 0,25 $\mu\text{g.l}^{-1}$ en moins dans la culture N. En moyenne, la concentration en chlorophylle augmente de 0,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$ à 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (fig. 4b).

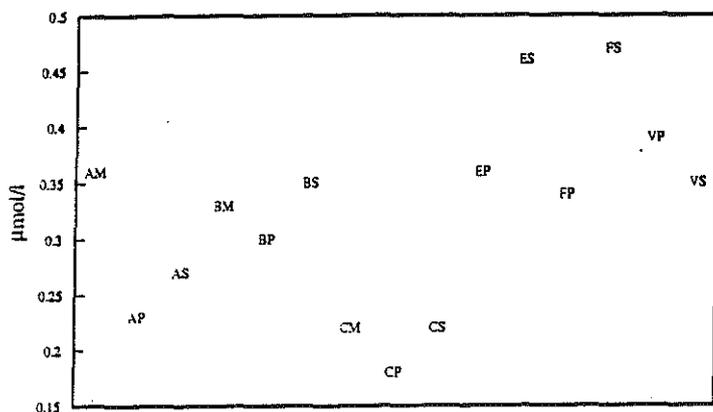
D'autre part, l'évolution des sels nutritifs pendant cette période semble correspondre à cette production. En effet, dans tous les milieux, ils diminuent fortement, traduisant une consommation importante par le phytoplancton. Les variations de concentration sont les plus faibles pour l'azote, tandis que les concentrations en phosphates diminuent des 2/3 pendant cette exposition (fig 5).

2.3 Evolution des sels nutritifs

Tous les échantillons prélevés n'ont pu être analysés, l'appareil n'étant pas disponible.

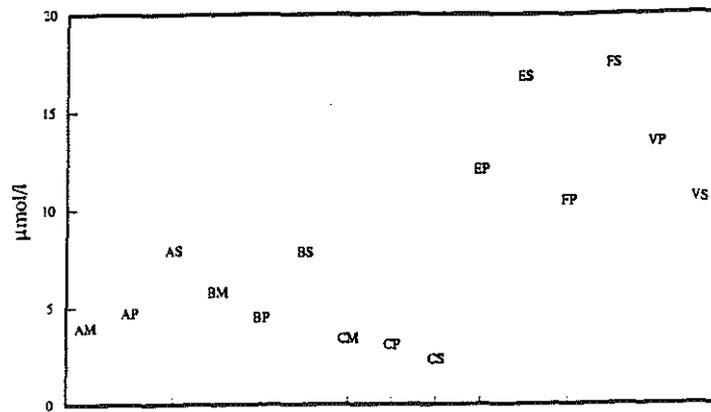
phosphates

initialement



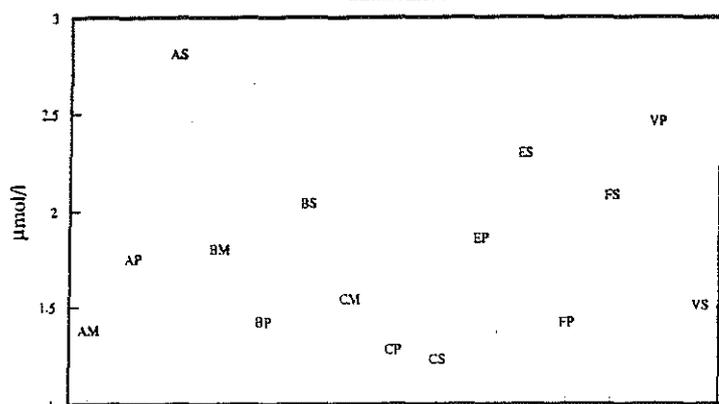
silicates

initialement



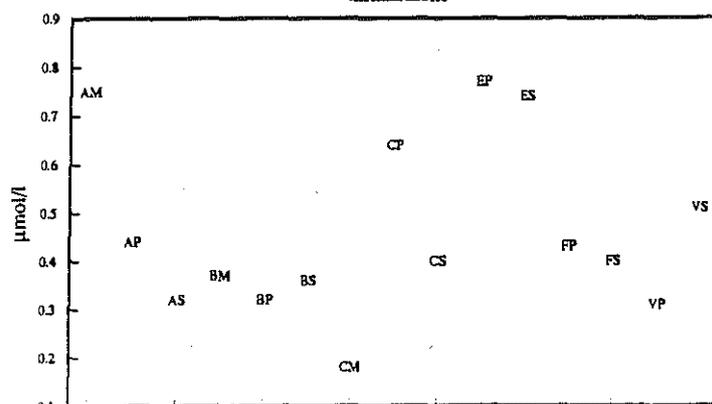
ammoniac

initialement



nitrites

initialement



nitrates

initialement

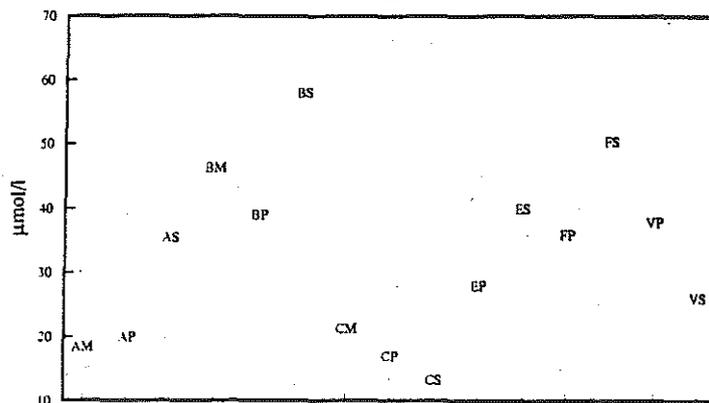
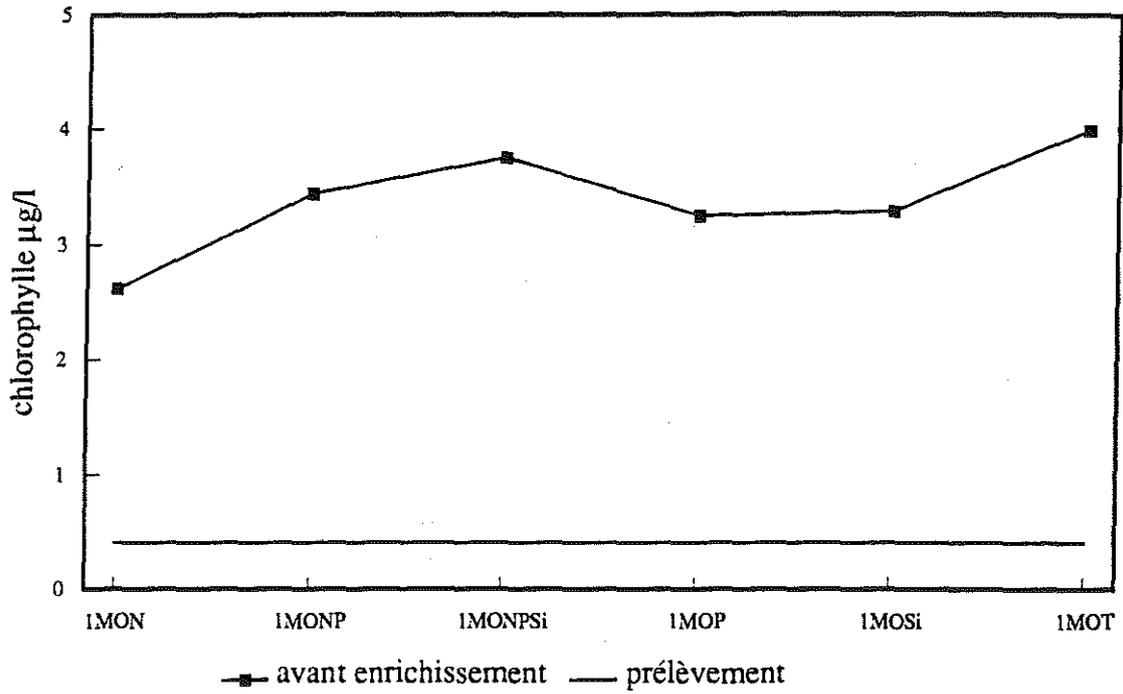


Fig. 3: Concentrations en sels nutritifs des différentes stations échantillonnées dans le Pertuis Breton (A, B, C) et dans le bassin de Marennes-Oléron (E - Chapus, F - "Trompe-sot", V - Mortanne), sur la colonne d'eau (S - surface -1m; M - milieu; P - fond+1m).

Marenes Oléron



Pertuis Breton

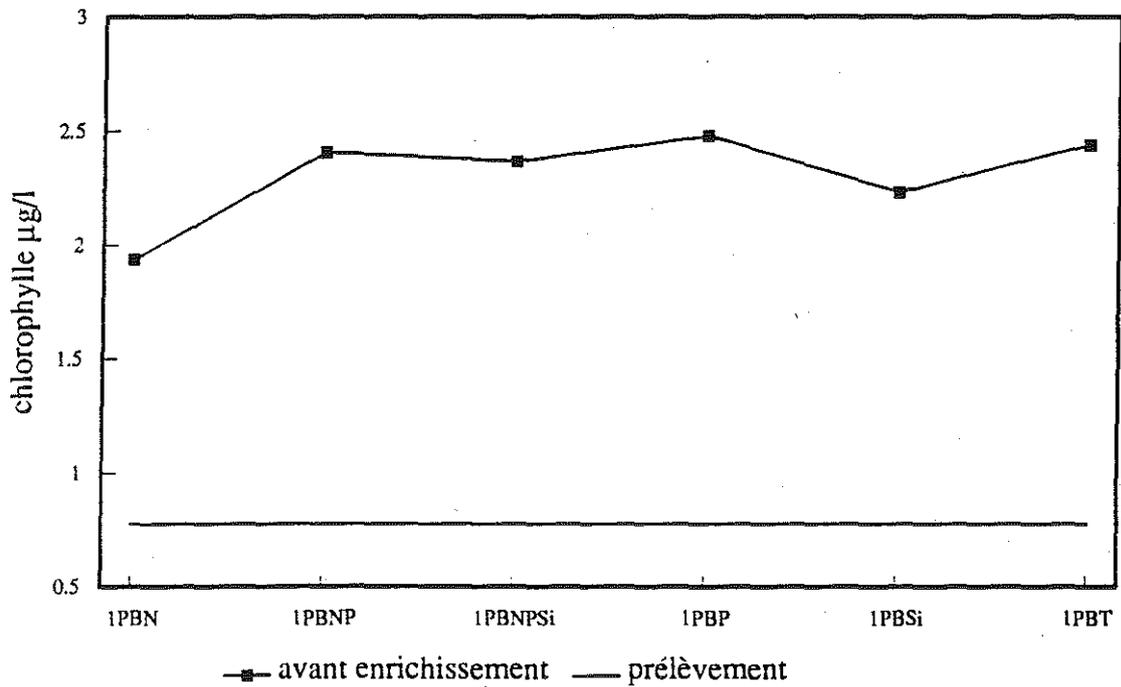


Fig. 4: Concentrations en chlorophylle a des échantillons lors du prélèvement *in situ* et après 36h de mise en équilibre thermique juste avant l'enrichissement.

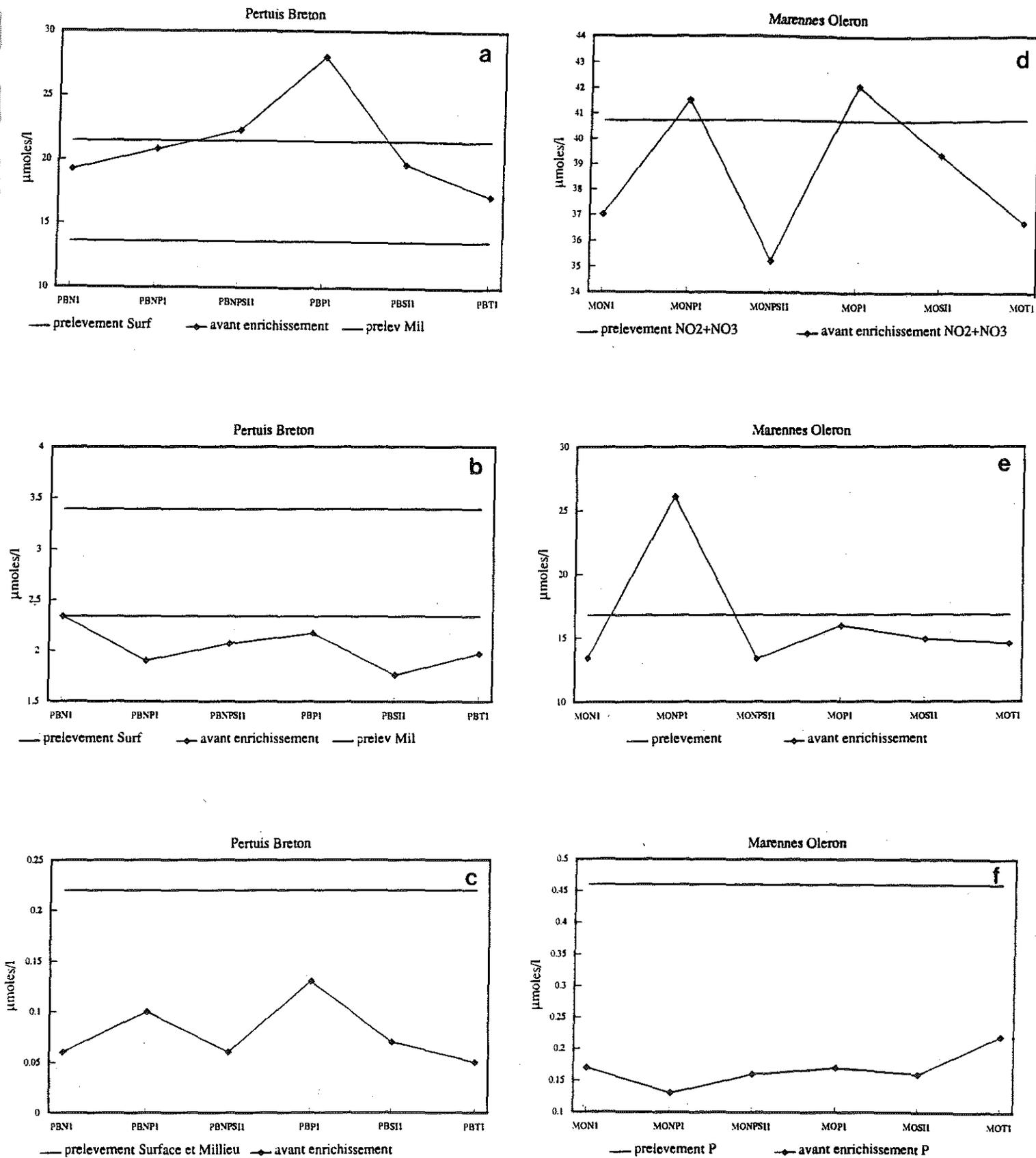


Fig. 5: Concentrations en sels nutritifs des prélèvements in situ et après 36h d'acclimation thermique avant l'enrichissement dans le Pertuis Breton (a, b, c) et à Marennes-Oléron (d, e, f).

A. Pertuis Breton

Les teneurs initiales en sels nutritifs de l'eau destinée aux enrichissements (station C) sont assez élevées sans pour autant atteindre les maximum annuels obtenus en hiver ($80 \mu\text{moles.l}^{-1}$ en N et $0,4 \mu\text{moles.l}^{-1}$ en P) (Barillé, com. pers).

La teneur en azote est proche de $22 \mu\text{moles.l}^{-1}$, celle en phosphore est de $0,2 \mu\text{moles.l}^{-1}$.

En revanche, les silicates sont présents initialement en faible quantité : de l'ordre de $3 \mu\text{moles.l}^{-1}$; le maximum atteint dans le bassin est de $20 \mu\text{moles.l}^{-1}$.

La première valeur correspond à l'enrichissement calculé plus la valeur initiale.

a) Azote (*nitrate + nitrite + ammonium*)

Trois des six milieux étudiés sont enrichis en azote (N, N + P, N + P + Si) (fig 6a) . Après enrichissement, l'évolution de chaque milieu se différencie dès le quatrième jour de culture. En effet, dans la culture enrichie en N + P, la quantité d'azote disponible dans le milieu diminue de façon progressive et une réserve non négligeable d'azote, $100 \mu\text{moles.l}^{-1}$, reste présente après 6 jours de culture. La réserve s'épuise en 16 jours dans la culture N + P. La consommation d'azote est visible mais relativement lente dans la culture N puisque la réserve n'est entamée qu'après 4 jours de croissance. En revanche, la réserve en nitrates et ammonium est rapidement épuisée dans la culture N + P + Si ; en effet, après quatre jours, la quantité d'azote présente est réduite au 1/10ème de sa valeur après enrichissement (de $150 \mu\text{moles.l}^{-1}$ à $15 \mu\text{moles.l}^{-1}$).

Dans les cultures non enrichies en azote, la quantité de ce sel nutritif évolue peu et reste pratiquement constante pendant les 16 jours de la croissance. Toutefois, la culture P, enrichie en phosphore, présente une légère augmentation de la consommation d'azote par rapport au témoin (environ $20 \mu\text{moles.l}^{-1}$ par P et en 6 j).

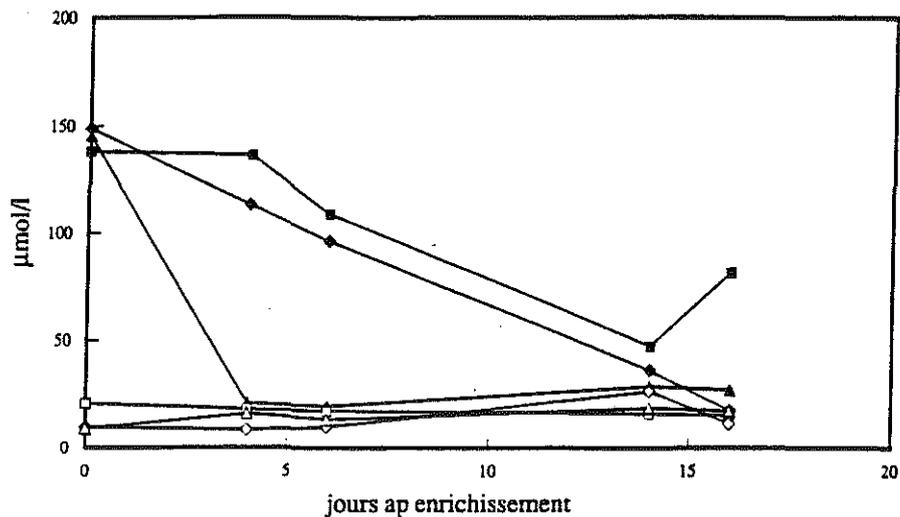
b) Phosphore

L'évolution de la quantité de phosphates dans les cultures enrichies en cet élément est semblable à celle de la quantité d'azote décrite précédemment.(fig.6b)

Le phosphore s'épuise très rapidement en 4 jours dans la culture N + P + Si alors que la diminution est beaucoup plus progressive dans les cultures N + P et P. La culture N + P ne prélève du phosphore qu'à partir du 6ème jour et la concentration finale est encore de $6 \mu\text{moles.l}^{-1}$. Le milieu enrichi en phosphore voit sa teneur augmenter lors des premiers jours de croissance. De même, le milieu N+ P + Si présente à nouveau du phosphore ($5 \mu\text{moles.l}^{-1}$) à partir du 14ème jour. Il y a probablement intervention d'une reminéralisation. Les

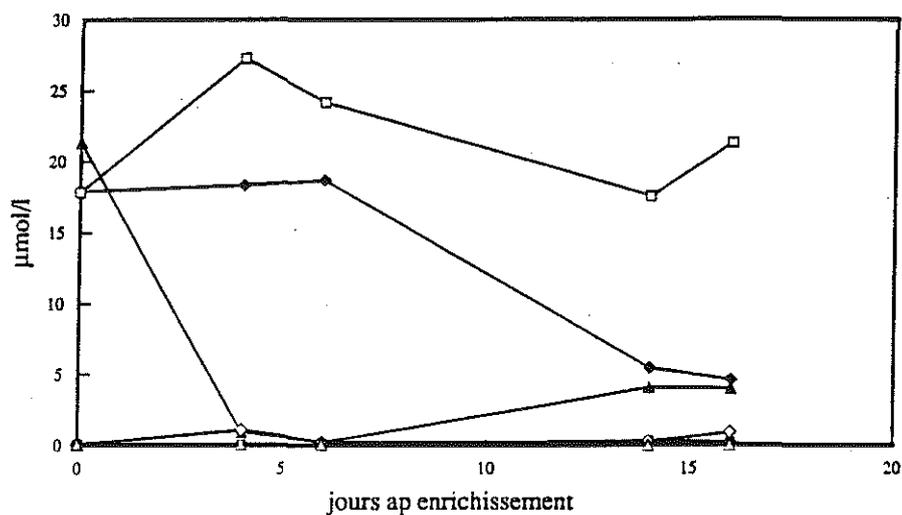
azote

PB



phosphates

PB



silicates

PB

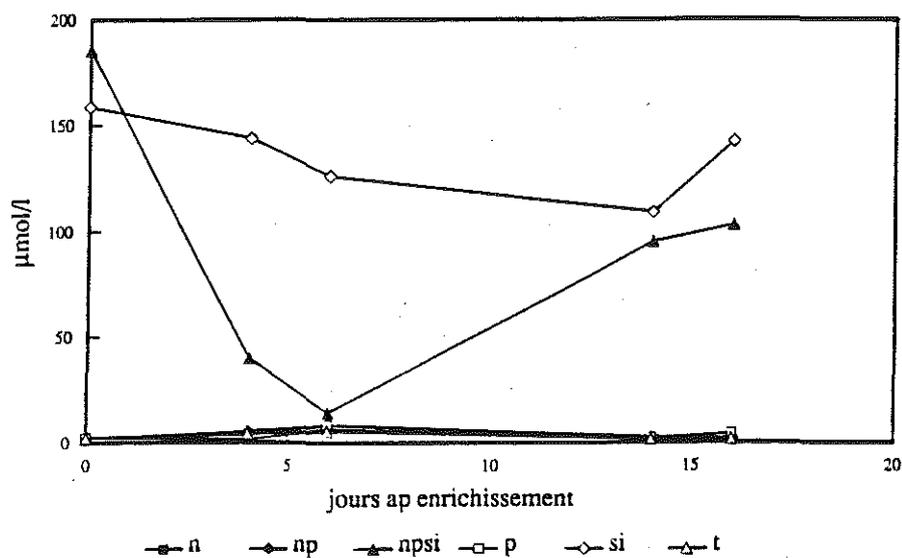


Fig. 6: Evolution des sels nutritifs dans les ballons enrichis à partir de l'eau de la station C du Pertuis Breton.

réserves de phosphore restent pratiquement intactes dans les autres cultures pendant les premiers jours de la croissance, puis s'épuisent complètement.

c) Silicium

De la même façon, le silicium ajouté diminue beaucoup plus rapidement dans la culture contenant l'enrichissement total que dans celle n'ayant reçu que des silicates (fig. 6c). Toutefois, contrairement aux autres éléments, il reste encore $14 \mu\text{moles.l}^{-1}$ de silicium après quatre jours de croissance dans le milieu N + P + Si. Comme précédemment, on observe dans ce milieu une réapparition de sels au bout de 14 jours. L'interprétation de ce phénomène nécessite la connaissance des autres paramètres mesurés. Les cultures non enrichies en silice ne consomment pas leur réserve naturelle lors des 6 premiers jours.

B. Marennes-Oléron

La richesse initiale en sels nutritifs de l'eau du bassin de Marennes-Oléron est plus importante que celle du Pertuis Breton. En effet, la teneur moyenne en nitrates est proche de $40 \mu\text{moles.l}^{-1}$. Pour les phosphates, elle est de $0,45 \mu\text{moles.l}^{-1}$ alors que la silice est présente à près de $15 \mu\text{moles.l}^{-1}$.

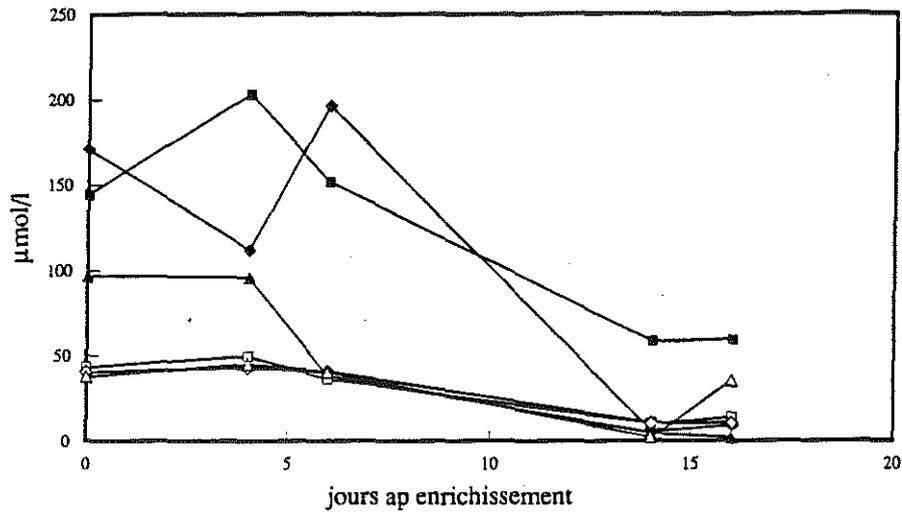
a) Azote

Deux des trois cultures enrichies en azote montrent une diminution des composés azotés lente mais effective (fig. 7a). La culture N + P présente une teneur en N de $100 \mu\text{moles.l}^{-1}$ après 4 jours puis apparaît une nette remontée le 6ème jour. Si la diminution de $60 \mu\text{moles.l}^{-1}$ en 4 jours d'azote peut éventuellement s'expliquer par une forte consommation, l'augmentation de la teneur en N pendant les 2 jours suivants dément cette hypothèse. La diminution progressive dans ce ballon, après le 6ème jour, montre une consommation régulière de l'azote. La brusque diminution peut alors être due à une mauvaise dissolution de l'azote ajoutée (les nutriments ont été ajoutés sous forme de cristaux de sels) : l'échantillon prélevé ne serait alors pas homogène et l'azote peu disponible pour le phytoplancton.

La culture phytoplanctonique qui se développe dans le ballon enrichie en N + P + Si épuise progressivement sa réserve d'azote en 15 jours. Le milieu enrichi en azote seul voit sa concentration en azote augmenter jusqu'au 6ème jour. Cette forte teneur en azote pourrait être due à une reminéralisation de l'azote : soit par retour direct à l'état minéral de l'azote de la matière organique vivante (excrétion de déchets azotés sous forme d'ammonium, peu probable ici), soit par régénération bactérienne.

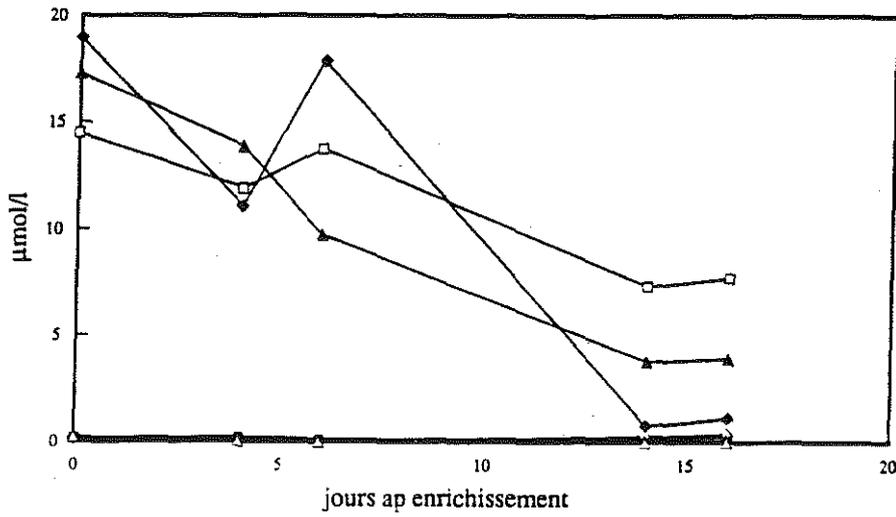
azote

MO



phosphates

MO



silicates

MO

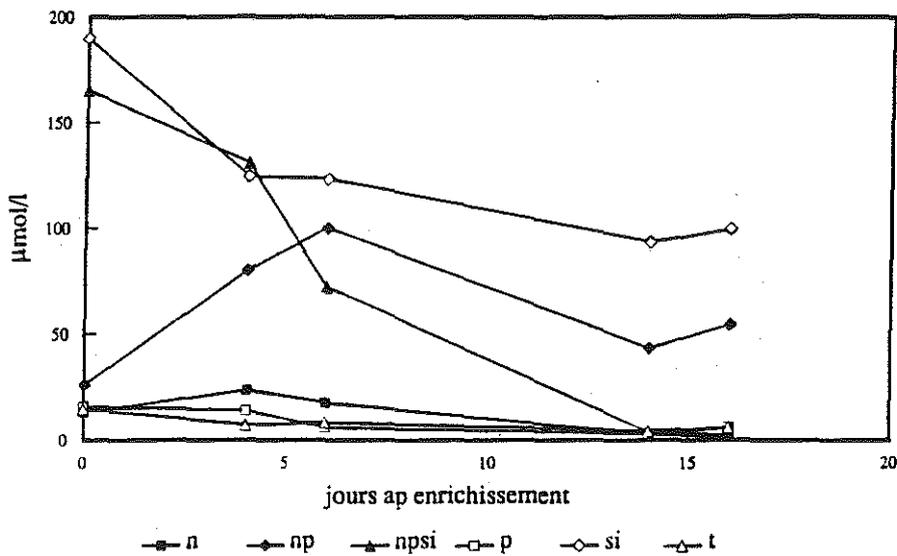


Fig. 7: Évolution des sels nutritifs dans les ballons enrichis à partir de l'eau de la station du Chapus de Marennes-Oléron.

b) Phosphore

La culture N + P présente le même type de graphe que pour la teneur en azote, il est donc probable que le même problème de dissolution soit intervenu pour le phosphore ajouté (fig. 7b). Puisque, par la suite, tout le phosphore est épuisé en 8 jours (d'environ 20 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ à 0,5 $\mu\text{moles.l}^{-1}$). La culture N + P + Si consomme régulièrement le phosphore présent mais n'épuise pas complètement la réserve puisqu'il reste 4 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ après 16 jours de croissance. Le même phénomène a lieu dans la culture P, la consommation étant plus lente. Les milieux non enrichis en phosphore présentent une teneur restant constante au cours de l'expérience.

c) Silicium

Les cultures enrichies N + P + Si et Si consomment la silice (fig. 7c), rapidement pour la culture N + P + Si pour laquelle la réserve est épuisée en 14 jours, plus lentement pour la culture Si où il reste encore 120 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de silice après 16 jours. Le milieu N + P voit sa quantité de silicium remonter pendant les 6 premiers jours puis diminuer jusqu'au 14ème jour. Ainsi, un phénomène similaire pour tous les sels (N, P, Si) a lieu dans le ballon contenant l'enrichissement N + P.

Les milieux non enrichis consomment de façon régulière la silice présente dans le milieu.

2.4. Chlorophylles

A. Pertuis Breton

Toutes les cultures semblent présenter une teneur initiale en chlorophylle identique et proche de 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (fig. 8). La croissance chlorophyllienne la plus rapide est celle de la culture N + P + Si. En effet, la quantité de chlorophylle dans le milieu est multipliée par 20 en trois jours et atteint son maximum, 65 $\mu\text{g.l}^{-1}$, en 5 jours (fig. 8a). Cette production primaire est très importante par rapport à celle des autres milieux de cultures, qui ne dépassent pas 10 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de chlorophylle. On peut toutefois observer une croissance dans toutes les cultures, plus ou moins rapide. Le milieu enrichi en silicium atteint une valeur maximum de chlorophylle après 6 jours de croissance, proche de 8 $\mu\text{g.l}^{-1}$, cette teneur est une des plus forte parmi les cultures enrichies en élément simple. Toutes les autres cultures évoluent peu, atteignant un pic de chlorophylle après 6 à 7 jours de croissance, bien que la culture P présente un maximum dès le 2ème jour. Toutefois, la culture N + P subit une augmentation de biomasse chlorophyllienne à partir du 7ème jour. D'autre part, le ballon contenant cette culture présente une macro-algue issue probablement d'une contamination. Il apparaît donc que seul l'enrichissement N + P + Si a permis une forte augmentation de la production chlorophyllienne. D'autre part, les précédentes expériences d'enrichissements

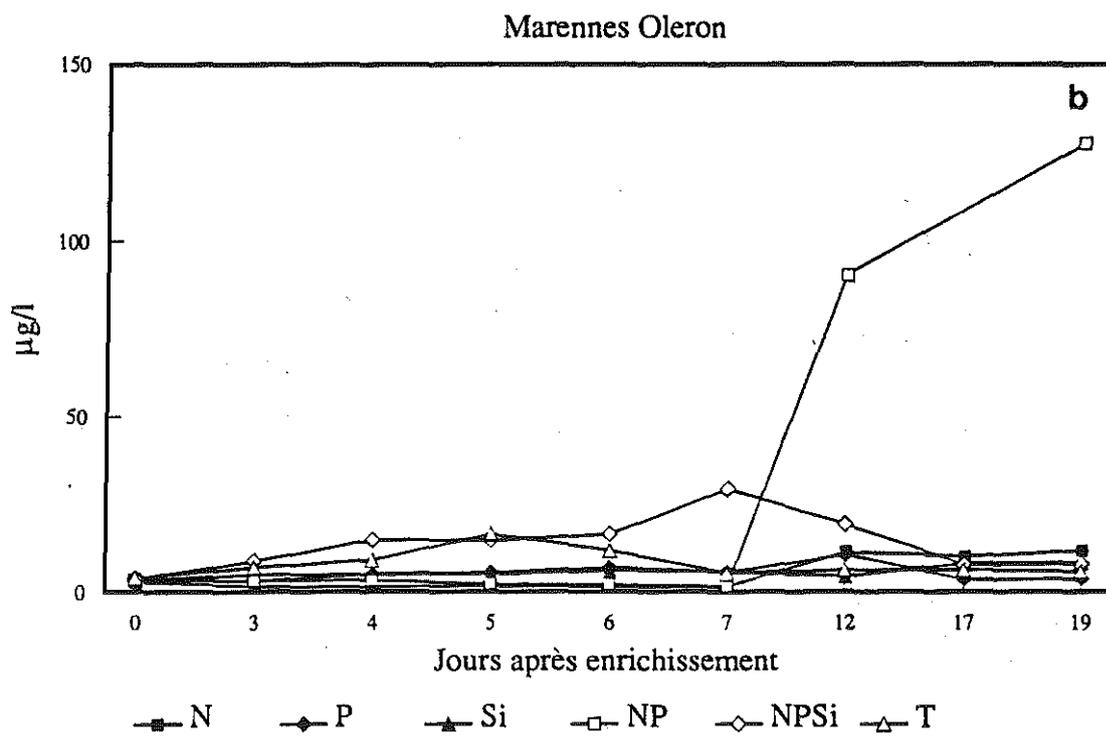
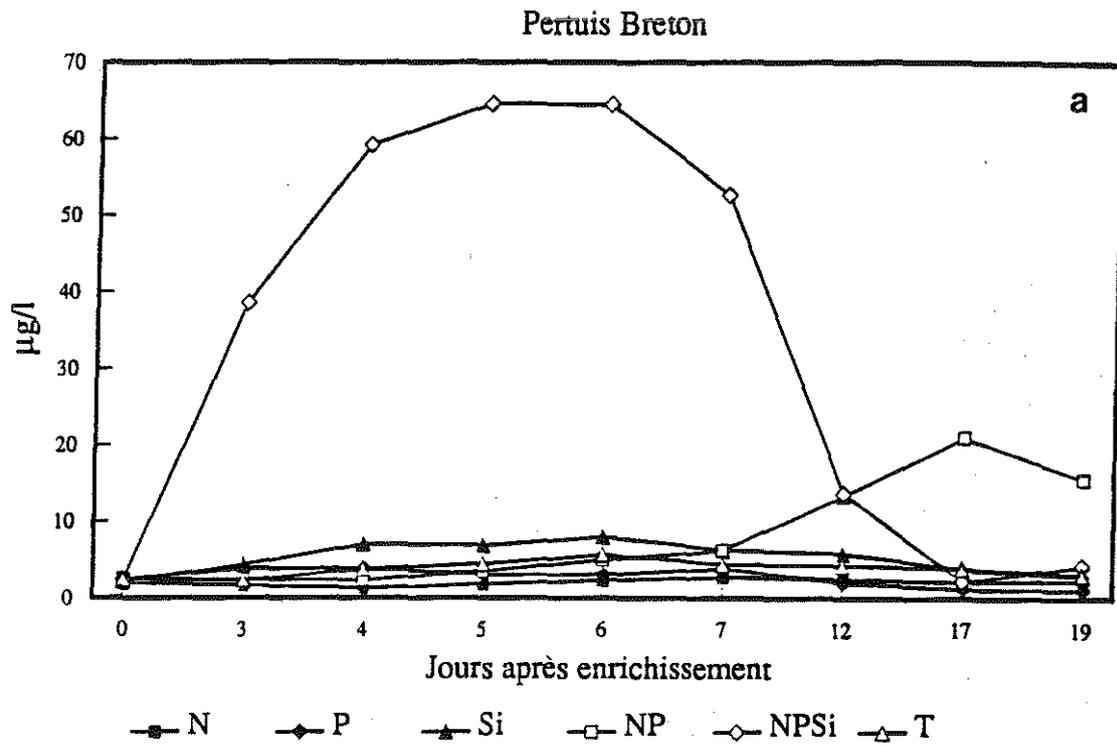


Fig. 8: Evolution des chlorophylles dans les ballons enrichis à partir de l'eau du Pertuis Breton (a) et de Marennes-Oleron (b).

artificiels (Fiala et al., 1976 ; Berland et al., 1978 ; Robert et al., 1982) montrent que les valeurs maximales de chlorophylle obtenues dépassent rarement $20 \mu\text{g.l}^{-1}$. Toutefois, ces expérimentations ont eu lieu *in situ* avec un cycle jour-nuit de 12 h - 12 h. Or les fortes teneurs en chlorophylle de l'enrichissement total ont été obtenues sans limitation de température ou de lumière.

B. Marennes-Oléron

Les teneurs initiales en chlorophylle sont de l'ordre de $3 \mu\text{g.moles}^{-1}$ dans chacun des ballons expérimentaux. Contrairement aux cultures du Pertuis Breton, il n'y a pas de croissance extrêmement rapide (fig. 8b). L'enrichissement total présente à nouveau la teneur en chlorophylle la plus élevée ($29,36 \mu\text{g.moles}^{-1}$) après 7 jours de culture.

La croissance est également visible dans le témoin, mais ne dure que 4 jours alors que la production chlorophyllienne plus lente dans les autres ballons, se prolonge 12 à 17 jours. Notamment, la culture N présente une teneur très faible en chlorophylle pendant les 7 premiers jours puis celle-ci augmente au 12ème jour jusqu'à $11,64 \mu\text{g.moles}^{-1}$ de chlorophylle a. De la même façon, la culture N + P perd de la chlorophylle jusqu'au 17ème jour, il apparaît ensuite une augmentation subite de la biomasse chlorophyllienne. Mais l'observation du ballon met en évidence une contamination algale : une forte coloration verte apparaît et se fixe sur les parois du ballon. Il s'agit donc probablement d'une contamination par *Tetraselmis*, algue cultivée en culture pure dans la même salle de stockage. Hormis les phénomènes de contamination, il semblerait que l'addition d'azote seul favorise davantage la croissance phytoplanctonique que l'addition de phosphore. Mais l'ajout d'un enrichissement total permet la production de chlorophylle la plus importante.

2.5. Carbone et Azote particulaire

Le carbone organique particulaire permet d'évaluer de façon relative, la biomasse algale. L'azote organique particulaire correspond aux protéines de constitution, aux enzymes, et à certains composés azotés de réserve. Ainsi, en période de croissance et multiplication algale, la quantité d'enzyme, donc d'azote devrait augmenter. Le rapport molaire C/N permet donc de suivre l'état physiologique d'une population phytoplanctonique. Les travaux de différents auteurs aboutissent à des valeurs du rapport C/N inférieures à 7 pour des eaux riches en population phytoplanctonique jeune en pleine activité enzymatique et supérieures à 10 pour des eaux anciennes et pauvres (Lemasson et al., 1977 ; Parsons, 1961).

A. Pertuis Breton

Le carbone et l'azote varient de manière similaire. Leur concentration augmente fortement pour la culture N + P + Si, le 6ème jour (jusqu'à 65 mg/l d'azote et jusqu'à 5,5

mg/l d'azote) (fig. 9). La culture N + P présente une augmentation de ces deux éléments au 12ème jour mais la présence d'une macro-algue a déjà été constatée dans ce ballon. Les autres milieux laissent apparaître des valeurs de C et N assez constantes ou en faible augmentation. Le rapport C/N n'évolue pas de la même façon dans toutes les cultures (fig. 9c). Dès le jour 0, le rapport varie de 7 à 12 alors que l'eau de tous les ballons est la même.

B. Marennes-Oléron

Les deux éléments dosés évoluent toujours dans le même sens mais l'azote semble augmenter plus rapidement que le carbone organique (fig. 10). Ainsi la culture N + P + Si s'enrichit en azote organique de façon notable dès le 4ème jour de croissance alors que le carbone n'augmente qu'après 6 jours. De même, le milieu enrichi en N + P atteint une valeur maximale d'azote organique (2,4 mg/l) dès le 12ème jour et le carbone n'atteint cette valeur (50 mg/l) qu'après 14 jours. Ce même type d'évolution parallèle s'observe pour tous les milieux. En outre, la culture P subit une diminution brutale de l'azote organique et de carbone le 12ème jour. Les autres cultures s'enrichissent en éléments organiques particuliers jusqu'au 16ème jour. Le rapport C/N au début est légèrement supérieur à 10 et diminue pendant 6 jours (fig. 10c). Il augmente par la suite jusqu'à atteindre 22.

2.6. Analyse des tailles des particules

Les graphes obtenus visualisent les nombres de cellules par classe de taille, estimée en diamètre équivalent sphérique sur une échelle logarithmique mettant en exergue les petites classes de taille.

A. Pertuis Breton

L'évolution générale est assez homogène (fig. 11) ; il y a une augmentation importante du nombre de particules lors du 4ème jour, puis une augmentation plus lente, voire une diminution après 6 jours. Une autre caractéristique, évoluant dans toutes les cultures, est le déplacement du mode, c'est-à-dire la classe de diamètre ayant le plus grand nombre de particules. Pour l'enrichissement en azote seul, on observe un glissement du mode vers la droite, c'est-à-dire vers des diamètres plus grands. Celui-ci se trouvait aux environs de 4 - 5 μm et évolue vers 5 - 6 μm les deux premiers jours. Les jours suivants, le nombre de particules continue d'augmenter, mais le mode reste le même. Dans le milieu enrichi en phosphates, le nombre de particules augmente tout au long des 4 jours. Le même déplacement du mode a lieu après deux jours de cultures, les particules devenant donc plus nombreuses et plus grosses. Par la suite, la culture voit son mode revenir vers la gauche, vers des diamètres légèrement inférieurs : 4 - 5 μm . De plus, le pic modal devient plus étroit et marque ainsi une diminution de la diversité spécifique algale. En ce qui

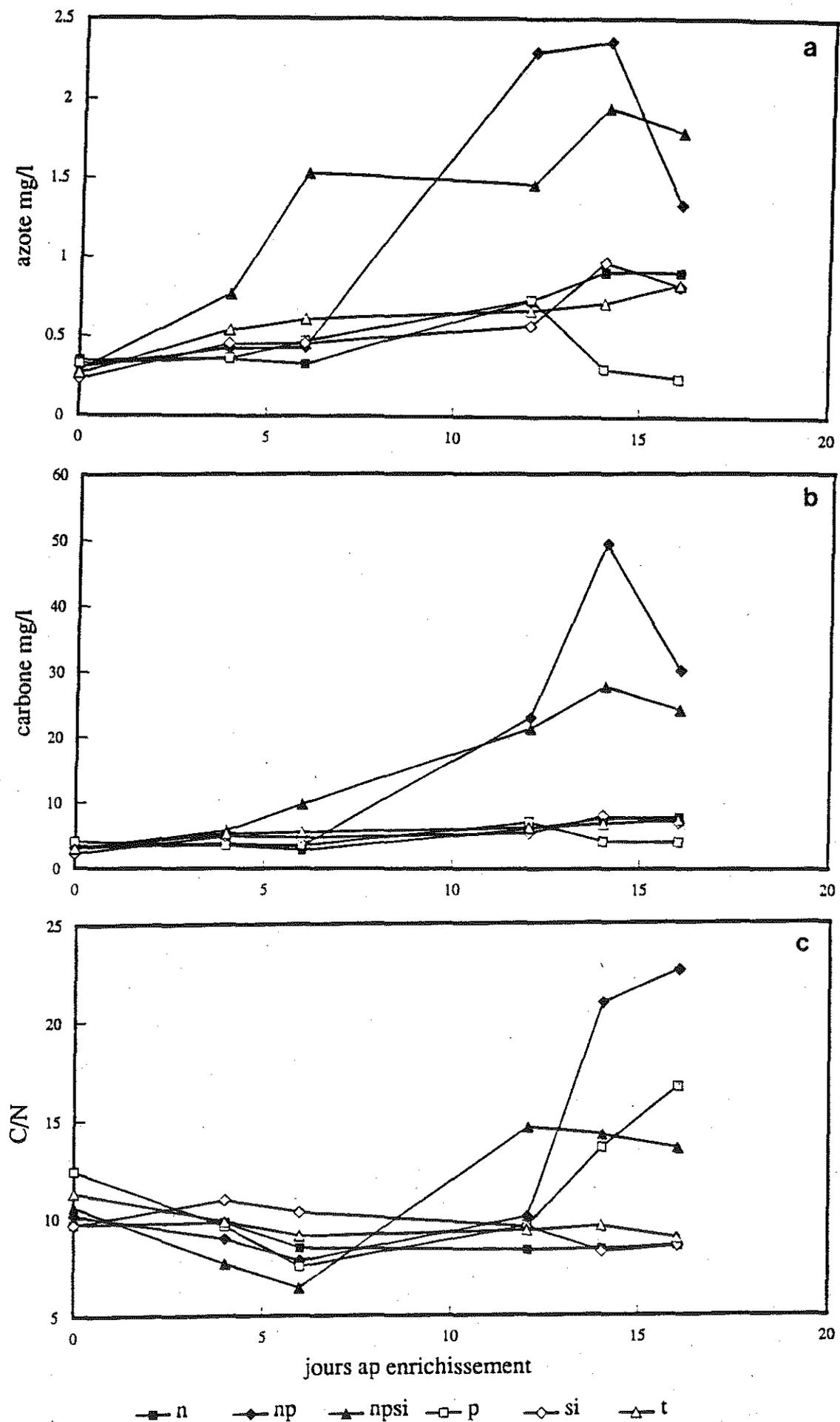


Fig. 9: Evolution a) de l'azote particulaire, b) du carbone particulaire, c) du rapport C/N, dans les eaux enrichies du Pertuis Breton.

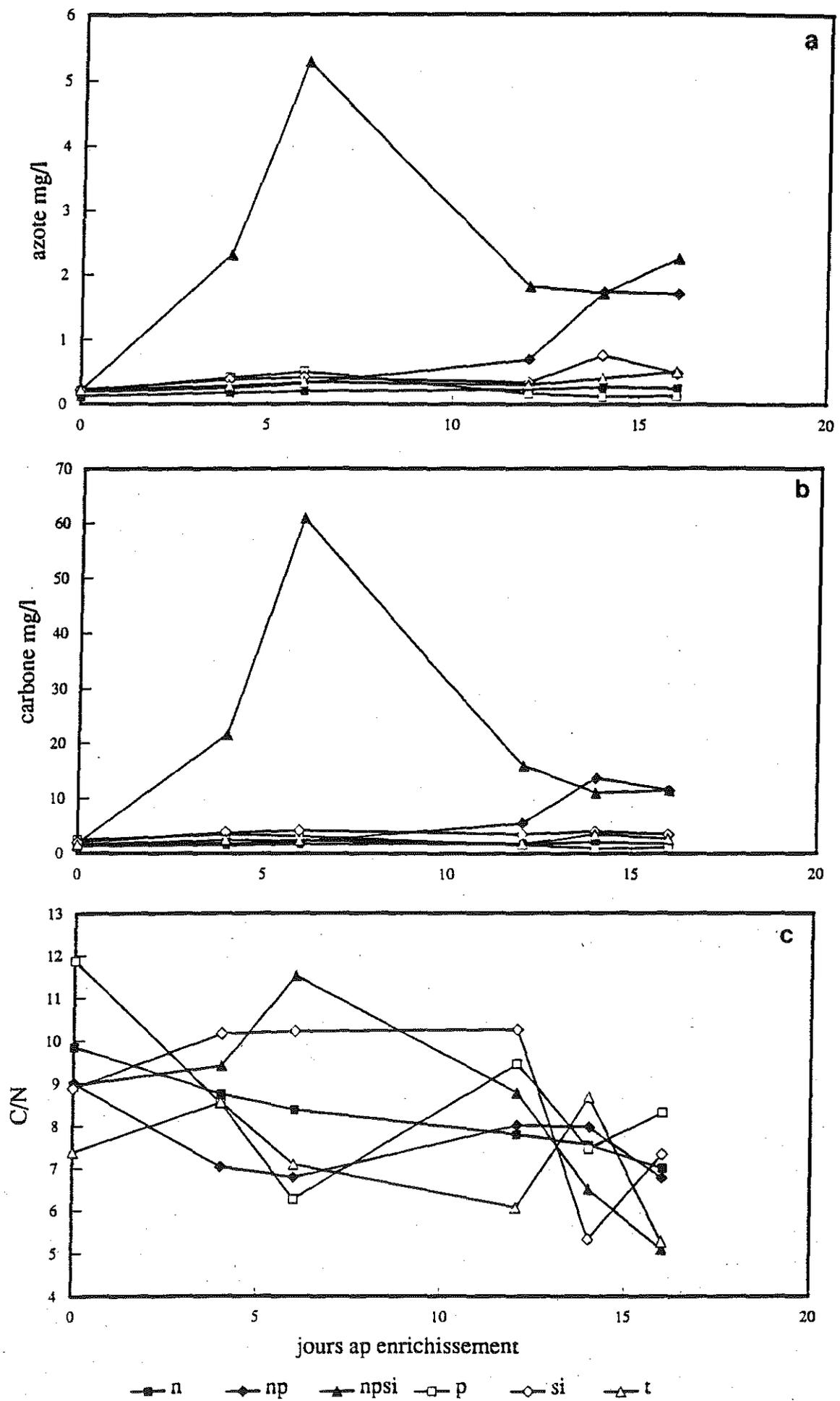


Fig. 10: Evolution a) de l'azote particulaire, b) du carbone particulaire, c) du rapport C/N, dans les eaux enrichies de Marennes-Oléron.

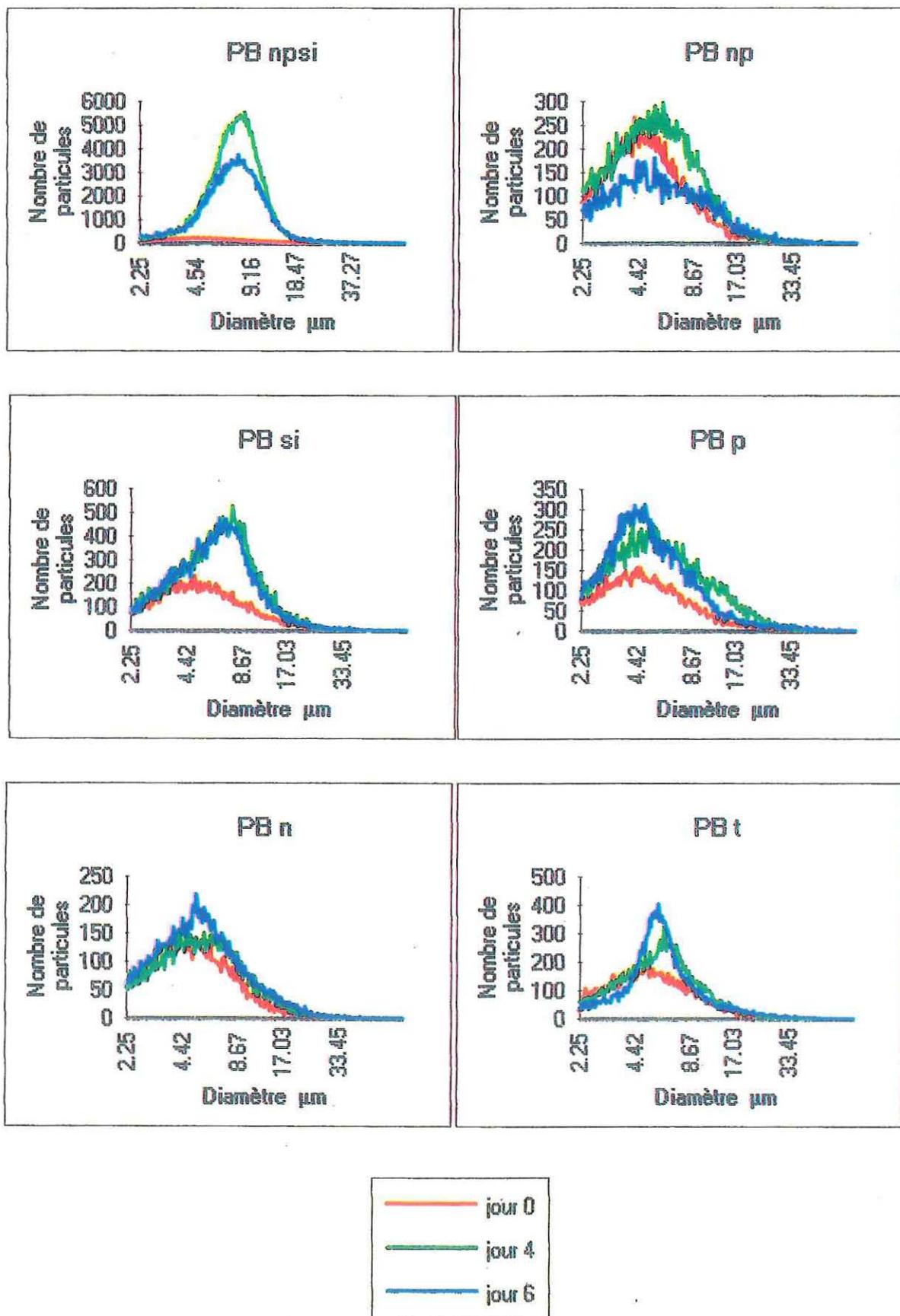


Fig. 11: Evolution temporelle de la répartition en classes de taille des particules observée dans chacun des enrichissements des eaux du Pertuis Breton.

concerne l'enrichissement en silice, les deux premiers jours de croissance marquent, en plus d'une forte augmentation du nombre de cellules (de 250 à 600 particules), un net déplacement du mode vers des diamètres supérieurs : de 4,5 μm à 8,9 μm . La mesure suivante fait apparaître un nouveau changement du mode qui revient vers 6 - 7 μm , sans nette augmentation du nombre. Dans le ballon enrichi en azote et phosphate, le nombre de cellules n'augmente pas de façon importante en deux jours. Le mode s'est légèrement déplacé vers la droite, les diamètres évoluant de 4 - 5 μm à 5 - 6 μm . Le pic est plus élargi à droite. Les deux jours suivants montrent une diminution du nombre de particules ainsi qu'un "écrasement" du pic qui pourrait s'expliquer par une plus grande diversité spécifique. Dans le milieu riche en silice, le début de la croissance est marqué par une très forte augmentation du nombre de particules puisque le nombre de particules passe de 250 à 6 000/l. De plus, un déplacement important du mode a lieu : de 5 μm à 8 μm . Enfin, le pic modal devient très étroit. Après 4 jours de culture, le nombre de particules diminue mais le mode reste à 8 μm . La croissance du témoin se caractérise par un déplacement du mode de 4 - 5 μm à 6 - 7 μm et une augmentation du nombre de particules. Le pic modal devient nettement plus étroit, notamment après 4 jours de culture.

B. Marennes-Oléron

L'évolution générale des graphes (fig. 12) est similaire à ceux obtenus pour le Pertuis Breton. Toutefois, tous les graphes correspondant au 1er jour laissent apparaître un pic de particules de plusieurs dizaines de microns, qui disparaît après 2 jours de croissance.

Dans le milieuensemencé en azote, il n'y a pas, lors des 2 premiers jours de la croissance de nette augmentation du nombre de particules. En revanche le mode se trouve légèrement décalé de 5 μm à 6 - 7 μm . Mais celui-ci revient à 5 μm après 4 jours alors que le nombre de particules augmente. Après 2 jours de culture, le mode est légèrement déplacé vers la droite, passant de 5 μm à 6 μm ; le nombre de particules diminue. Après 4 jours, le mode est inchangé et la croissance démarre légèrement. Ni le nombre de particules, ni le mode n'évoluent pendant 2 jours dans cette culture. Après 4 jours, une légère augmentation du nombre de particules apparaît, le mode reste le même : 5 μm .

Les particules sont moins nombreuses après 2 jours de culture puis retrouvent leur nombre de départ après 4 jours. Le mode est déplacé vers la droite, de 5 μm à 7 μm de diamètre. La forme du pic évolue peu. Le nombre de particules diminue pendant les 4 jours de la culture. Le mode est déplacé vers la droite au cours des 2 premiers jours, il évolue alors de 5 μm à 6 μm . Mais le pic modal est nettement élargi, la "classe" modale devient alors : 5 à 9 μm . Les deux jours suivants montrent une très nette diminution du nombre de particules avec un maintien toutefois du nombre de particules de diamètre 8 - 9 μm . Une diminution du nombre de particules est à noter, avec un glissement du mode vers un diamètre supérieur de 4,5 μm à 7,8 μm .

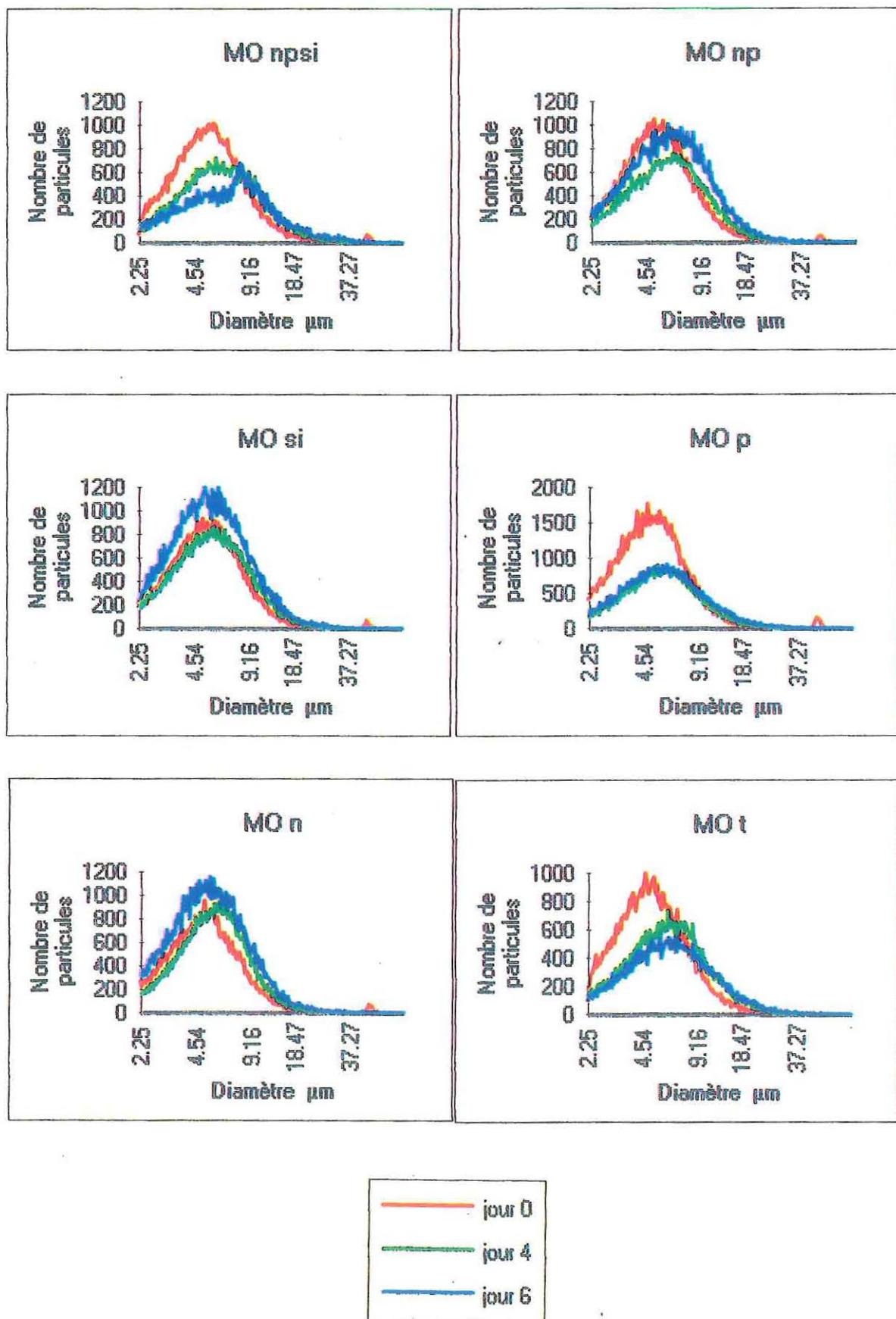


Fig. 12: Evolution temporelle de la répartition en classes de taille des particules observée dans chacun des enrichissements des eaux de Marennes-Oléron.

3. Critiques du premier protocole

La même expérimentation est réalisée un mois après, afin de constater d'éventuels changements dans le milieu, dus aux changements saisonniers. Toutefois, au vu des résultats obtenus, quelques modifications peuvent être apportées au protocole. Il apparaît, d'après les analyses du milieu initial que la qualité de l'eau des différentes stations du Pertuis Breton n'est pas homogène. En effet, les teneurs en sels nutritifs de la station C, lieu de prélèvement de l'eau utilisée pour l'expérience, sont nettement inférieures aux teneurs moyennes observées dans le bassin. Ainsi, bien que l'étude porte directement sur l'impact des filières de moules, les résultats obtenus ne sont pas représentatifs du bassin. Le second protocole mettra donc en oeuvre l'échantillonnage d'une seconde station dans le Pertuis Breton. En revanche, les stations de prélèvement du bassin de Marennes-Oléron sont relativement homogènes.

D'autre part, l'eau a été stockée 36 h à 48 h à luminosité et température constantes pour permettre à un équilibre thermique de s'établir. Pendant ce temps de latence, une grande quantité de chlorophylle est produite dans pratiquement tous les ballons, les sels nutritifs sont consommés et les réserves naturelles sont parfois épuisées. Il peut ainsi y avoir dégénérescence de la chlorophylle produite et risque de reminéralisation bactérienne des sels minéraux. Le milieu présent après équilibrage des températures ne correspond donc plus au milieu naturel, et semble différent dans chaque ballon. Afin d'éviter ce type de modifications incontrôlables, le stockage par mise en équilibre des températures, jugé inutile, est supprimé lors de la seconde expérimentation.

Afin de favoriser la croissance algale, un bullage d'air enrichi en CO_2 avait été installé dans chaque ballon. Or, il est probable que l'apport de CO_2 , trop important au début de la culture, ait fortement abaissé le pH ; l'acidité du milieu peut alors diminuer ou inhiber la croissance des algues. Ce phénomène physique peut expliquer la lenteur du démarrage de certaines cultures, dans lesquelles la teneur en chlorophylle diminuait les premiers jours. Ainsi, pour maintenir le pH basique de l'eau de mer et permettre une croissance plus régulière, le bullage dans les ballons est supprimé. De plus, la quantité de CO_2 dissous dans l'eau est, normalement, suffisante pour ne pas être limitante. Cette absence de bullage va permettre des manipulations stériles : les ballons stérilisés avant l'expérience, ne seront ouverts que sous une hotte à flux laminaire. Ainsi, les risques de contaminations par des algues cultivées dans la même salle sont réduits et les contaminations bactériennes ne seront nuisibles que si les bactéries naturelles de l'eau se développent.

Un autre biais méthodologique lié à l'enrichissement a pu être source de ralentissement de la croissance : une mauvaise dissolution des sels nutritifs. En effet, les éléments ont été ajoutés sous forme de cristaux ; outre l'agitation insuffisante, les sels minéraux se

dissolvent mal dans l'eau salée. Ainsi, il est possible que l'enrichissement, mal dissous, ne soit pas immédiatement disponible pour les algues. Afin d'écartier ce risque, l'enrichissement sera dorénavant effectué à l'aide de solutions nutritives dans lesquelles les sels seront dissous à l'aide d'agitateurs magnétiques. D'autre part, pour connaître l'enrichissement effectif, un échantillon sera prélevé aussitôt après l'addition de la solution, un problème éventuel de dissolution pourra alors être mis en évidence.

L'étude de l'influence des déficiences nutritives sur une espèce algale très fréquente dans l'eau étudiée peut apporter des renseignements sur les qualités nutritionnelles de cette eau. C'est pourquoi la seconde expérience d'enrichissements artificiels porte sur la flore naturelle d'une part et sur une algue "test" provenant d'une culture pure, d'autre part.

Enfin, il serait préférable d'obtenir une croissance plus rapide pendant les premiers jours de la culture. En effet, l'incubation expérimentale et l'addition d'un milieu fertilisant conduisent au développement d'un microcosme qui, après quelques temps, n'a plus grand rapport avec celui d'origine. Ainsi, plus la croissance se déroule rapidement, moins le milieu ne se modifie. Pour cela, la population de départ doit être plus dense : le phytoplancton peut être concentré. La méthode adoptée consiste à faire décanter de grandes quantités d'eau et à récupérer le dépôt. Toutefois, toutes les matières minérales en suspension décanteront également et polluent le milieu.

V. SECONDE EXPERIMENTATION

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Echantillonnage

Les stations échantillonnées sont identiques à la première expérience (Chapus et C), mais, compte tenu des résultats obtenus, une station supplémentaire est choisie dans le Pertuis Breton : D. Elle se situe entre les stations A et B, celles-ci étant relativement homogènes.

Les prélèvements ont lieu le 25 mai 1994 dans le Pertuis Breton : prélèvement de 120 l à la station C (près des filières à moules), profondeur de 2 m (moins turbide), de 130 l à la station D, -1 m. Prélèvements le 27 mai 1994 au Chapus, dans le bassin de Marennes-Oléron : 120 l à 1 m de profondeur.

1.2. Second protocole expérimental

in situ

L'eau est prélevée à l'aide d'une moto pompe et est immédiatement filtrée sur un tamis de 200 μm de vide de maille. Elle est récoltée en bidons de 20 l et 30 l. Température et salinité sont mesurées puis les bidons sont maintenus à l'obscurité, recouverts de sacs noirs, pour éviter la photosynthèse.

Au laboratoire

a. Culture de la flore naturelle

Les bidons sont maintenus à l'obscurité pendant 12 h, pour laisser les particules en suspension décanter. L'eau superficielle est ensuite vidée par siphonnage des bidons et les dépôts sont rassemblés dans un des bidons. L'eau très turbide obtenue est alors répartie dans 6 ballons (bouchés par du coton cardé et stériles) par station, à raison d'un l par ballon. Les enrichissements sont alors réalisés, stérilement, avec des solutions nutritives de concentrations connues (tableau 3). Les ballons sont stockés à 17°C et à la luminosité constante.

b. Culture monospécifique de la diatomée *Skeletonema costatum*

De l'eau de mer non concentrée (surnageante) est répartie dans des tubes à essai : 21 ml par tube. Chaque tube étant triplé, 54 tubes sont ainsi préparés. Après stérilisation à l'autoclave, les mêmes enrichissements sont ajoutés stérilement, ainsi qu'un ml de solution vitaminique (les vitamines de l'eau sont détruites par la stérilisation). Enfin, chaque tube estensemencé avec 2 ml d'une culture pure de *Skeletonema costatum*, elle-même contenant

une forte concentration en sels nutritifs. Les tubes sont stockés dans les mêmes conditions que les ballons.

Elément	Formule	Concentration produit (mg/l)		Concentration élément ($\mu\text{g.at.l}^{-1}$)	
		PB	MO	PB	MO
N	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	4,088		102,2	
P	$\text{NaH}_2 \text{PO}_4 (2\text{H}_2\text{O})$	1,5768		10,1	
Si	$\text{Na}_2 \text{SiO}_3 (5\text{H}_2\text{O})$	21,2088		100,04	
NP	-	4,044 + 1,576		101,1 + 10,1	
NPSi	-	4,064 + 1,568 + 21,21		101,6 + 10,05 + 100,04	

Tab3: Différents enrichissements effectués

c. Analyses

On effectue les mêmes dosages que lors du premier protocole. Tous les prélèvements d'échantillons sont effectués sous la hotte à flux laminaire pour éviter toute contamination.

2. Resultats

L'évolution des paramètres physiques montre une stabilité au cours de l'expérimentation, avec une température fluctuant de 18,7°C à 20,9°C et une salinité de 30,1 ‰ à 31,8 ‰.

2.1. Evolution des sels nutritifs

A. Pertuis Breton

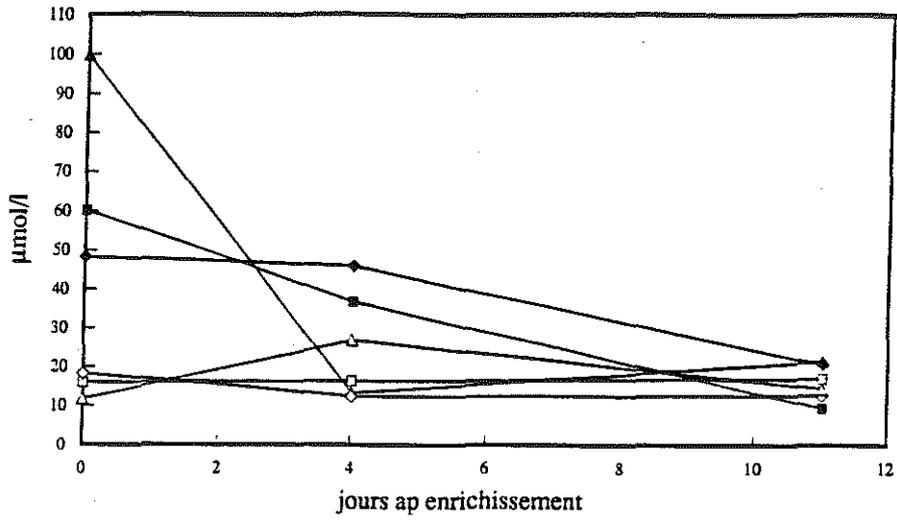
* Station C (proche des filières)

a). Azote ($\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4$)

Les trois milieux enrichis en azote voient leur concentration en cet élément diminuer tout au long de l'expérimentation, plus ou moins rapidement (fig.13a). La culture N + P + Si consomme très rapidement l'enrichissement en azote fourni puisqu'il passe en 4 jours de 100 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ à 15 $\mu\text{moles.l}^{-1}$, teneurs proches de la valeur initiale. Les cultures N et N + P épuisent leur réserve plus progressivement, il reste encore près de 20 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ d'N après 11 jours. Les cultures P, Si et T n'entament pratiquement pas leur réserve azotée. En outre, le premier prélèvement effectué juste après l'enrichissement, laisse apparaître des différences importantes sur les quantités d'azote dans les enrichissements. Les solutions nutritives enrichissantes étant bien homogènes et les pesées précises, il est probable que des erreurs de manipulations soient intervenues lors des dilutions, nécessaires pour les

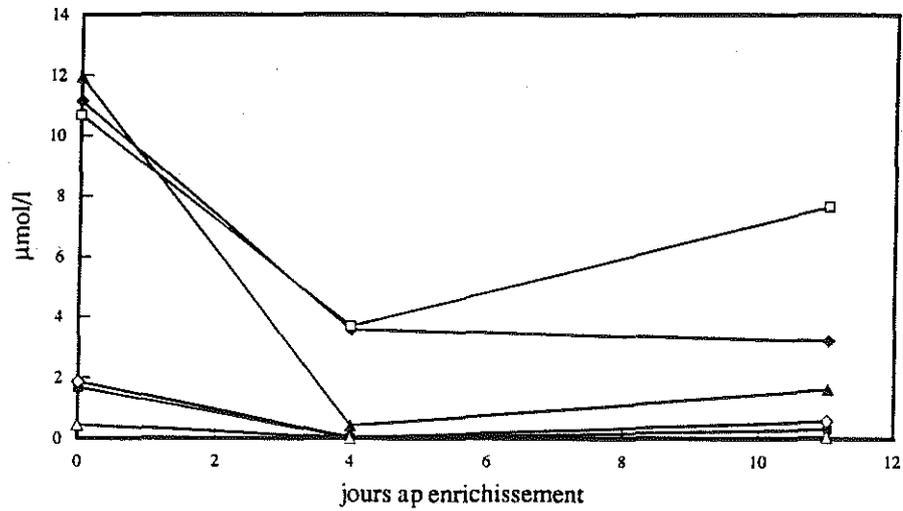
azote

C



phosphates

C



silicates

C

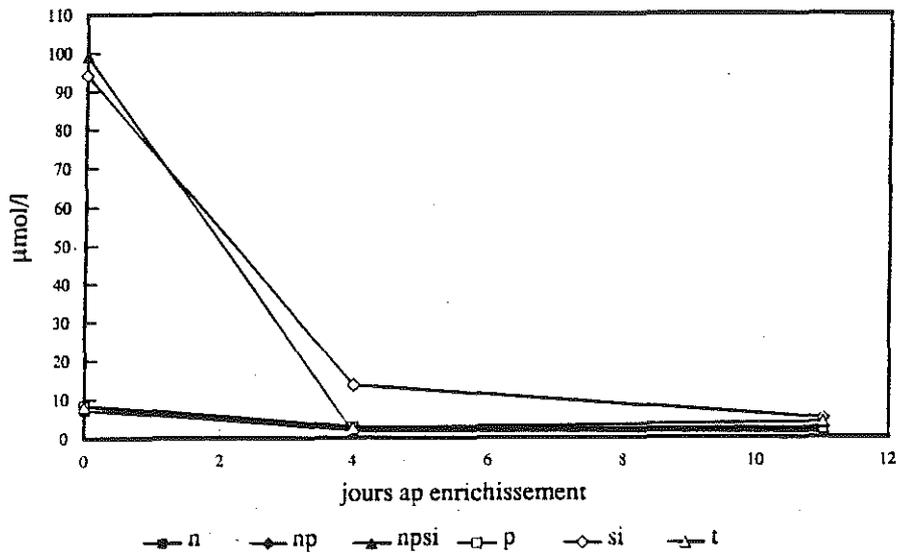


Fig. 13: Evolution des sels nutritifs dans les ballons enrichis à partir de l'eau de la station C du Pertuis Breton.

dosages par le SKALAR. Une mauvaise homogénéisation pourrait expliquer les teneurs basses obtenues.

b). Phosphates

Pendant les 4 premiers jours de croissance, le phosphore est consommé dans tous les ballons (fig.13b). Les cultures N, Si et T épuisent totalement leur réserve naturelle. La culture N + P + Si consomme entièrement l'enrichissement apporté et la réserve naturelle. En revanche, dans les milieux P et N + P, il reste encore 4 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ d'azote après 4 jours.

On peut observer, après 11 jours de culture, une légère augmentation de la teneur en phosphates dans quelques ballons.

c). Silicium

Il y a consommation de la silice tout au long de la manipulation (fig.13c). Les cultures N, P, N + P, N + P + Si et T épuisent totalement leur réserve de silicium en 4 jours, alors qu'il reste 15 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de silicium dans le milieu Si. Cette réserve est consommée après 11 jours.

* Station D

a). Azote

Toutes les cultures consomment de l'azote dès les 4 premiers jours (fig.14a). Les cultures N + P et N + P + Si utilisent rapidement l'enrichissement fourni (110 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ en 4 jours pour N + P + Si). Les autres cultures consomment progressivement leurs réserves.

b). Phosphore

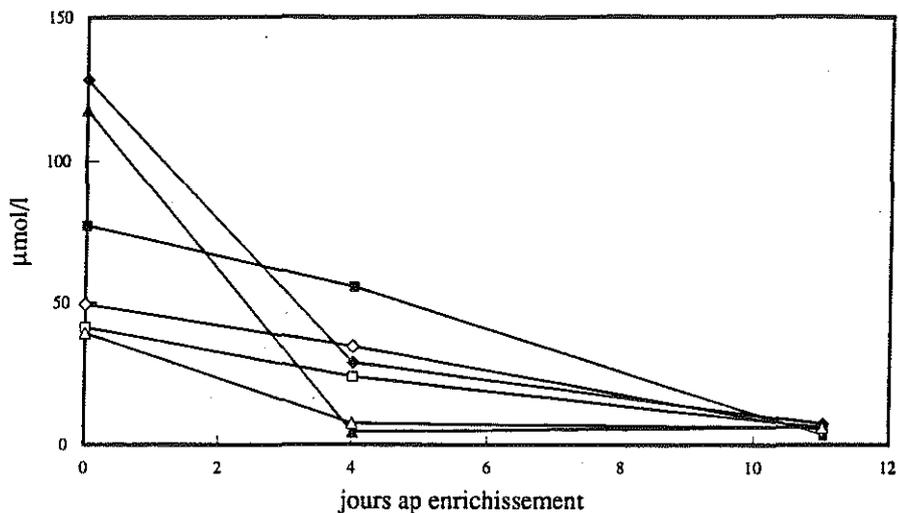
Les consommations de phosphore les plus rapides ont lieu dans les cultures N + P + Si et N + P puisqu'elles consomment respectivement 12,5 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ et 10 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ d'azote en 4 jours (fig.14b). Les autres cultures consomment également le phosphore qui est à leur disposition, mais moins rapidement. En effet, il reste 4 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de phosphore à la culture P après 11 jours. Les cultures non enrichies en phosphore épuisent leur réserve naturelle en 4 jours.

c). Silicium

Après 11 jours de culture, il ne reste plus de silicium dissous dans les milieux (fig.14c). En effet, les milieux Si et N + P + Si ont consommé 90 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de silicium en 4 jours puis épuisent totalement leur réserve les jours suivants. Les autres milieux utilisent les 10 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de silicium naturellement présentes dans le milieu en 4 jours.

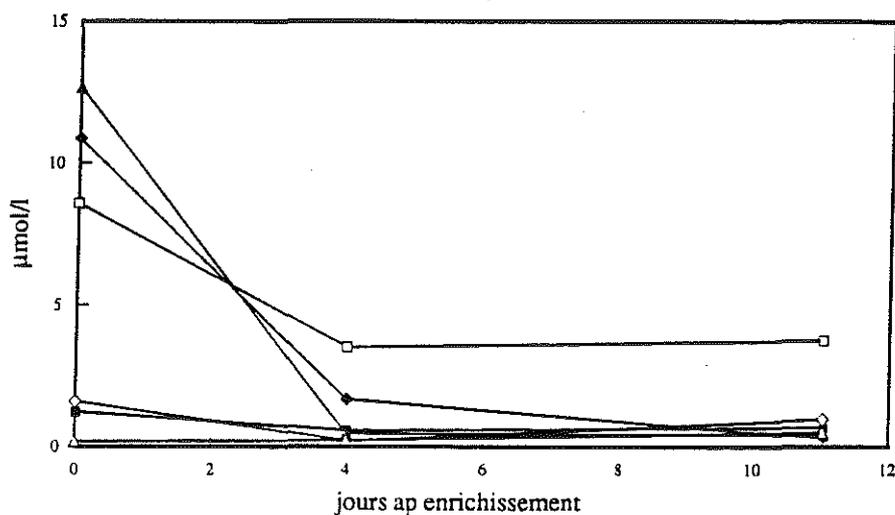
azote

D



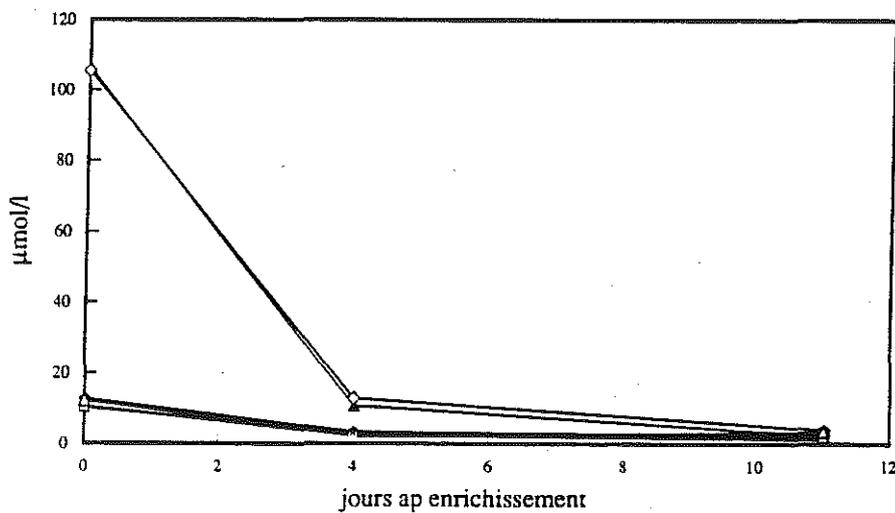
phosphates

D



silicates

D



—■— n —●— np —▲— npsi —□— p —◇— si —△— t

Fig. 14: Evolution des sels nutritifs dans les ballons enrichis à partir de l'eau de la station D du Pertuis Breton.

B. Marennes-Oléron

a). Azote

L'azote est consommé dans toutes les cultures dès le 1er jour (fig.15a). Excepté dans la culture N + P + Si les réserves sont épuisées en 9 jours.

b). Phosphore

Il y a une importante consommation de phosphore pendant l'expérience (fig.15b). La plus importante est toujours dans la culture N + P + Si qui consomme 10 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de phosphore en 2 jours. Les cultures N + P et P ont une consommation plus lente, en effet le milieu N + P consomme la même quantité que N + P + Si en 9 jours et le milieu P ne consomme que 7 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ pendant toute l'expérience.

Les milieux non enrichis utilisent les 2 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de phosphore qui leur sont disponibles naturellement.

c). Silicium

La silice diminue rapidement dans chacun des milieux (fig.15c). La culture N + P + Si absorbe toujours la plus rapidement puisque dans le même temps, 2 jours, elle absorbe 80 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de silice tandis que la culture Si n'en consomme que 45 $\mu\text{moles.l}^{-1}$. Une fois de plus, les cultures sans silice ajoutée consomment leurs réserves naturelles. Toutefois, le stock de silice n'est jamais totalement épuisé puisqu'il reste entre 5 et 10 $\mu\text{moles.l}^{-1}$ de silice de chaque ballon.

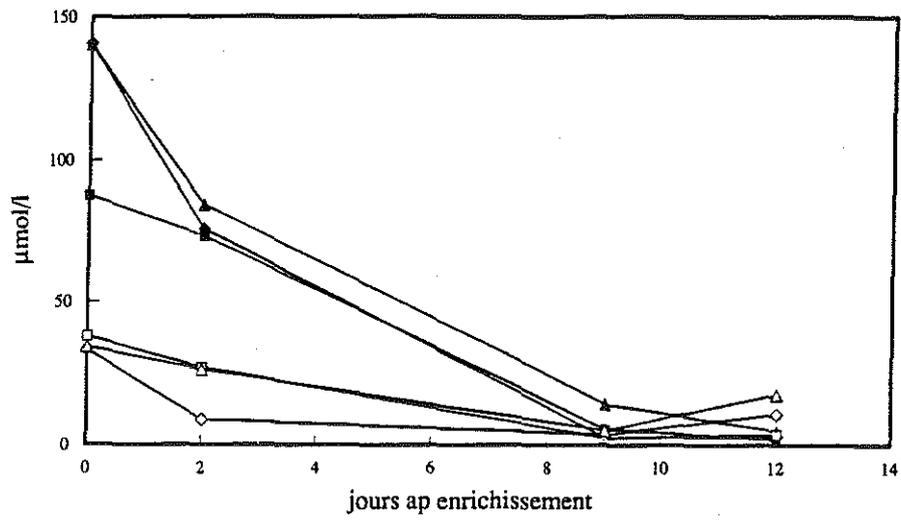
2.2. Chlorophylle

A. Pertuis Breton

***Station C**

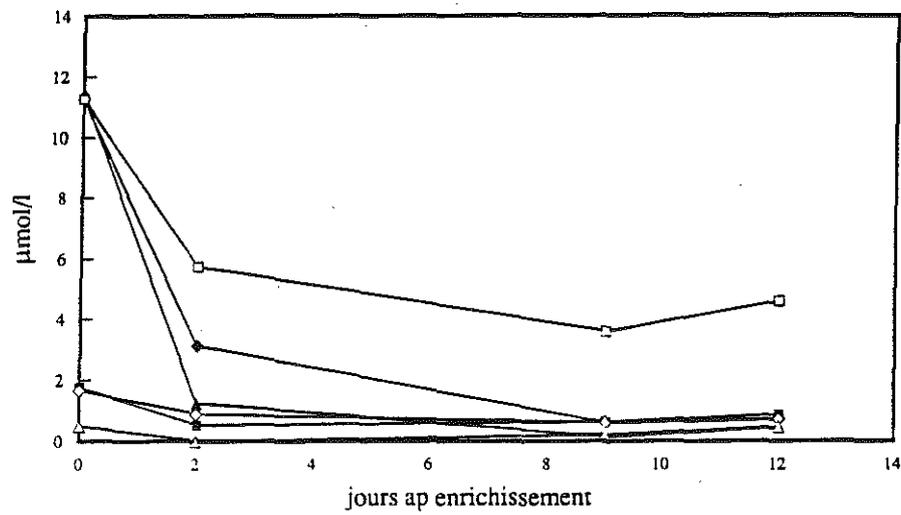
Tous les graphes présentent la même allure générale. La culture contenant l'enrichissement total atteint toutefois la teneur en chlorophylle maximale c'est-à-dire 50 $\mu\text{g/l}$ (fig 16a). Elle est de 20 $\mu\text{g/l}$ pour la culture Si. Tous les milieux obtiennent leur teneur maximale en chlorophylle en 5 jours. Seul le milieu N + P semble démarrer sa croissance vers le 9ème jour. Si toutes les cultures, exceptée la culture N + P, commencent à dégénérer le 6ème jour, elles atteignent dès le 7ème jour une teneur en chlorophylle identique à la teneur de départ, entre 10 $\mu\text{g/l}$ et 5 $\mu\text{g/l}$. La culture enrichie en phosphore semble produire un peu plus de chlorophylle que le témoin qui lui-même pousse mieux que la culture N.

M



phosphates

M



silicates

M

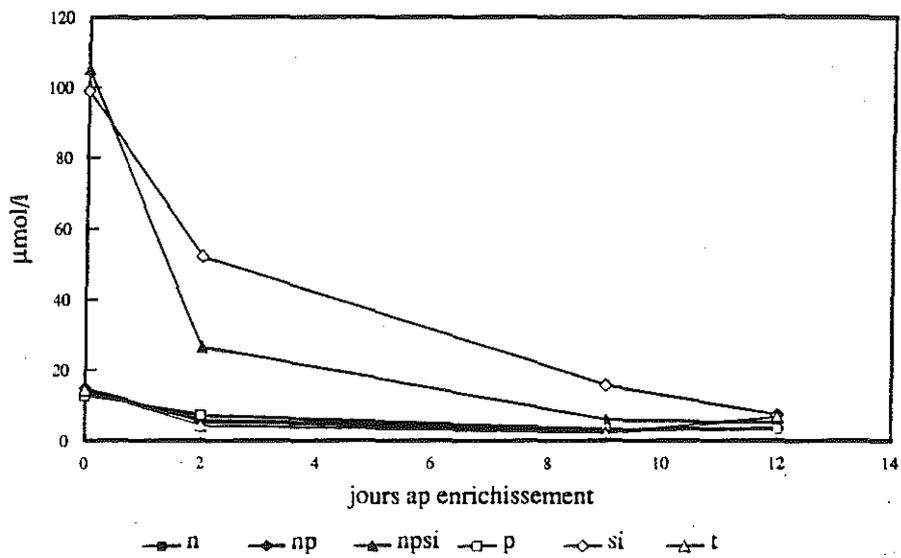
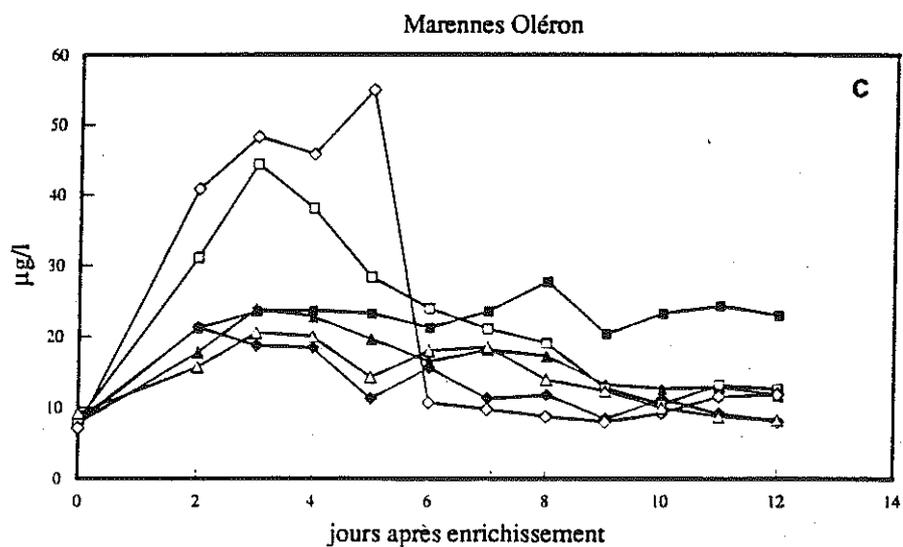
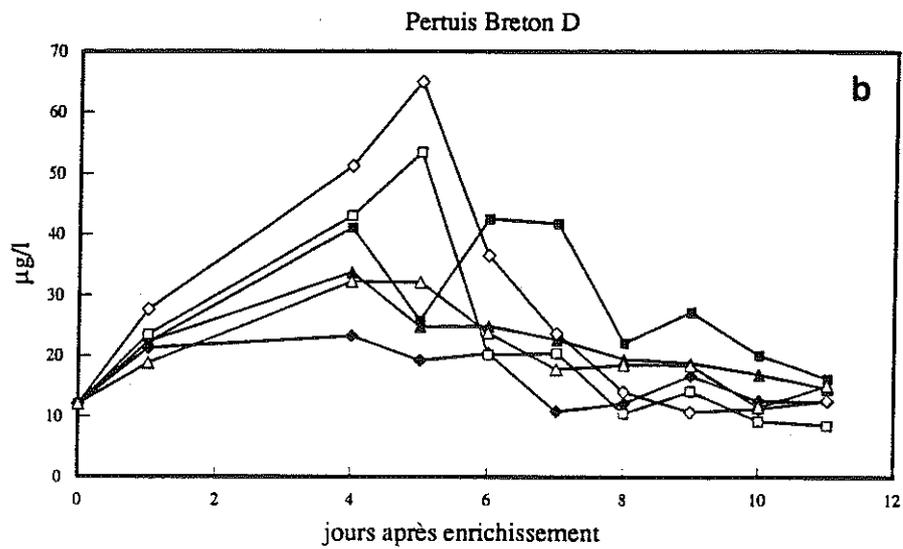
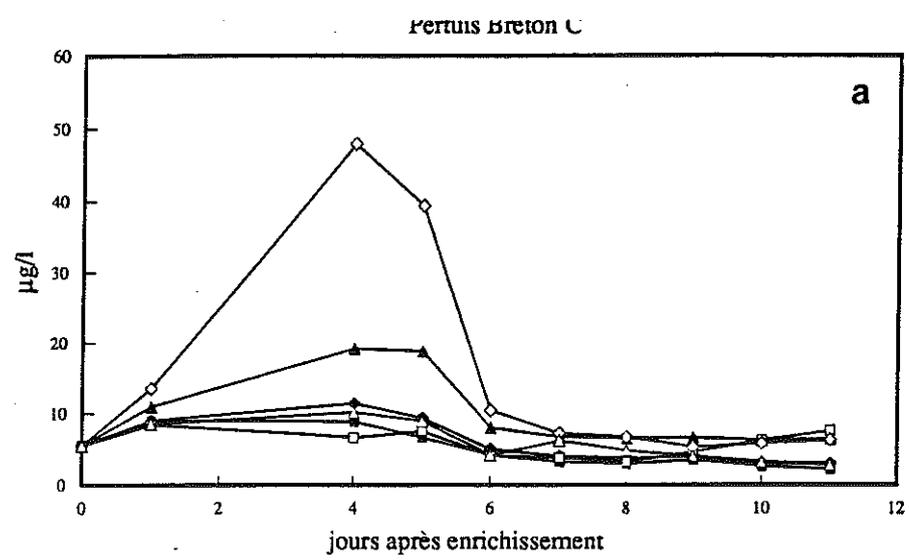


Fig. 15: Evolution des sels nutritifs dans les ballons enrichis à partir de l'eau de la station du Chapus de Marennes-Oléron.



■ N
◆ P
▲ Si
□ NP
◇ NPSi
△ T

Fig. 16: Evolution des chlorophylles dans les ballons enrichis à partir de l'eau de la station C du Pertuis Breton (a), de la station D du Pertuis Breton (b) et de Marennes-Oléron (c).

*Station D

La croissance lors des premiers jours de culture a lieu dans tous les milieux. La plus importante et la plus rapide se trouve dans le milieu enrichi en tous les éléments : la quantité de chlorophylle atteint 65 µg/l en 6 jours (fig.16b). Toutes les valeurs maximales ont lieu après 5 à 6 jours de culture. La culture N + P croît également de façon importante, jusqu'à 55 µg/l de chlorophylle. En revanche, la culture P produit peu de chlorophylle. La teneur maximale est proche de 20 µg/l alors que le témoin produit jusqu'à 30 µg/l de chlorophylle dans le même temps. La culture N semble avoir une croissance favorable malgré une valeur aberrante le 6ème jour.

B. Marennes-Oléron

Toutes les courbes visualisent une croissance pendant les quatre premiers jours de culture (fig.16c). Au-delà, les teneurs en chlorophylle se stabilisent ou diminuent, seuls les milieux N + P + Si et N semblent produire encore de la chlorophylle. La dégénérescence de la chlorophylle dans la culture N + P + Si est particulièrement rapide puisque sa concentration passe de sa valeur maximum 55 µg/l à sa valeur minimum 10 µg/l en 1 jour. Cette chute est plus atténuée dans la culture N + P qui perd 35 µg/l en 6 jours. La culture N maintient une production de chlorophylle pratiquement constante tout au long de la manipulation. Ainsi l'apport d'azote paraît permettre une croissance plus longue, sans pour autant atteindre de fortes valeurs de chlorophylle.

2.3. Carbone et azote particulaire

A. Pertuis Breton

* Station C

Les graphes visualisant l'évolution de la teneur en carbone et azote organique ont une allure semblable. Les valeurs des trois premiers jours ne sont pas connues. On peut toutefois constater que la culture N + P + Si contient de fortes teneurs en carbone (16 mg/l) et azote (2 mg/l), qui ne diminuent qu'après 8 jours (fig.17). La culture N + P voit ses teneurs en éléments particuliers augmenter durant toute la manipulation jusqu'à 11 mg/l de carbone et 2 mg/l d'azote. En revanche les autres cultures perdent leur matière organique à partir du 3ème jour. Le rapport C/N proche de 10 le 4ème jour, excepté pour la culture T, diminue constamment et reste entre 5 et 10 tout au long de la manipulation. Il est donc probable que la population rajeunisse.

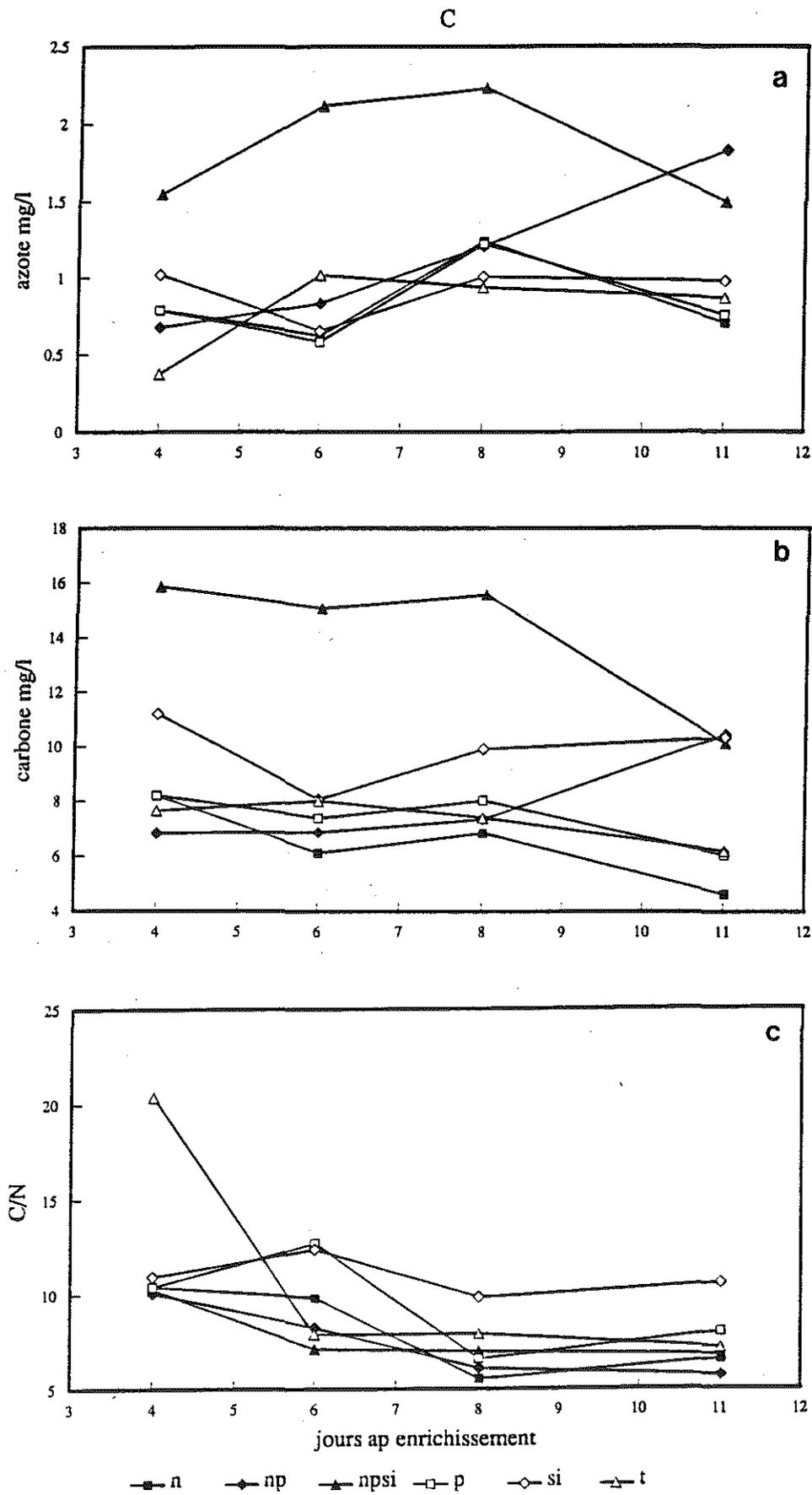


Fig. 17: Evolution a) de l'azote particulaire, b) du carbone particulaire, c) du rapport C/N, dans les eaux enrichies de la station C du Pertuis Breton.

* Station D

Les courbes représentant les cultures enrichies en azote, N, N + P, N + P + Si, suivent une évolution parallèle (fig.18). Les valeurs sont fortes au 4ème jour, elles diminuent jusqu'au 6ème jour, augmentent par la suite pour diminuer à nouveau à partir du 8ème jour.

Le témoin suit le même type d'évolution en azote alors que sa teneur en carbone diminue légèrement. En revanche, la culture P augmente régulièrement sa matière organique. Les rapports C/N suivent un même type d'évolution, ils augmentent jusqu'au 6ème jour où ils se situent tous au-delà de 10, excepté pour la culture N + P dont le rapport C/N ne dépasse pas 9, puis les rapports diminuent tous mais ne deviennent jamais inférieurs à 7.

B. Marennes-Oléron

L'évolution de la quantité de carbone organique et celle d'azote organique sont similaires. Les milieux N + P et N + P + Si produisent de la matière organique jusqu'au 5ème jour ; celle-ci disparaît ensuite et augmente le 9ème jour. La même évolution a lieu pour les milieux P, T Si avec toutefois des teneurs plus faibles. Les rapports C/N ont une évolution commune constante et supérieure à 7 jusqu'au 9ème jour, ils diminuent fortement ensuite pour arriver à une valeur comprise entre 2 et 4 (fig.19).

2.4. Analyse de la taille des particules

A. Pertuis Breton

*Station C

L'évolution du nombre de particules est similaire dans pratiquement toutes les cultures (fig.20). Il y a augmentation, plus ou moins importante, pendant quatre jours puis diminution régulière jusqu'à la fin. Le type d'évolution est différent pour la culture N+P dans laquelle la quantité de particules diminue régulièrement au long de la manipulation, bien qu'une légère augmentation soit intervenue le 8ème jour.

Le mode est très souvent déplacé vers des diamètres inférieurs, de 1 à 2 μm , puis retrouve sa valeur initiale, excepté dans le témoin où le mode diminue toujours. Dans les cultures P et N+P+Si le mode reste constant tout au long de l'expérience.

*Station D

Seule la culture N voit son nombre de particules augmenter sensiblement puis diminuer rapidement (fig.21). Dans les autres cultures, le nombre de particules diminue

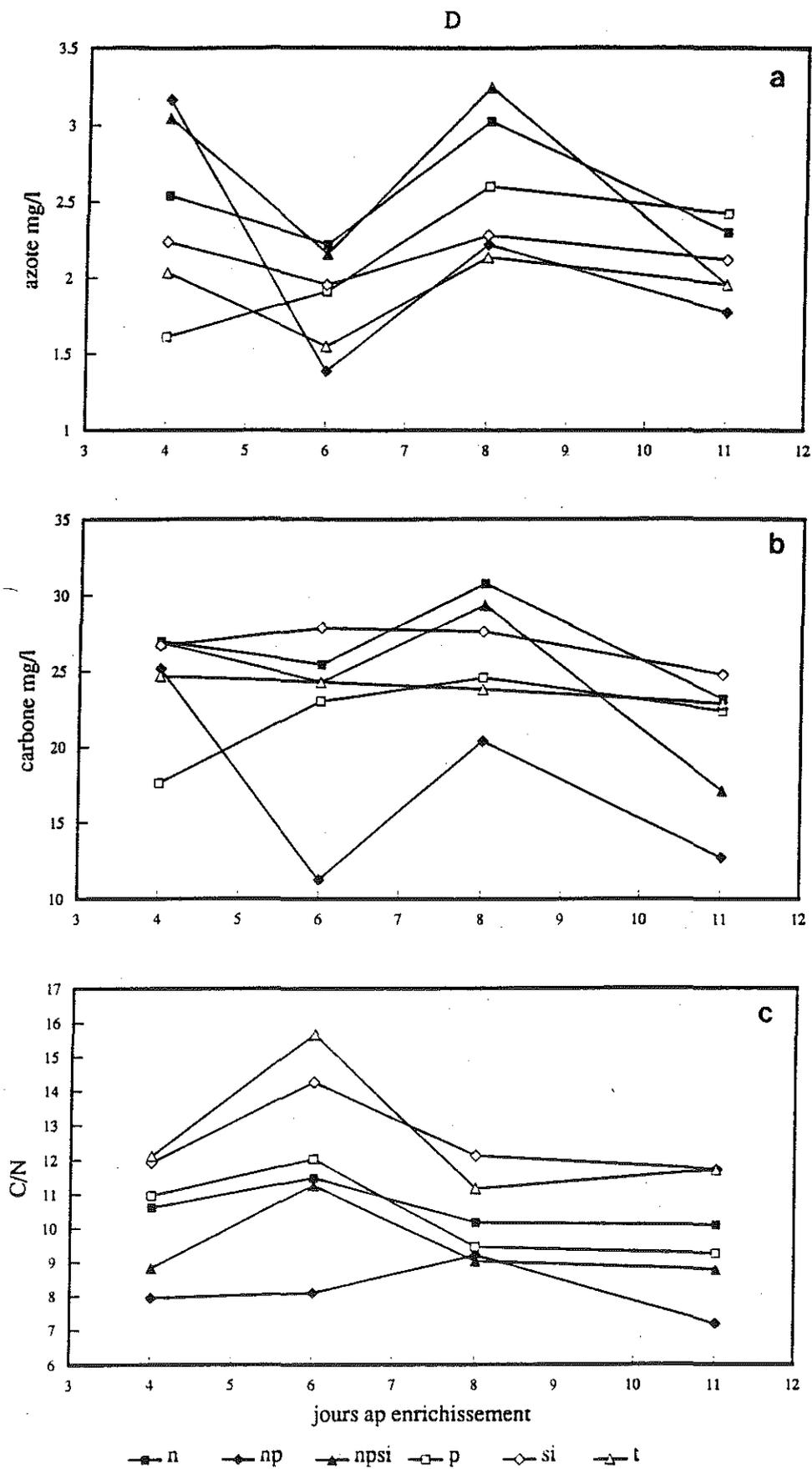


Fig. 18: Evolution a) de l'azote particulaire, b) du carbone particulaire, c) du rapport C/N, dans les eaux enrichies de la station D du Pertuis Breton.

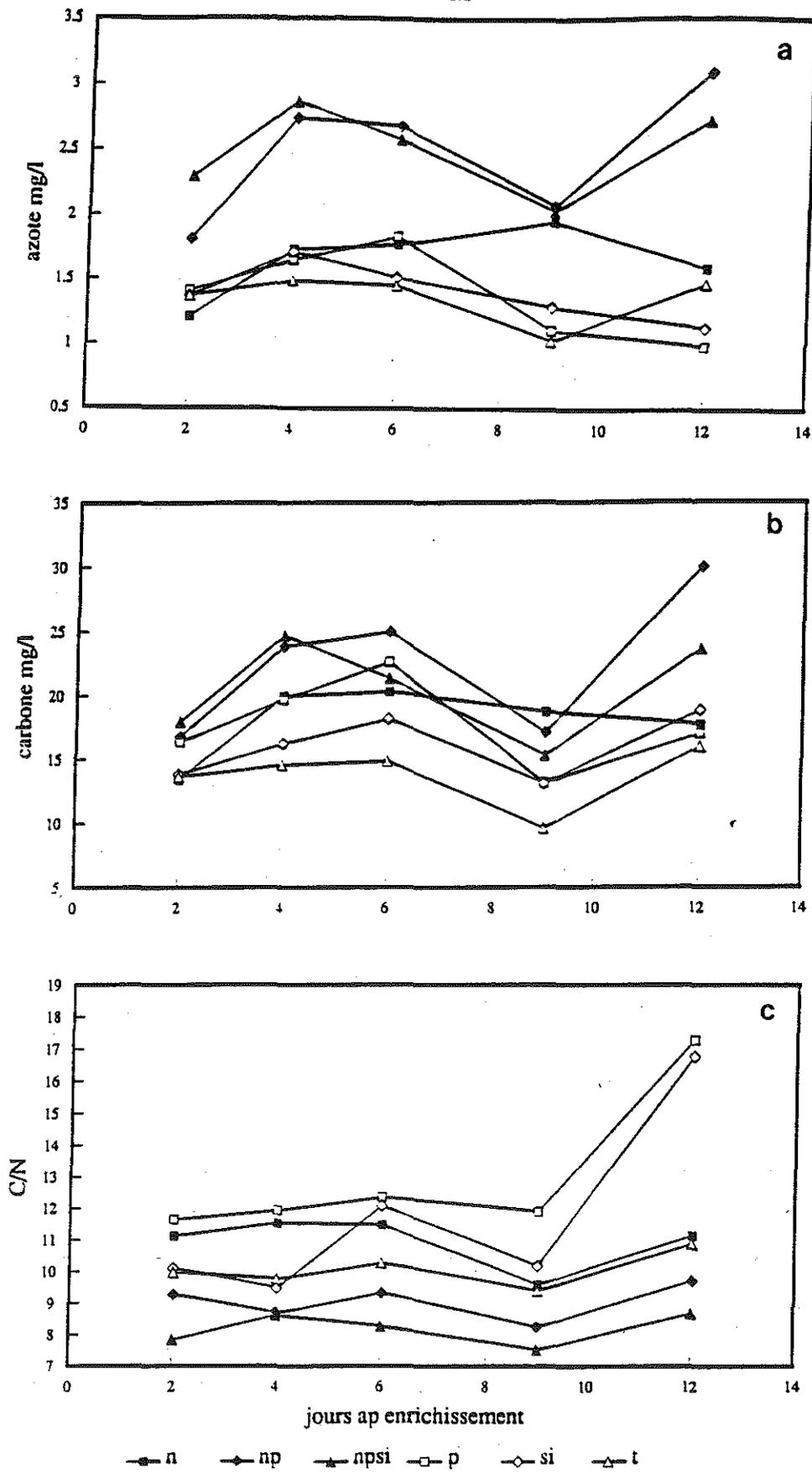


Fig. 19: Evolution a) de l'azote particulaire, b) du carbone particulaire, c) du rapport C/N, dans les eaux enrichies de Marennes-Oléron.

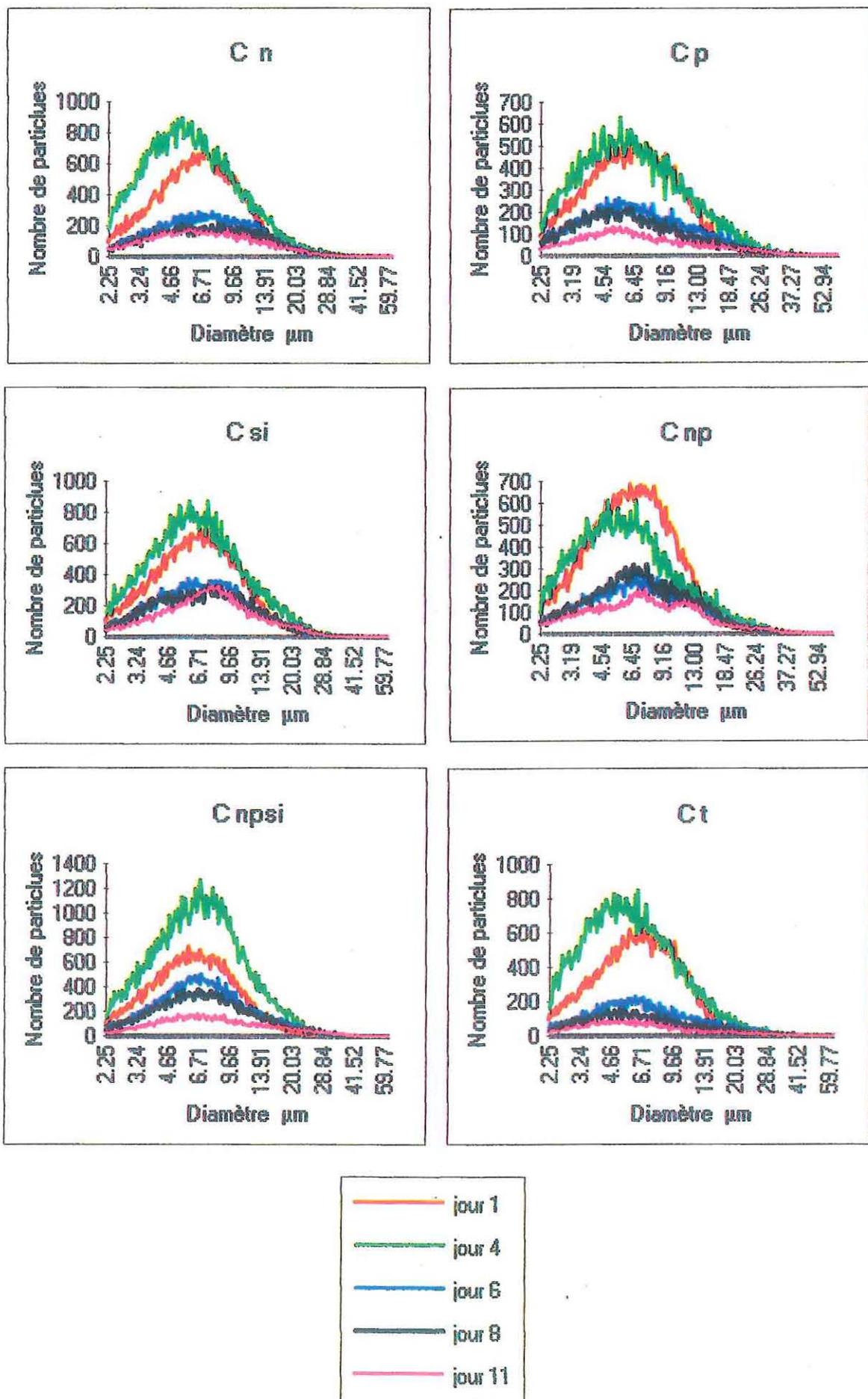


Fig. 20: Evolution temporelle de la répartition en classes de taille des particules observée dans chacun des enrichissements des eaux de la station C du Pertuis Breton.

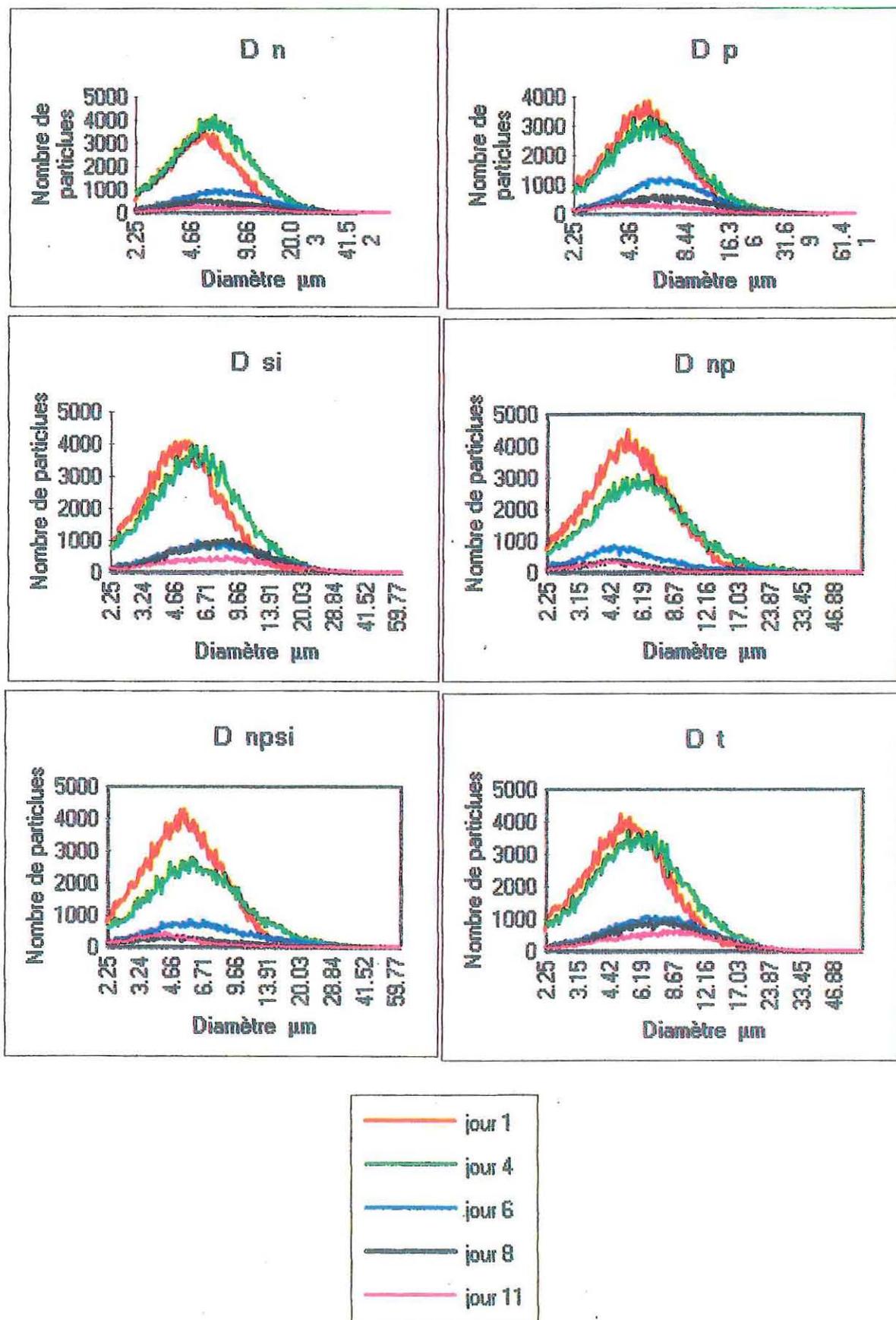


Fig. 21: Evolution temporelle de la répartition en classes de taille des particules observée dans chacun des enrichissements des eaux de la station D du Pertuis Breton.

régulièrement pendant l'expérience pour N+P, N+P+Si, P ou reste constant les quatre premiers jours et diminue par la suite pour Si et T.

L'évolution du mode est différente dans chaque culture. Les cultures N, P, Si, T, ont un mode qui augmente alors que les autres cultures voient la taille de leurs particules diminuer.

B. Marennes-Oléron

Tous les graphes présentent une très forte diminution du nombre de particules lors des 4 premiers jours de culture.

De même, les modes évoluent de la même façon : ils augmentent jusqu'au 6ème ou 8ème jour puis diminuent pour retrouver leur valeur initiale. Le mode le plus grand est obtenu dans la culture Si après 6 jours : 9,53 μm (fig22).

2.5. Culture pure de *Skeletonema costatum*

Seules des mesures quotidiennes de fluorescences ont été effectuées.

A. Pertuis Breton

***Station C**

On peut observer sur l'ensemble des graphes une forme d'évolution similaire (fig.23). En effet, un premier pic de chlorophylle apparaît dès le second jour de culture. Après une chute importante, une nouvelle augmentation de la fluorescence, généralement plus importante que la première, apparaît à partir du 8ème jour. Après observation des milieux à la cellule de Malassez, il apparaît qu'une seconde culture se soit mise en place. Le premier pic correspond donc bien à une culture de *Skeletonema costatum* mais le second montre une culture de phytoplancton différente dans chaque tube. Même les triplicats d'un même milieu ne présentent pas la même espèce de phytoplancton. Ainsi chaque tube contient une culture d'une, voire deux espèces différentes de diatomées ou péridiniens, ce qui explique les différences de fluorescence chez les triplicats lors du second pic. Mais l'étude de l'impact des enrichissements différentiels sur la culture de *Skeletonema costatum* est tout de même possible grâce au pic de fluorescence observé. Le premier pic de fluorescence est obtenu après 2 jours de culture, sauf dans les cultures Si et NPSi dans lesquelles il a lieu le 5ème jour. Le témoin a la valeur de fluorescence maximale la plus faible. Les cultures N, N + P et N + P + Si obtiennent une valeur légèrement supérieure. Les milieux enrichis P et Si produisent le pic le plus élevé. Comme précédemment, les graphes N + P et N + P + Si voient s'établir un "plateau" à la hauteur du pic, se prolongeant ainsi 3 jours.

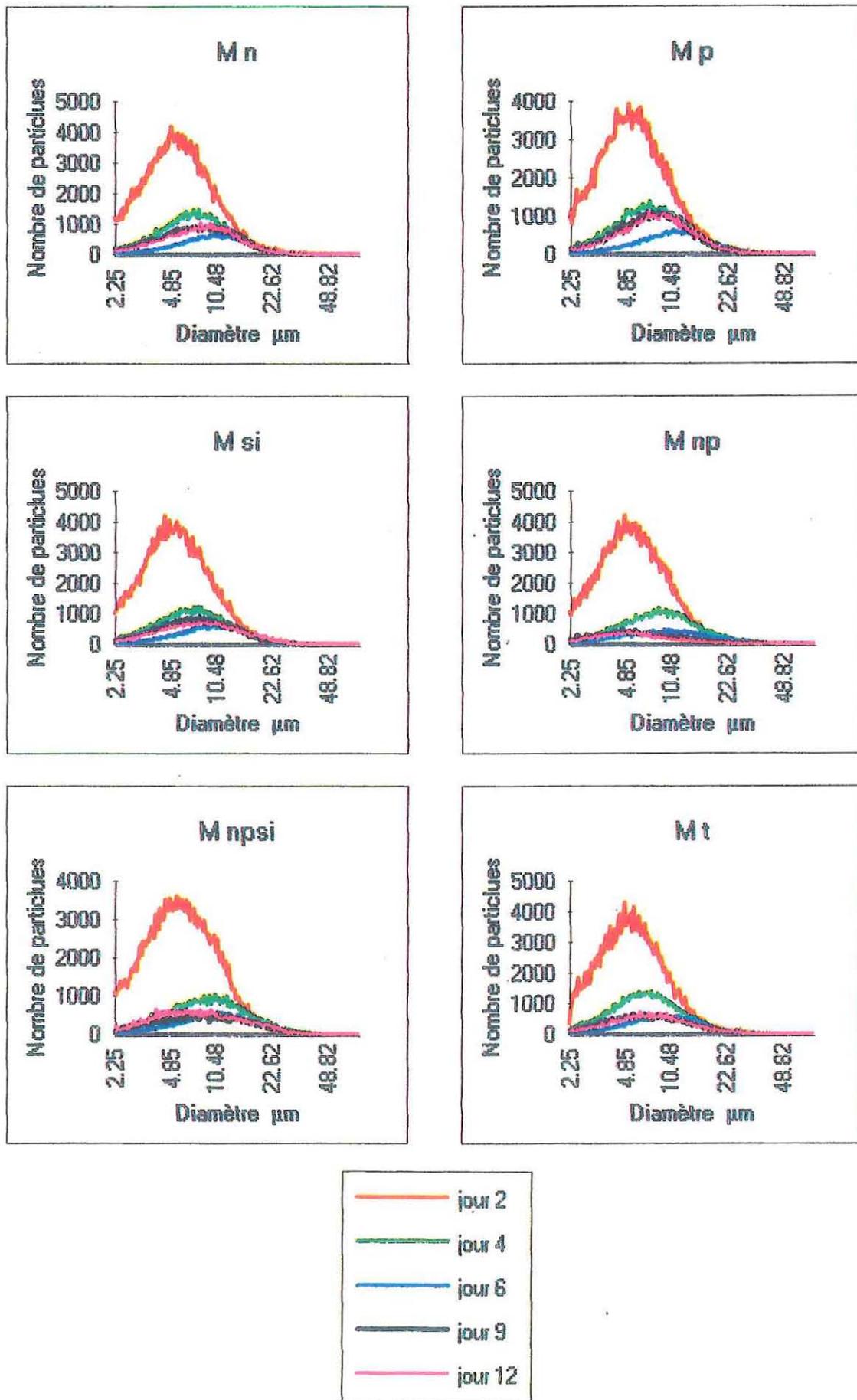
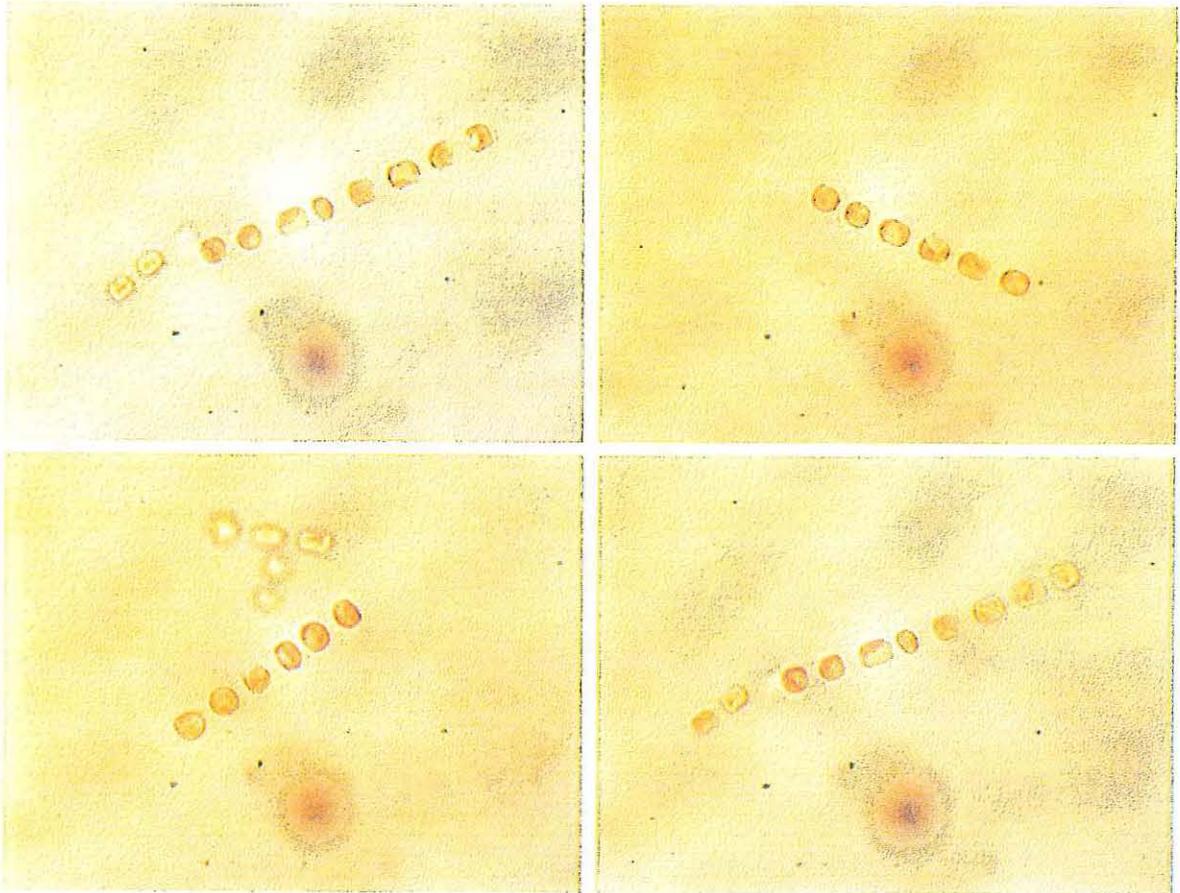


Fig. 22: Evolution temporelle de la répartition en classes de taille des particules observée dans chacun des enrichissements des eaux de Marennes-Oléron.



Skeletonema costatum

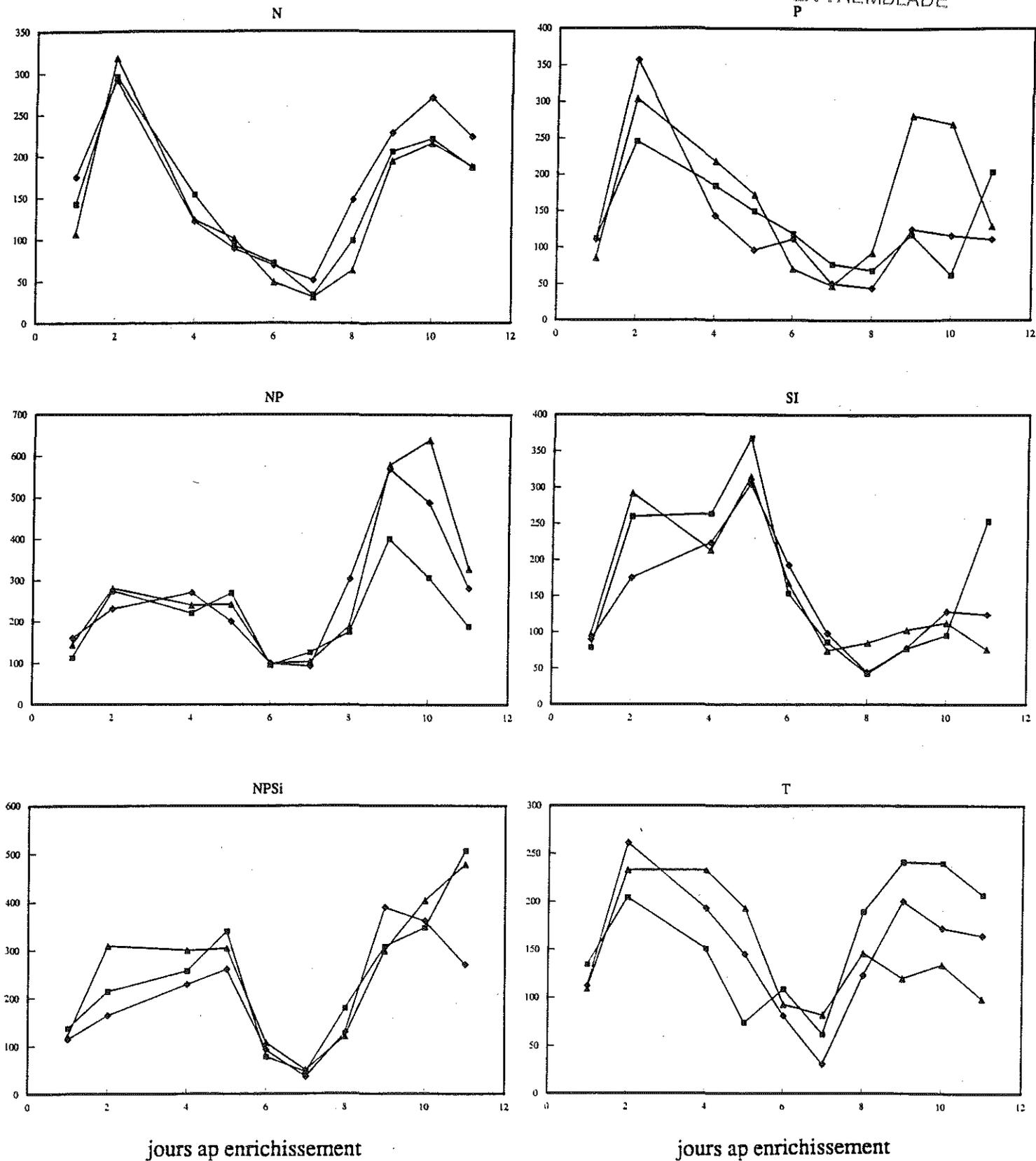


Fig. 23: Evolution de la fluorescence dans les cultures de *Skeletonema costatum* dans les eaux enrichies de la station C du Pertuis Breton.

*Station D

Le même type de pollution intervient dans les tubes d'eau de la station D (fig.24). On constate que les enrichissements N, Si et N + P obtiennent des valeurs de fluorescence maximum identiques à celles obtenues par le témoin. L'enrichissement en phosphore obtient, lui, des valeurs maximales proches de celles obtenues par N + P + Si. Toutefois cet enrichissement total permet la production de chlorophylle la plus importante, mais le pic n'a lieu qu'après 5 jours alors qu'il a lieu au bout de 2 jours dans les autres cultures. D'autre part, les cultures enrichies en azote N et N + P semblent obtenir des pics de fluorescence plus longs.

B. Marennes-Oléron

Dans l'eau de Marennes-Oléron, le pic de fluorescence correspondant au *Skeletonema costatum* est plus lent à s'établir que dans l'eau du Pertuis Breton : il a lieu, en moyenne, 3 à 4 jours après le début de la culture (fig.25). Les plus fortes valeurs de fluorescence sont obtenues par les cultures N + P et N + P + Si. N et P obtiennent des valeurs maximales proches et Si évolue de la même façon que le témoin.

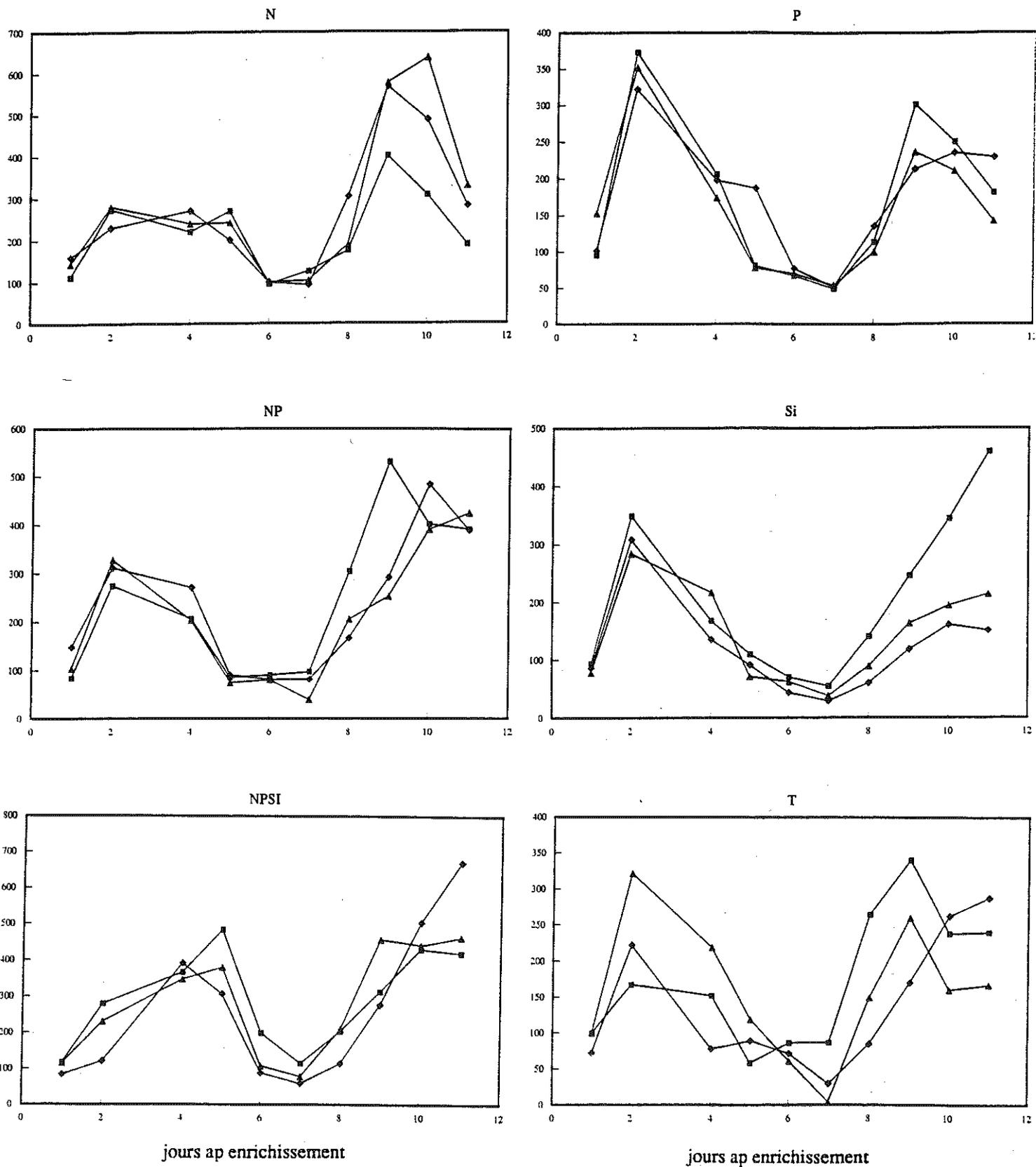


Fig. 24: Evolution de la fluorescence dans les cultures de *Skeletonema costatum* dans les eaux enrichies de la station D du Pertuis Breton.

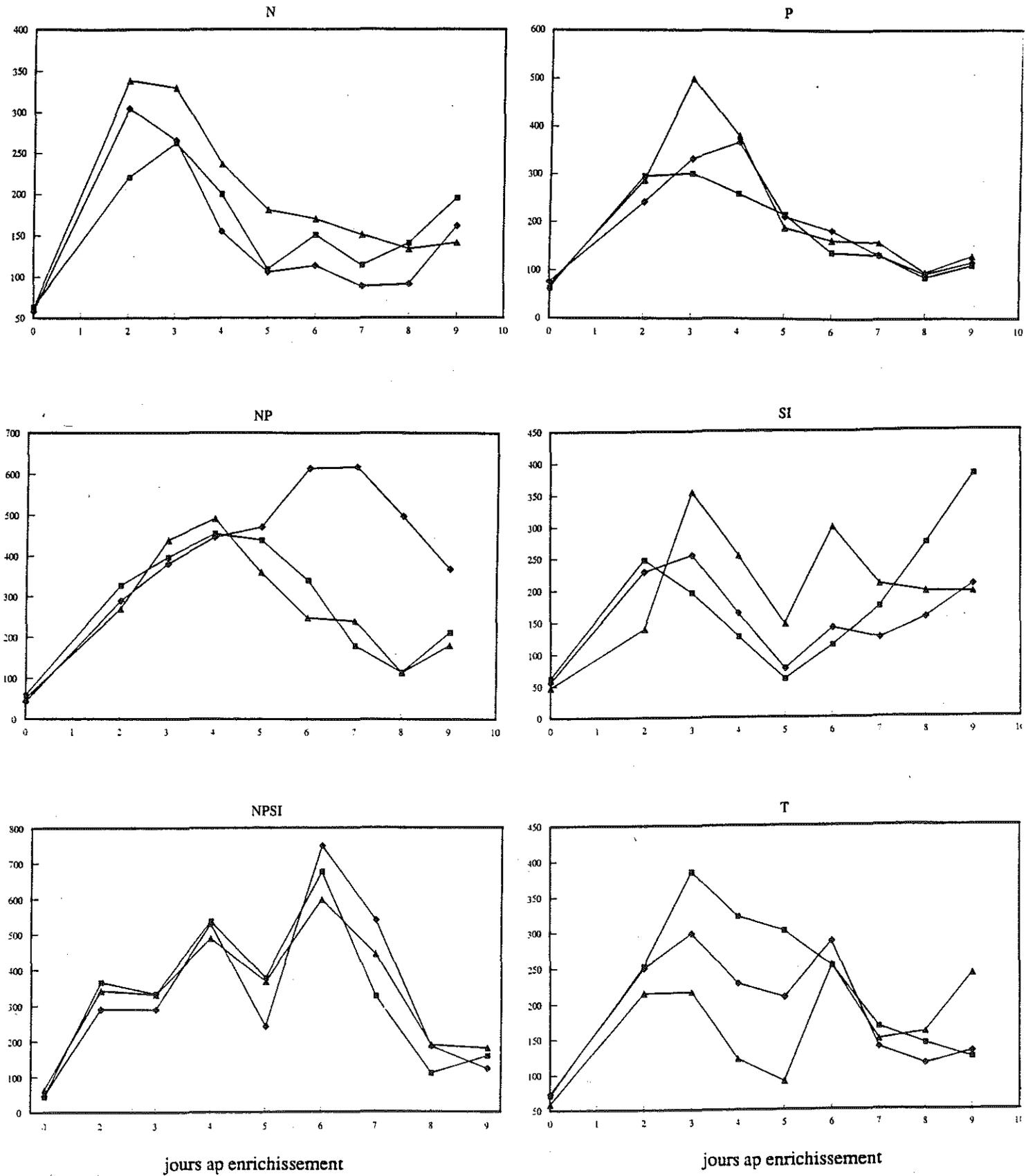


Fig. 25: Evolution de la fluorescence dans les cultures de *Skeletonema costatum* dans les eaux enrichies de Marennes-Oléron.

VI.DISCUSSION

1. Evolution des protocoles

Il est indéniable que les modifications apportées au premier protocole ont été favorables à la croissance du phytoplancton. En effet, la concentration du phytoplancton a permis de débiter la manipulation avec une teneur en chlorophylle cinq fois plus élevée que lors de la première expérimentation. En conséquence, la croissance phytoplanctonique débute dès le premier jour, évitant ainsi tout risque de dégénérescence éventuelle de la chlorophylle. L'absence de bullage de CO₂ a également favorisé ce démarrage rapide des cultures sensibles au faible pH. Enfin, les manipulations stériles ont pu éviter une contamination bactérienne ou algale trop importante.

2. Evolution des sels nutritifs

Un phénomène souvent remarqué sur les graphes représentant l'évolution des sels nutritifs, est la réapparition de sels après leur épuisement. Ce phénomène peut s'expliquer par une reminéralisation soit par voie directe (excrétion, sécrétion de substance minérale) soit par voie bactérienne. Pour le phosphore, le phytoplancton peut excréter une partie du phosphore organique qu'il produit (Kuenzler, 1970). De plus, dans les composés organiques, le phosphore reste souvent intègre dans un radical P₀₄. Ainsi le phosphore organique peut être rapidement reminéralisé par les phosphatases des cellules planctoniques ou bactériennes (Skopintser et Bruck, 1940).

L'azote peut également être reminéralisée soit par voie bactérienne, soit par régénération directe. Dans tous les cas, c'est à l'ion ammonium qu'aboutit la reminéralisation de l'azote. Celui-ci peut alors être oxydé en nitrites NO₂ puis en nitrates NO₃ (Bougis, 1976).

En revanche, le silicium, toujours sous forme minérale, ne peut pas se redissoudre dans l'eau rapidement car la silice dissoute, prélevée par le phytoplancton est utilisée pour l'élaboration du test siliceux des diatomées. Les augmentations subites parfois observées dans les échantillons prélevés après homogénéisation par brassage des ballons pourraient alors s'expliquer par la remise en suspension de tests de diatomées mortes qui ont sédimenté au fond du ballon.

3. Paramètres estimateurs de la biomasse

Le dosage de la quantité de chlorophylle semble être une bonne méthode d'évaluation de la biomasse phytoplanctonique. La comparaison de ces résultats avec l'évolution de la matière organique présente (carbone et azote) peut permettre la visualisation d'une contamination bactérienne. Puisqu'une augmentation de la quantité de matière organique sans production de chlorophylle correspond à la présence de cellules non phytoplanctoniques. D'autre part, le dosage de l'azote et du carbone particulaire permet d'évaluer l'état physiologique de la culture (en croissance, la quantité d'azote augmente résultant de l'augmentation de l'activité enzymatique ; elle diminue quand la culture dégénère).

La répartition en classe de taille des particules par le multisizer permet de visualiser le déplacement du mode, donne une idée de la structure de la population. Ainsi, l'addition de phosphore, beaucoup utilisé sous forme d'ATP par la cellule, devrait favoriser la division cellulaire et donc diminuer la taille des particules. La silice, au contraire, permet aux diatomées de renforcer et augmenter leur test siliceux et aboutir ainsi à des cellules de taille supérieure. De même, l'azote peut être stockée par la cellule sous forme de réserves protéiques.

Ces hypothèses ne sont pas toujours vérifiées par les mesures. D'autre part, le comptage des particules en suspension inclut le comptage des particules minérales, sédiments, détritiques et cellules mortes. Le résultat reste donc relatif et cet estimateur de la biomasse n'est pas adapté à un milieu très turbide. Ainsi les comptages avec l'eau du bassin de Marennes-Oléron ont mis en évidence une forte diminution du nombre de particules les premiers jours. Il est probable que l'eau de départ ait été beaucoup plus turbide, chargée de sédiments, que par la suite.

Les cultures étaient éclairées en permanence et la luminosité était suffisante tout en étant inférieure à la valeur de photoinhibition. De plus, la température était maintenue constante à 18°C. Ainsi toutes les conditions physiques optimales étaient réunies. On peut donc considérer que la production primaire dans les eaux étudiées n'était limitée que par les concentrations en éléments biogènes.

4. Effet des mélanges enrichissants

A. Pertuis Breton

Il apparaît tout d'abord que l'enrichissement des eaux du Pertuis Breton en N + P + Si est à l'origine d'une augmentation importante de la biomasse. Il semblerait d'autre part que la silice soit un élément important dans la croissance du phytoplancton. Cette constatation

n'est en rien surprenante puisque la population est presque exclusivement composée de diatomées siliceuses.

Dans les eaux de la station D, le pic chlorophyllien dans toutes les cultures a lieu le 5ème jour. La chute intervient donc les jours suivants avec la dégénérescence des cellules chlorophylliennes. Ceci est confirmé par les dosages de matière organique. Ainsi, une forte diminution de l'azote particulaire apparaît le 6ème jour, correspondant à la perte des enzymes et protéines de constitution lors de la mort des cellules. En revanche, la teneur en carbone particulaire se maintient ; en effet, les cellules mortes et les détritiques contiennent toujours le carbone particulaire qui ne se dissout pas. On constate à partir du jour 8 une augmentation de la matière organique, carbone et azote, sans production de chlorophylle. Cette apparition de cellules non chlorophylliennes peut alors correspondre à une prolifération bactérienne dans les ballons. Cette hypothèse peut être confirmée par les résultats des comptages cellulaires au multisizer. La présence d'un nombre important de particules inférieures à 2 µm dénoterait une multiplication bactérienne.

De plus, le rapport C/N, rendant compte de l'état physiologique de la culture, augmente le 6ème jour, lorsque la chlorophylle dégénère, et devient alors supérieur à 10, valeur correspondant à une population pauvre et âgée.

L'eau de la station D voit sa teneur en chlorophylle augmenter fortement par l'addition d'un enrichissement total et, à moindre mesure, par l'addition d'azote et de phosphore (N + P). En revanche, pour cette culture, le nombre de cellules diminue plus que dans le témoin. Alors que l'addition d'azote seul permet une légère augmentation de la densité cellulaire et une assez bonne production de chlorophylle.

L'enrichissement en phosphore ne paraît pas favoriser la production de chlorophylle puisqu'en effet celle-ci est inférieure à celle du témoin. Toutefois, le nombre de particules évolue peu. D'autre part, la matière organique dans cette culture augmente régulièrement. Il est alors possible qu'une contamination bactérienne intervienne, produisant de la matière organique mais pas de chlorophylle.

Il semblerait donc que l'eau de la station D devienne un peu plus fertile lorsqu'elle est enrichie avec de l'azote. Mais la production primaire la plus importante est obtenue avec l'enrichissement total.

L'eau de la station C présente aussi une assez bonne corrélation entre la production de chlorophylle et celle de matière organique. L'eau de la station C subit une forte augmentation de la concentration en chlorophylle lorsqu'elle est enrichie en N + P + Si. La densité cellulaire suit la même évolution et une grande quantité d'azote et de carbone particuliers est produite.

En revanche, l'enrichissement N + P ne semble pas favoriser la production de chlorophylle les premiers jours. De la même façon, la quantité de particules en suspension diminue. Toutefois, il apparaît d'après les dosages de la matière organique, qu'une production d'azote et de carbone débute dans cette culture vers le 5ème jour. Il est alors possible que cette culture ait subi un ralentissement de la croissance. Celui-ci peut alors être dû à un phénomène extérieur incontrôlable.

L'addition de phosphore seul permet une production de chlorophylle un peu supérieure à celle du témoin, mais n'augmente pas de façon significative le nombre de cellules. Pourtant la quantité de carbone organique est relativement supérieure à celle contenue dans la culture N ou N + P.

Mais étant donné la légère déficience de l'eau en silicium, il est possible que l'addition de phosphore seul ne suffise pas à augmenter notablement la biomasse.

L'azote n'est apparemment pas l'élément nécessaire à l'enrichissement de cette eau puisqu'il ne favorise en rien la production de chlorophylle ou de carbone organique. Le nombre de particules augmente pourtant mais cela ne semble pas correspondre à une production de nouvelles cellules puisque le même jour, la quantité de carbone particulaire diminue.

Ainsi, si un enrichissement total est le plus favorable à la production primaire, il semblerait que l'eau dans laquelle sont placées les filières soit quelque peu déficiente en phosphore, la silice apparaît également comme un élément limitant mais la composition de la population explique ce résultat.

On peut toutefois observer, d'après les résultats obtenus pour les cultures de *Skeletonema costatum* que le milieu nécessitait à la fois du phosphore et de l'azote, puisque les cultures étaient équivalentes avec l'apport de l'un ou l'autre de ces éléments.

B. Marennes-Oléron

L'eau du bassin de Marennes-Oléron apparaît, en premier lieu, très turbide. Les problèmes de comptage du multisizer en milieu turbide ont déjà été évoqués. Les résultats du second jour semblent être plus proches du nombre effectif de cellules phytoplanctoniques.

La teneur en chlorophylle la plus importante est constatée dans la culture N + P + Si, obtenue le 5ème jour, un pic d'azote et de carbone organique a également lieu.

La disparition des cellules chlorophylliennes est brutale et accompagnée d'une diminution de la matière organique. De plus, le nombre de particule se trouve également diminué.

L'enrichissement N + P suit le même type d'évolution que la culture précédente sans toutefois atteindre une aussi forte valeur de chlorophylle. La quantité d'azote et de carbone particulaire atteint une valeur maximum proche de celle de la culture N + P + Si.

Parmi les enrichissements en éléments simples, l'enrichissement en azote semble obtenir la meilleure production primaire. En effet, la teneur en chlorophylle se maintient pendant 10 jours et de la même façon, la matière organique ne cesse d'augmenter progressivement. Le nombre de particules, après une légère diminution, augmente parallèlement aux autres paramètres.

L'addition de phosphore ne semble pas convenir à l'eau du bassin de Marennes-Oléron puisque la production chlorophyllienne obtenue est très faible. En revanche, la quantité de matière organique produite n'est pas négligeable. Elle est en effet supérieure à celle produite par le témoin alors que les chlorophylles donnent des résultats inverses.

Il peut alors s'agir d'une contamination bactérienne aboutissant à une production de matière organique mais pas de chlorophylle. Le rapport C/N est d'ailleurs constamment supérieur à 12, le phytoplancton n'est donc pas en croissance.

VII. CONCLUSION

D'après les résultats issus de la première expérimentation, dans le Pertuis Breton, la silice semble indispensable puisque la culture enrichie en N+P ne pousse pas et que la culture Si a une croissance supérieure à celle du témoin. Cependant, l'association d'azote, de phosphore et de silice conduit à une production de chlorophylle et de matière organique très supérieure à celle des cultures. Il semblerait donc que les sels nutritifs limitant la production primaire soient une combinaison NSi ou PSi.

Les eaux du bassin de Marennes-Oléron sont également rendues plus fertiles par l'addition de l'enrichissement total. Il est difficile de dégager un élément limitant la production primaire puisque les cultures ont très peu poussé et une des croissances les plus remarquables est celle du témoin.

Il est donc visible que la première expérimentation n'a pas abouti à des résultats satisfaisants puisque ceux-ci restent très approximatifs. Ainsi les modifications apportées au second protocole ont permis une lecture plus sûre des résultats.

Il a été possible de dégager, à l'issue de la seconde manipulation, un ou plusieurs éléments limitant la production primaire des eaux, à cette période.

Dans le Pertuis Breton, à la station C, proche des filières, l'enrichissement total permet la production phytoplanctonique la plus importante mais l'apport conjugué d'azote et de phosphore ne favorise pas cette croissance tandis que l'on obtient une augmentation de biomasse nettement supérieure avec la silice seule. La croissance du phytoplancton serait donc limitée par la silice puis par le phosphore ce qui confirme une partie des résultats précédemment observés.

L'eau de la station D du Pertuis Breton réagit de façon différente puisque l'azote apparaît être un élément indispensable alors que le phosphore n'apporte aucun enrichissement de l'eau.

Enfin, dans l'eau du bassin de Marennes-Oléron, l'addition d'azote semble favoriser la croissance du phytoplancton.

Cependant tous ces résultats sont fortement liés à la situation écologique du milieu pendant la période des prélèvements. Ainsi, la diversité des éléments limitants est accentuée par la variété des situations écologiques rencontrées lors d'un cycle annuel.

Il serait alors intéressant de renouveler cette expérience d'enrichissements artificiels à la fin de l'été. C'est en effet à cette période que la teneur en sels minéraux est la plus faible. Le véritable élément limitant serait mis en évidence de façon plus remarquable.

Il faudrait alors tenir compte des améliorations apportées au protocole lors de la seconde expérimentation. Il est préférable de favoriser une croissance importante dès le début de l'expérience par concentration du phytoplancton et par la suppression du bullage de CO₂ qui abaissait fortement le pH. Le travail de façon stérile a permis d'éviter une prolifération

de contaminants; les sels nutritifs, mieux dissous, ont été immédiatement disponibles pour le phytoplancton. Enfin, l'absence de période de mise en équilibre thermique rapproche les cultures étudiés du milieu naturel.

D'autre part, de nouvelles modifications pourraient être apportées au protocole expérimental. Il serait judicieux de réaliser un enrichissement N+Si et P+Si avec les eaux du Pertuis Breton.

De plus, certaines méthodes d'évaluation de la biomasse paraissent inutiles ou procurent des résultats peu fiables. La détermination du rapport C/N, par exemple, apporte peu d'informations, de même les données du multisizer sont à traiter avec prudence. En revanche, la mesure directe de la fluorescence, étant bien corrélée avec la quantité de chlorophylle dosée, est un bon estimateur de l'évolution phytoplanctonique. Associée à l'évolution des teneurs en sels minéraux, elle permet un bon suivi de la croissance.

BIBLIOGRAPHIE

- Bendschneider K. & Robinson R.L.** 1952 - A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, **11**: 87-96.
- Berland B. R., Bonin D. J. & Maestrini S. Y.**, 1978 - Facteur limitant de la production primaire des eaux oligotrophe d'une aire cotière méditerranéenne (calanque d'En-Vaux). *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, **63**, (4) : 501-531.
- Bougis P.**, 1974 - Ecologie du plancton marin, *ed. Masson*, **1**, 1 - 195.
- Collos Y. & Mornet F.**, 1993 - Automated procedure for determination of dissolved organic nitrogen and phosphorus in aquatic environments. *Mar. Biol.* **116** : 685-688.
- Fiala M., Gahet G., Jacques G., Neveux J. & Panouse M.**, 1976 - Fertilisation de communautés phytoplanctoniques. I cas d'un milieu oligotrophe : Méditerranée nord-occidentale. *J. Exp. Mar. Ecol.* **24** : 151-163.
- Grasshoff K.** 1976 - Determination of nitrate in method of sea water analysis. *K. Grasshoff (ed). Verlag Chemie Weinheim RFA* 137-145.
- Koroleff F.** 1969 - Direct determination of ammonia in natural water as indophenol blue *ICES, C.M. Hydr. Comm.*
- Kuenzler E. J. & Perras J.P.**, 1965 - Phosphatases of marine algae. *Biol Bull.* **128**, 271-284.
- Lemasson L., Cremoux J.L. & Montel Y.**, 1977 - Analyse des rapports C/N/P du seston dans la partie orientale de l'Atlantique équatoriale. *Mar. Chem.* **5** (2) : 171-181.
- Lorenzen C.J.** 1966 - A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.* **13** : 223-227.
- Mullin J.B. & Rilley J.P.** 1955 - The spectrophotometric determination of silicate-silicon in natural water with special reference to sea water. *Anal. Chim. Acta* **12** : 162-170.
- Murphy J. & Rilley J.P.** 1962 - A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal. Chim. Acta* **27** : 31-36.
- Parsons T.R., Stephens K. & Strickland J.D.H.**, 1961 - On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bull. Canad.* **18** : 1001-1016.
- Robert J.M., Maestrini S.Y., Héral M., Rince V., Dreno J.P. & Beker L.**, 1982 - Enrichissement expérimental d'eaux printanières de claires à huitre en baie de Bourgneuf (Vendée France). Augmentation de la biomasse et utilisation des éléments nutritifs par les algues unicellulaires. *Hydrobiol.* **96** : 53-63.
- Skopintsev B.A. & Bruck E.S.**, 1940 - Contribution of the study of regeneration of nitrogen and phosphorus compounds in the course of decomposition of the dead plankton. *C.R. (Doklady) Acad. Sci. U.R.S.S.*, **25** : 807-810.
- Strickland J. D. H. & Parsons T.R.**, 1968 - A practical handbook of sea water analysis. *Bull. Fish. Bd. Can.*, **167**: 1-311.
- Yentsch C.S. & Menzel D.W.**, 1963 - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, **10** : 221-231.

Implantation de l'AFREMER

Métropole

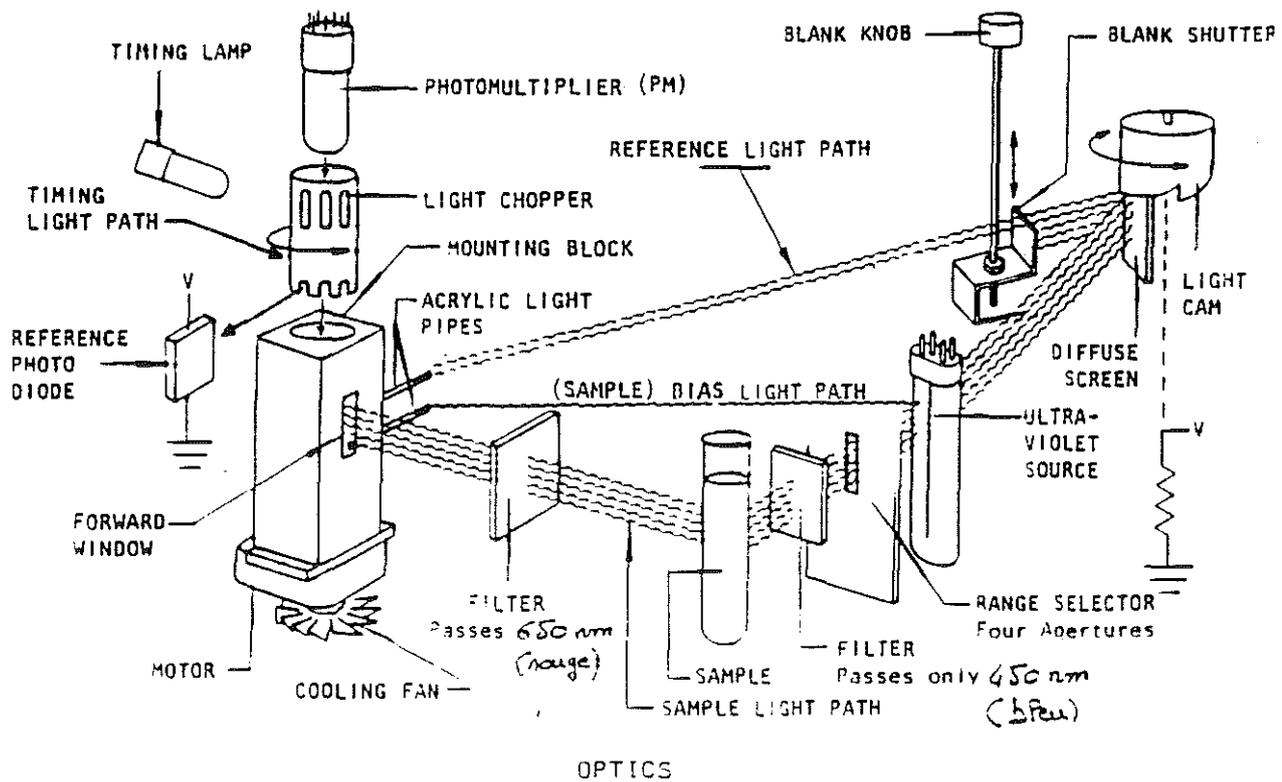


- ▾ ■ ▲ ◆ Centres
- ▾ ■ ▲ Stations rattachées
- Délégations

Outre-Mer



SCHEMA DE PRINCIPE
DU FLUORIMETRE TURNER MODEL 112



Le principe général du fluorimètre Turner model 112 repose sur l'**excitation** d'une substance fluorescente par une source lumineuse et la mesure de son **émission**. Ici, une solution acétonique de chlorophylle, dont la longueur d'onde d'excitation se situe dans le **bleu**. La source lumineuse excitant dans l'ultra violet ($>250\text{nm}$), on intercale un filtre d'arrêt afin d'obtenir un faisceau monochromatique de 450 nm. La chlorophylle excitée émet dans le **rouge**; un filtre d'arrêt à 650 nm est placé dans le faisceau afin de mesurer précisément l'émission.

ANNEXE III

DOSAGE DES CHLOROPHYLLES

ETALONNAGE DE L'APPAREIL

On filtre sur filtre Watman GFC (diamètre 47 mm) 4 litres d'eau de mer afin d'obtenir, après broyage dans 20 cm³ d'acétone une densité optique de l'ordre de [0,300 - 0,400] avec une cuve de 5 cm de trajet optique.

Nous avons ainsi une solution acétonique de chlorophylle a dont on va connaître assez précisément la concentration en appliquant la loi de LORENZEN. Nous pourrons de plus en déduire la concentration en phéopigment a

$$[\text{Chlo a}] = (26,7 (\text{DO } 665\text{a} - \text{DO } 750\text{a}) - (\text{DO } 665\text{b} - \text{DO } 750\text{b})) / L$$

Résultats exprimés en μg de Chlo a / cm³ d'acétone

$$[\text{Pheo a}] = (26,7 (1,7 (\text{DO } 665\text{b} - \text{DO } 750\text{b}) - (\text{DO } 665\text{a} - \text{DO } 750\text{a}))) / L$$

Résultats exprimés en μg de Pheo a / cm³ d'acétone

Avec : L = 5 cm : trajet optique

DO 665 a, DO 665b : Absorbance à 665 nm avant et après acidification par agent de 100 μl d'acide chlorhydrique normal.

DO 750 a, DO 750 b : Absorbance à 750 nm avant et après acidification suivant le même protocole que précédemment.

Cette solution de chlorophylle a sera aussi mesurée au fluorimètre après dilution, de façon à obtenir une fluorescence aussi proche que possible du maximum.

On aura donc :

Fa : fluorescence avant acidification

Fb : fluorescence après acidification

Ici l'acidification correspond à un ajout de 50 μ l d'acide chlorhydrique normal.

Sachant que :

$$[\text{Chlo a}]/Z = (F.r / r-1) (F_a - F_b)$$

Résultats en μ g de chlo a/ cm^3 d'acétone

$$[\text{Pheo a}]/Z = (F.r / r-1) (rF_b - F_a)$$

Résultats en μ g de pheo a/ cm^3 d'acétone

F est une constante du photomultiplicateur

r est une constante du dosage liée à la lampe

L'ordre de grandeur de r est F_a/F_b mais pas égal à F_a/F_b

CALCULS DE F ET r

Nous nous permettons d'affirmer que le rapport $[\text{Chlo a}] / [\text{Pheo a}]$ est constant quelque soit le facteur de dilution, à savoir :

$$[\text{Chlo a}] / [\text{Pheo a}] = ([\text{Chlo a}] / Z) / (\text{Pheo a} / Z) = Q$$

Cette équation théoriquement évidente est inexacte dans la pratique, mais nécessaire à l'obtention d'un système de deux équations à deux inconnues.

On obtient alors :

$$(Fr/r-1) (F_a - F_b) = Q (F.r/r-1) (r.F_b - F_a)$$

$$F_a - F_b = Q (r.F_b - F_a)$$

$$Qr F_b = F_a (Q+1) - cF_b$$

$$\text{D'où } r = (F_a (Q+1) - F_b) / Q F_b$$

On remplace r par sa valeur dans une des équations $[\text{Chlo a}]$ ou $[\text{Pheo a}]$ et on en déduit F.

Soit $r = 2.19654$
 $F = 2.2 \cdot 10^{-4}$

PROTOCOLE DE DOSAGE

- Broyage des filtres dans tubes à hémolyse après ajout de 5cm^3 d'acétone à 90 %
- 4 heures d'extraction au réfrigérateur
- centrifugation à 3000 tours/minute pendant 10 minutes
- lecture de la fluorescence du surnageant dont on tire

Fa

Fb (après acidification par $50 \mu\text{l}$ d'acide chlorhydrique normal

On en déduit :

$$[\text{Chlo a}] = (F \cdot r) / (r - 1) (F_a - F_b) \times V_a / V_F \times 1000$$

résultats exprimés en μg de chlorophylle a d'eau de mer

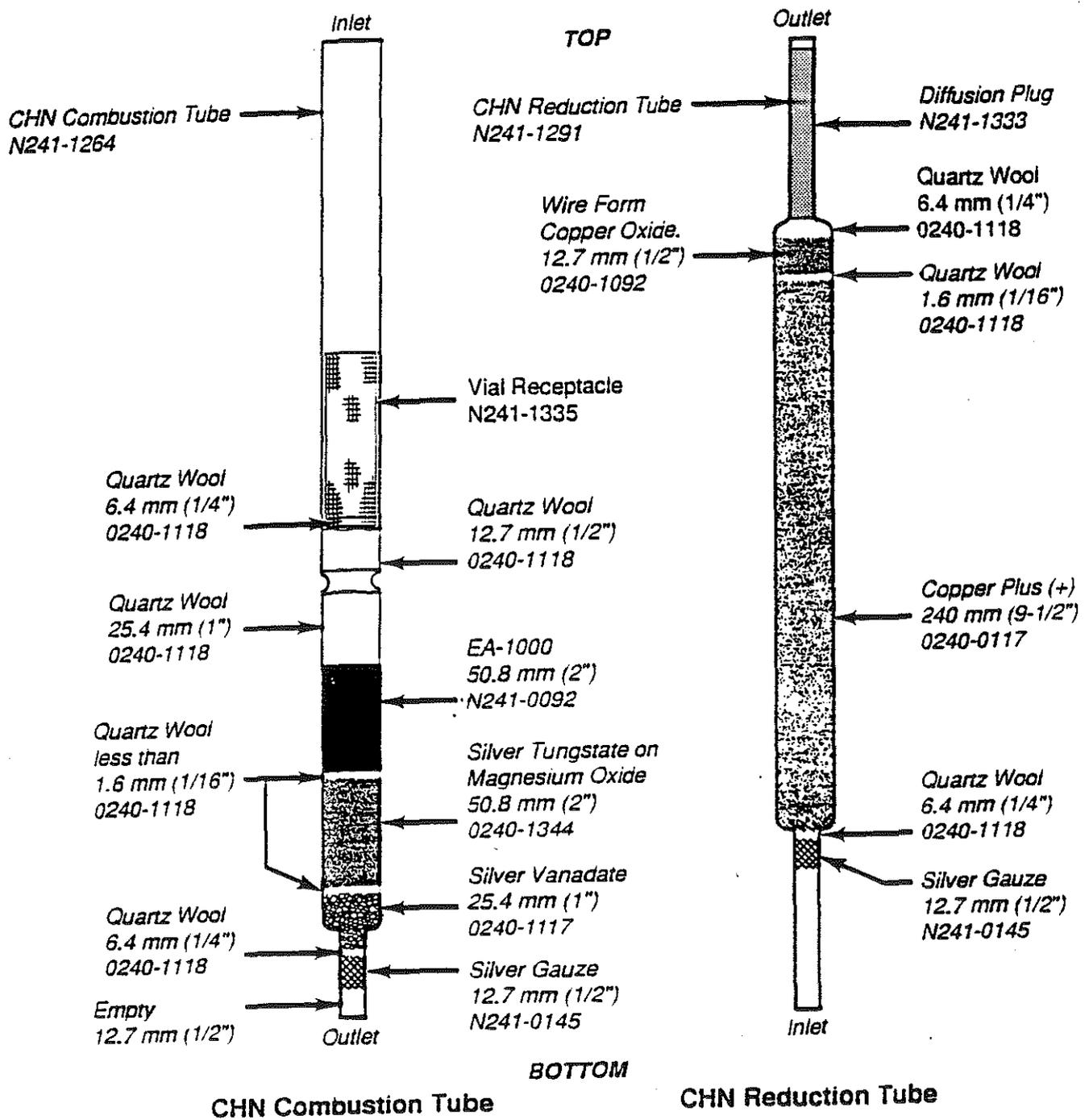
$$[\text{Pheo a}] = (F \cdot r) / (r - 1) (r F_b - F_a) \times V_a / V_F \times 1000$$

résultats exprimés en μg de Pheo a d'eau de mer

avec V_a = volume d'acétone en cm^3

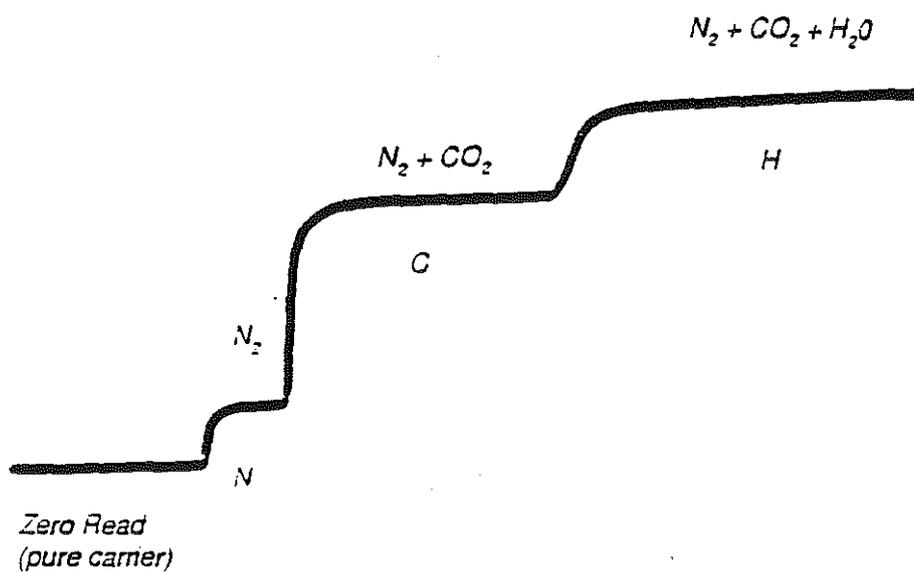
V_F = volume d'eau de mer en cm^3

ANNEXE IV



CHN combustion tube and reduction tube.

ANNEXE V

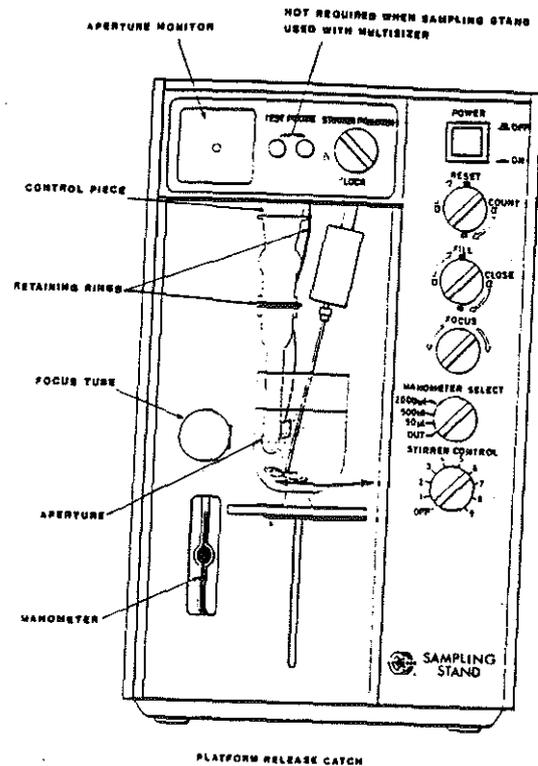


Separation of gases for CHN determinations.

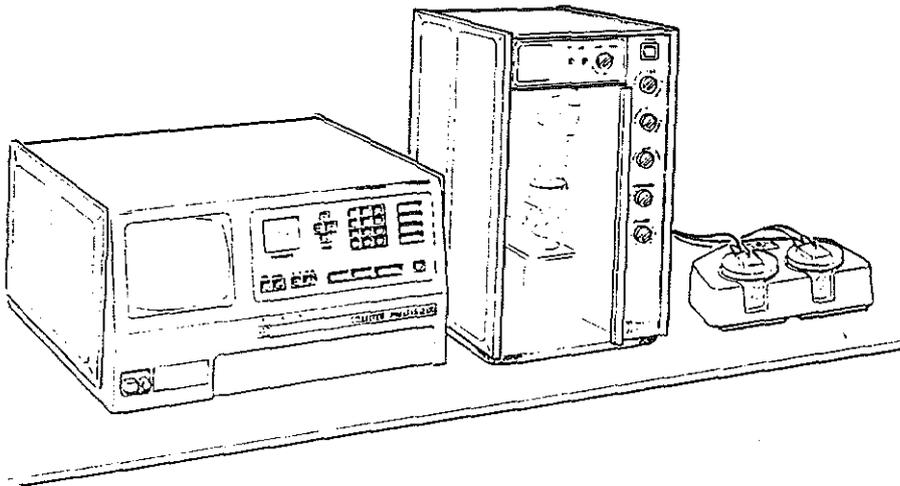
In Figure 1, the nitrogen signal equals the difference between the Nitrogen Read and Zero Read; the Carbon Signal equals the Carbon Read minus the Nitrogen Read; the Hydrogen Signal equals the Hydrogen Read minus the Carbon Read.

ANNEXE VI

Coulter[®] Multisizer (Coulter Electronics Limited)



SAMPLING STAND FRONT VIEW



MULTISIZER GENERAL VIEW

FUNCTION

The Coulter[®] Multisizer is a flexible, multichannel, particle size analyser, which employs the Coulter[®] electrical impedance method to provide a particle size distribution analysis within the overall range 0.4µm to 1200µm.

Each result is displayed graphically as a percentage of channel content, which can be selected to represent either volume (weight), number (population) or surface area, in either differential or cumulative form.

Full range accumulation can be selected to cover either 10, 32, 64, 128 or 256 size channels and additional accumulations can then be performed, using this same range of channels, over two successively smaller size ranges, thus giving very high resolution. Two on-screen cursors, positioned by the operator, set the upper and lower limits for this latter facility called windowing.

Numerical data, which is displayed alongside the graphics displays, includes: total raw count; total coincidence corrected count; total channelized count between the upper and lower cursors; upper and lower channel number, with equivalent size; time taken for accumulation and, whilst the sample is being aspirated, an indicator of the concentration of the sample being analysed.

The instrument, illustrated in Fig. 1-1, comprises a Sampling Stand, with its associated Vacuum Control Unit and the main electronics unit, which has provision for connecting an optional X/Y plotter, Data Terminal and Video Printer, thus allowing hard copy to be made of any display.