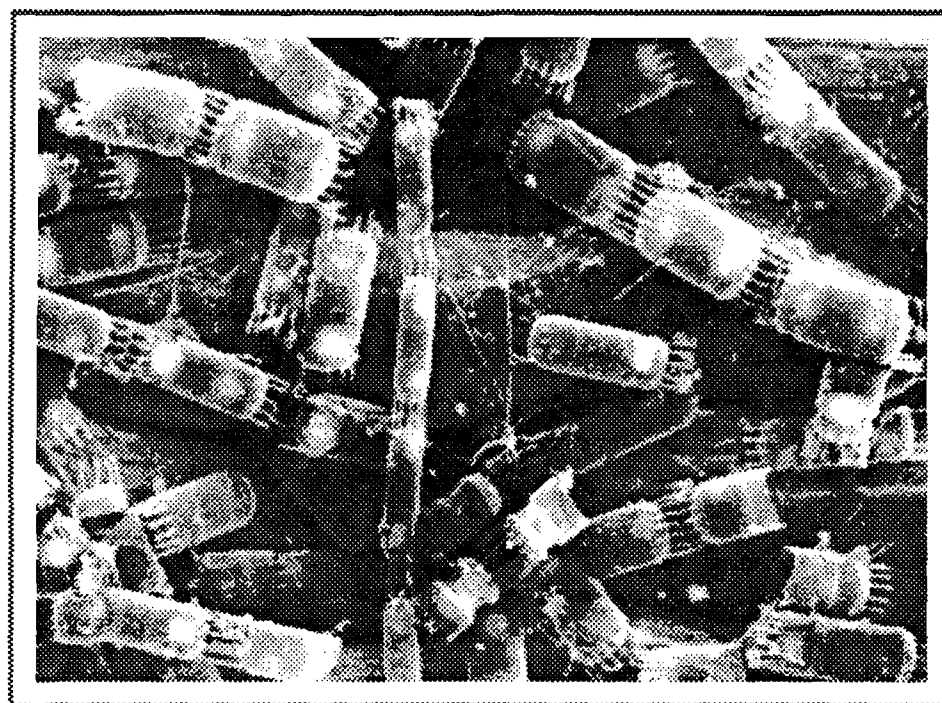


# PREMIERS ESSAIS AUTOMNAUX DE CULTURE DE DIATOMEES EN MASSE (24m<sup>3</sup>) SUR EAU DE MER FERTILISEE (N/P/Si)

Culture sans ensemencement et conditions limitantes

Jérôme HUSSENOT et Nicolas BROSSARD



© Sauriau



INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

Adresse  
Centre de Recherche en Ecologie Marine  
et Aquaculture de l'Houmeau  
CREMA BP 5 17137 L'HOUMEAU

DIRECTION DES RESSOURCES  
VIVANTES  
DEPARTEMENT DES RESSOURCES  
AQUACOLES  
LABORATOIRE CREMA L'HOUMEAU (CNRS-IFREMER)

AUTEUR (S) Jérôme HUSSENOT & Nicolas BROSSARD		CODE : RI. DRV 95.02
TITRE : <b>Premiers essais automnaux de culture en masse (24m3) de diatomées sur eau de mer fertilisée en N, P, Si.</b> <b>Culture sans ensemencement initial et conditions limitantes.</b>		Date : janvier 1995 Tirage en nombre : 80
		Nb pages 48 Nb figures : 17 Nb annexes : 2
CONTRAT Région Poitou-Charentes Année 1994.	DIFFUSION libre <input type="checkbox"/> restreinte <input checked="" type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>	

RESUME	
<p>Le document décrit les expériences menées sur le site expérimental du CREMA pour mettre au point des stratégies de cultures en masse de diatomées, dans le but d'apporter une nourriture complémentaire aux huîtres durant la période automnale d'affinage. La croissance des microalgues a été lente comparativement aux essais printaniers. A chaque essai l'orientation s'est faite vers <i>Skeletonema costatum</i>. Une expérience de laboratoire a permis de constater que le fer est un élément limitant dans nos cultures d'automne, qui réduit la quantité de chlorophylle <i>a</i> présente dans la cellule. D'après des tests <i>in vitro</i>, il apparaît possible d'utiliser avec la même efficacité du fer sous forme de solution industrielle de perchlorure, plutôt qu'un fer séchétrène chélaté beaucoup plus coûteux.</p>	
ABSTRACT	
<p>This report reviews CREMA experiments carried out in the field to improve semi-continuous mass culture of diatoms to feed oysters in refining ponds at the autumnal period. The growth rate is low, owing to low irradiance level. At each trial, diatoms development led to the dominant species <i>Skeletonema costatum</i>. A laboratory experiment confirms that iron is a limitant component in our culture medium during autumnal diatoms cultures and limits the chlorophyll <i>a</i> level in cells. It is possible to use with same efficiency an inexpensive component: the Iron (III) chloride in aqueous solution instead of a chelated iron salt more expensive.</p>	
mots-clés	phytoplancton, culture de masse, diatomées, <i>Skeletonema costatum</i> , fer, aquaculture
key words	phytoplankton, mass culture, diatoms, <i>Skeletonema costatum</i> , iron, mariculture



# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
INTRODUCTION	4
<b>I : ESSAIS DE CULTURE EN MASSE DE DIATOMÉES EN BASSIN EXTERIEUR DE 24 M3</b>	
1.1 Matériels et méthodes	6
1.2 Résultats	8
1.2.1 Données de l'environnement	8
1.2.2 Biomasse phytoplanctonique	9
1.2.3 Autres paramètres des descripteurs de la biomasse	10
1.2.4 Consommation des nutriments	11
1.3 Conclusion des essais in situ	12
<b>II : LE FER, UN FACTEUR LIMITANT POUR LA CROISSANCE AUTOMNALE DE <u>Skeletonema costatum</u> ? (EXPERIMENTATION IN VITRO)</b>	
2.1 Connaissances bibliographiques	14
2.2 Objectif de l'expérimentation <u>in vitro</u>	15
2.3 Matériels et méthodes	15
2.4 Résultats et discussion	16
2.5 Discussion	16
2.6 Recommandations	18
<b>III : CONCLUSION GENERALE</b>	19
<b>IV : BIBLIOGRAPHIE</b>	21
<b>V : FIGURES</b>	24
<b>V : ANNEXES</b>	40

## REMERCIEMENTS

Cette étude a été menée avec la participation financière de la Région Poitou-Charentes, ce qui nous a permis notamment de compléter les outils nécessaires à l'observation en continu de la culture, et de renforcer l'équipe technique durant la période expérimentale de l'automne 1994.

Nous remercions tout particulièrement Marcel Guillaut qui nous a assisté au quotidien dans tous les essais *in situ*. Nos remerciements vont aussi à Lucette Joassard qui a apporté son appui technique pour les travaux en salle d'algues, et à Françoise Mornet pour les analyses de nutriments au Skalar et l'aide à la détermination et au comptage des populations naturelles de microalgues.

Nous n'oublierons pas Dominique Gautier, qui durant la période de ces expérimentations a effectué au sein de notre équipe, un travail de synthèse bibliographique sur la culture de Skeletonema costatum ainsi que Dr Serge Y. Maestrini qui a bien voulu mettre à notre disposition son abondante bibliographie sur les microalgues.

# INTRODUCTION

Dans le cadre du contrat de plan IFREMER-Poitou Charentes 1994-1998, nous avons engagé la suite du programme "STIMULATION DE LA PRODUCTIVITE DES MARAIS" du CREMA, élément du projet "CLAIRES OSTREICOLES" retenu par la Région. Il s'agit de développer les recherches nécessaires pour obtenir la maîtrise de la culture en masse des diatomées de façon à enrichir en nourriture les claires à huîtres durant la phase de l'affinage qui précède les fêtes de Noël.

En 1994, l'effort a porté sur :

- **la procédure de lancement initial de la culture de diatomées** jusqu'au niveau d'intensification souhaité (environ 700 à 800 000 cellules par millilitre), pour commencer les dilutions et enrichissements d'une culture semi-continue. En 1993, comme il nous fallait au départ une identité de cellules sur les microcosmes, nous avons commencé directement avec 400 000 cellules par millilitre pour étudier uniquement la phase de maintien de la culture en faisant varier les taux de dilution (Froissard, 1994). Ce travail sur la mise en route de la culture a été initié au printemps 1994 (Hussenot & Dobbelaere, à paraître), et à l'automne (présente étude).
- **le changement d'échelle des cultures semi continues** de Skeletonema costatum, entre le microcosme de 230 litres, utilisé en 1993, et un bassin en béton de volume unitaire de 24 m<sup>3</sup>, utilisé en 1994.
- **la recherche de techniques simples de culture**, nécessitant un minimum de frais et d'équipement pour le suivi de la biomasse et la gestion des apports (eau + nutriments).
- **les conditions limitantes propres à l'automne dans la culture en masse de diatomées**, dans la mesure où la température décline, la lumière est moins importante qu'au printemps.

Les principaux objectifs ont été de :

- tester à l'échelle réelle d'un bassin de production (24 m<sup>3</sup>) la capacité à développer une culture de la diatomée de type Skeletonema costatum sansensemencer le bassin.
- évaluer la possibilité d'atteindre une concentration cellulaire de 600 000 cellules par millilitre et de maintenir une culture semi-continue ; une part de la production quotidienne phytoplanctonique étant exportée et remplacée par de l'eau de mer enrichie en nutriments essentiels.

Après constatation du faible taux de croissance des algues à l'automne, il a été aussi nécessaire de :

- évaluer l'influence d'un milieu enrichi en fer chélaté et non chélaté (expérimentation in vitro) sur la vitesse de croissance de S.costatum et sur la teneur en chlorophylle a des cellules, en comparaison avec une culture témoin, représentative des conditions de culture habituelles.

# I. : ESSAIS DE CULTURE EN MASSE DE DIATOMEES EN BASSIN EXTERIEUR DE 24 M<sup>3</sup>.

La période expérimentale s'est déroulée entre le 11/10/94 et le 12/12/94 de façon à simuler une production d'algue "fourrage" (S.costatum) menée à l'époque de l'affinage des huîtres en marais charentais. Jusqu'à présent tous les essais avaient été menés au moment du printemps.

## 1.1 MATERIELS ET METHODES

Les différents essais ont été effectués sur le site expérimental du CREMA dans un bassin béton carré de 5m x 5m x 1,2m. Celui-ci était équipé :

- d'une rampe de diffusion d'air en I reliée à un surpresseur (modèle Rietschle SKG 275-2V.02), d'une puissance de 1500 watts, créant deux courants opposés de circulation de l'eau, du fond vers la surface et du centre vers les côtés ;
- de capteurs de l'irradiance lumineuse, placés à la surface et à 40 cm de profondeur, de sondes de température et de pH, tous reliés à une centrale d'acquisition Licor LI-1000 ;
- d'une règle graduée pour déceler toute variation du volume initial (24 m<sup>3</sup>), et permettre des changements d'eau précis.

L'eau de mer servant aux remplissages du bassin était systématiquement filtrée à 250 µm pour éviter l'introduction de copépodes adultes (comme Acartia grani), déterminés comme les plus importants brouteurs de phytoplancton dans la zone d'étude.

Quatre essais ont été effectués (figure 1) :

- le premier essai (essai D) a été réalisé du 11/10/94 au 18/10/94 (J0/J7) en démarrant la culture sans ensemencement, avec un simple apport en nutriments essentiels (N/P/Si) ; les essais du printemps 1994 ayant montré qu'il était possible de démarrer une culture sans ensemencement. En effet, la souche Skeletonema costatum est présente dans l'eau pompée et domine les autres souches par une vitesse de croissance plus rapide si la concentration en silice est suffisante (Hussenot & Gautier, 1994).

- les deux essais suivants (essai E et essai F) ont été réalisés respectivement du 18/10/94 au 2/11/94 (J0/J15) et du 3/11/94 au 16/11/94 (J0/J13). Le protocole était identique à l'essai D, mais la température moyenne de l'eau était inférieure de 3-4°C.

- le dernier essai (essai G) s'est déroulé à partir du 18/11/94 en supprimant toute aération dans le bassin.

Entre chaque essai, le bassin ainsi que les diverses sondes étaient nettoyés à l'eau de mer.

L'enrichissement en nutriments essentiels (N/P/Si) était réalisé avec trois engrais monocomposants :

- **Ammonitrate (AMN)**, contenant 33,5% de N (16,75% N-NO<sub>3</sub> et 16,75% N-NH<sub>4</sub>), soluble dans l'eau de mer à 94%. Ce composé mixte évite un excès de N-NH<sub>4</sub>, qui peut se révéler dangereux à des doses accumulées de 600 µmoles/l et plus (Gautier et al., 1994).

- **Double SuperPhosphate (DSP)**, contenant 25 % de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, soluble dans l'eau de mer à 100%.

- **Silicate de Soude Liquide (SSL)**, contenant 29 % de silice, de densité 1,39 et soluble dans l'eau de mer à 80 % en le pré-diluant dans l'eau douce (Hussenot & Gautier, 1994).

A chaque essai, les doses d'engrais étaient apportées dans un rapport N/P/Si de 9,3/1/3,5. Chaque engrais a été préalablement ensaché en doses prêtes à l'emploi (doses pour produire en théorie d'après les essais printaniers précédents 100, 200, 500 µg/l de chl<sub>a</sub> dans 24 m<sup>3</sup>).

Le premier apport a toujours été réalisé le premier jour de chaque essai (J0). Après montée de la biomasse et (ou) après dilution de la culture, d'autres doses ont complété la première pour éviter un effondrement de la culture par limitation des nutriments.

Les paramètres température, salinité, oxygène dissous, pH, biomasse chlorophyllienne, transparence au disque de Secchi et absorption à 680 nm ont été mesurés quotidiennement à 9h00 et 9h30, sur trois stations différentes a, b et c et à mi profondeur. Aucune modification de la qualité de l'eau, due à un enrichissement en nutriment ou (et) à un changement d'eau partiel, n'était effectuée avant la prise des paramètres.

La transparence au disque de Secchi est exprimée dans les résultats par la distance en centimètres séparant le fond du bassin, du niveau d'extinction du disque.



Les cellules de Skeletonema costatum ont été dénombrées :

- manuellement sous microscope inversé à l'aide de la cellule de Malassez;
- automatiquement avec un compteur de particules "Coulter Electronics" de type Multisizer à 256 canaux. Une régression "quantité de cellules par colonies/ longueur de la colonie" a permis de convertir les résultats bruts en nombre de cellules puis en concentration cellulaire selon la méthode de Sauriau & Baud, 1992 (cf annexe 1).

Des mesures en continu ont été enregistrées toutes les dix minutes, pour l'irradiance lumineuse, la température de l'eau et le pH. Des essais de mesure en continu de l'absorption à 680 nm avec un DR 2000 Hach équipé d'une cuve en continu ont été tentés, mais la formation de buée sur la cuve du spectrophotomètre a empêché l'acquisition de données exploitables.

## **1.2 RESULTATS ET DISCUSSION**

### **1.2.1 Données de l'environnement**

La qualité de l'eau de mer du site du marais du Plomb, où sont situées les installations expérimentales du CREMA, a été variable durant la période des essais. Chaque début d'essai a correspondu avec une période de grande marée, période durant laquelle la réserve a pu être remplie avec une eau fraîche venant du large. Au fur et à mesure de la stagnation dans la réserve, l'eau décante, s'appauvrit en nutriments, et les espèces phytoplanctoniques diminuent en diversité.

Lors des essais D,E,F, le remplissage du bassin a été effectué avec une eau de mer décantée dans la réserve. Pour l'essai G, le remplissage du bassin a été réalisé directement avec une eau amenée par la marée, beaucoup plus chargée en matière en suspension que l'eau de la réserve.

Les figures 1, 2, 3, 4 et 5 présentent l'évolution des principaux paramètres du milieu lors des différents essais parallèlement. La température et l'intensité lumineuse (irradiance) sont plus importantes pour l'essai D qui s'est déroulé au début de l'automne. Ceci explique en partie le développement rapide de la culture et l'apparition d'une biomasse microalgale importante, supérieure à  $10^6$  cellules/ml (figure 1). Ces valeurs de concentration cellulaire ne sont d'ailleurs jamais atteintes durant les essais suivants. Les conditions météorologiques des essais E, F, G correspondent probablement mieux aux conditions automnales standards. En effet, un temps couvert et pluvieux s'était manifesté pendant ces essais ; les températures de l'eau s'échelonnaient de  $10,9^{\circ}\text{C}$  à  $14^{\circ}\text{C}$  et l'irradiance lumineuse de surface ne dépassait pas  $500$  à  $1000 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , lorsque l'ensoleillement était maximal.

Pour les essais E, F, G, les valeurs de pH montrent des maxima journaliers de seulement 8,7, indicatrices d'une activité photosynthétique limitée. Une régulation du pH avait été prévue par ajout automatique d'acide chlorhydrique  $10^{-1}M$ , mais il n'a pas été nécessaire d'y avoir recours, les valeurs n'ayant jamais atteint des seuils critiques inhibiteurs de la croissance ( $pH > 9-9,5$ ). Au printemps, les valeurs maximales de pH atteignaient jusqu'à 9,6 ce qui prouve une activité photosynthétique bien supérieure à celle de l'automne.

### 1.2.2 Biomasse phytoplanctonique

Nous constatons que l'évolution de la biomasse a différé suivant les essais (figure 1) :

- essai D (figure 6) : l'évolution est rapide et importante. La biomasse chute rapidement à J6/J7. Les conditions météorologiques expliquent l'ampleur de ce bloom constitué exclusivement de S.costatum.

- essai E (figure 7) : l'évolution est constante jusqu'à J5, puis la culture se dégrade régulièrement. Un bloom de la diatomée Nitzschia acicularis fut introduit dans le bassin lors de la dilution (J6) avec une eau de la réserve riche de cette espèce.

- essai F (figure 8) : l'évolution lente de la biomasse (10 jours pour atteindre 300 000 cellules/ml) s'explique par un ensoleillement faible (figure 4a) et une température moyenne de l'eau de  $13,1^{\circ}C$ . La culture était constituée exclusivement de chaînes moyennes de 6 cellules de S.costatum. Après 2 dilutions consécutives (J11/J12), la culture s'est dégradée.

- essai G (figure 9) : il a été décidé de stopper l'aération dans cet essai. 300 000 cellules/ml sont atteintes en 19 jours. Les conditions météorologiques ( $T=11^{\circ}C$ ; intensité lumineuse  $\leq 500 \mu moles.m^{-2}.s^{-1}$ ) et l'arrêt du bullage n'ont pas favorisé le développement rapide de la culture. La turbidité importante de l'eau de départ de cet essai (eau de mer n'ayant pas transité par la réserve-décanteur) a eu probablement un effet retard sur le développement de la culture. Cet essai a permis de montrer qu'il était possible de développer la souche de S.costatum sans aération. La population était constituée de chaînes (jusqu'à 30 cellules), bien formées (contenu cellulaire très vert). Après une dilution de 43% à J21, la population s'est effondrée.

Nous remarquons (tableau 1) que le rapport "biomasse chlorophyllienne/cellule" est différent de celui obtenu au printemps, avec 2 à 3 fois moins de chlorophylle par cellule à l'automne qu'au printemps. Ces résultats sont en contradiction avec les observations faites sur des cultures de S. costatum à différentes luminosités (Hitchcock, 1980) ou sur des cultures de S. costatum sur eau de forage (Brault et al.,

1994) qui constatent qu'en lumière réduite la quantité de chlorophylle par cellule augmente.

**Tableau 1 : Quantité de cellules comparées à 1 µg de chlorophylle a : comparaison entre les différents essais et la moyenne des essais printaniers. Nombre d'observations et R<sup>2</sup> de la régression linéaire correspondante.**

essai	cellules (en 10 <sup>6</sup> )	nbre obs	R <sup>2</sup>
printemps	1,0		
essai D	2,8	9	0,91
essai E	2,7	7	0,48
essai F	1,4	16	0,72
essai G	2,0	11	0,81

Ce phénomène pourrait provenir de carences en certains éléments minéraux non apportés dans notre enrichissement, indispensables pour constituer les molécules enzymatiques nécessaires à la synthèse de la chlorophylle (cf chapitre II).

### 1.2.3 Autres paramètres descripteurs de la biomasse

Pour l'essai D, le comptage sur la cellule de Malassez, la mesure au disque de Secchi, l'absorption à 680 nm, ont été corrélés avec la teneur en chlorophylle a. Les figures 6b, 6d, 6f représentent les régressions entre la chlorophylle a et les paramètres. Nous remarquons que l'évolution de la courbe de l'absorption in vivo à 680 nm est globalement similaire à la courbe de la chlorophylle a (figure 6e). Elle est un bon indicateur d'évolution de la biomasse chlorophyllienne, plus sensible que l'absorption à 750 nm que nous utilisions précédemment.

La mesure au disque de Secchi, présente la meilleure corrélation avec la chlorophylle a. Des sources d'erreur peuvent cependant exister :

- la précision des mesures est dépendante de la turbidité initiale de l'eau ; en début de culture, le milieu est souvent chargé en sédiment.
- l'extinction du disque varie en fonction de l'acuité visuelle du technicien et de la luminosité au moment de la mesure.

L'évolution de la concentration en chlorophylle a est pratiquement identique à celle du comptage sur cellule de Malassez. La relation qui lie cependant les 2 paramètres n'apparaît pas stable d'un essai à l'autre, encore moins d'une saison à l'autre (tableau 1). Il sera donc toujours nécessaire si l'on souhaite avoir un dénombrement cellulaire d'effectuer le comptage sous microscope, travail long et nécessitant un matériel onéreux. Cette technique est couramment utilisée en salle d'algues.

Lors des essais suivants, les mêmes mesures ont été effectuées et des résultats équivalents ont été obtenus. Les suivis des paramètres Secchi et absorption à 680 nm ont permis d'estimer immédiatement l'état de la culture avant toute analyse de laboratoire.

Pour un suivi par la profession ostréicole, un photomètre monolongueur d'onde à 680 nm serait une solution idéale pour apprécier rapidement la croissance de la culture avec un coût raisonnable (estimation indirecte de la chlorophylle a). A ce jour malgré nos recherches nous n'avons pas trouvé l'appareillage adapté qui doit être simple, robuste et bon marché (Hussenot, 1994)

#### 1.2.4 Consommation des nutriments

La figure 10 visualise la consommation des nutriments N/P/Si durant les essais D,E,F. Nous observons que les rapports N/P/Si sont différents suivant les essais en raison d'une consommation variable de l'azote. Par contre le rapport P/Si des trois essais est stable aux environs de 1/5,5 au lieu de 1/4 au printemps. L'apport en nutriments qui avait été fait dans un rapport P/Si de 1/3,5 pour éviter une surconsommation de la silice, composé le plus coûteux, a pu entraîner une légère limitation en silice qu'il faudrait à l'avenir essayer de corriger dans les cultures automnales.

Si les rapports atomes/atomes sont malgré tout assez proches de ceux du printemps, les consommations en  $\mu\text{moles}$  par cellule ou par unité de chlorophylle a sont par contre nettement supérieures à celles du printemps (tableaux 2 et 3).

**Tableau 2 : Moyenne des consommations de N/P/Si pour produire 1 $\mu\text{g}$  de chlorophylle a ( $\mu\text{moles}$ )**

<b>nutriments</b>	<b>printemps 93</b>	<b>essai D</b>	<b>essai E</b>	<b>essai F</b>
<b>N</b>	<b>0,21</b>	<b>0,68</b>	<b>1,51</b>	<b>1,42</b>
<b>P</b>	<b>0,021</b>	<b>0,08</b>	<b>0,19</b>	<b>0,12</b>
<b>Si</b>	<b>0,085</b>	<b>0,47</b>	<b>1,05</b>	<b>0,60</b>

**Tableau 3 : Moyenne des consommations de N/P/Si pour produire 10<sup>7</sup> cellules ( $\mu\text{moles}$ )**

<b>nutriments</b>	<b>printemps 93</b>	<b>essai D</b>	<b>essai E</b>	<b>essai F</b>
<b>N</b>	<b>2,15</b>	<b>1,72</b>	<b>6,74</b>	<b>7,84</b>
<b>P</b>	<b>0,21</b>	<b>0,21</b>	<b>0,85</b>	<b>0,63</b>
<b>Si</b>	<b>0,85</b>	<b>1,18</b>	<b>4,67</b>	<b>3,33</b>

Dans l'essai D qui a donné les meilleures productions de diatomées en raison des conditions d'ensoleillement et de températures supérieures, les consommations par cellule (tableau 3) sont proches de celles mesurées dans l'étude en microcosme du

printemps 1993 (Froissard, 1994). Par contre, les essais E et F montrent une surconsommation de nutriments par cellule d'un facteur 3 à 4 par rapport à l'essai D (tableau 3). Ce phénomène d'assimilation en excès est connu dans la littérature anglo-saxonne sous le nom de "luxury uptake". Dans l'essai E un apport complémentaire pour les besoins de 500 µg par litre de chlorophylle a (figure 1) a fait passer brutalement, du jour au lendemain, la consommation d'azote pour 10<sup>7</sup> cellules de 3 à 26 µmoles et la consommation de phosphore de 0,4 à 3,4 µmoles (cf tableau de consommation N/P/Si en annexes). Si N et P ont été surconsommés avec un facteur proche de 10 au jour 4, la silice par contre n'a été surconsommée que par un facteur 3 (de 3,8 à 11,6 µmoles) ; mais la figure 12 montre que la silice dans l'eau était l'élément dont la concentration molaire était la plus faible.

Les figures 11b, 12b, 13b permettent de constater que la forme ammoniacale de l'azote est rapidement utilisée alors que la forme nitrate n'est consommée qu'après l'épuisement de N-NH<sub>4</sub>.

La culture de l'essai F a manqué de silicates au jour 10, ce qui a provoqué son effondrement malgré un échange d'eau et une fertilisation à J11, sans doute trop tardive.

Les tableaux 2 et 3 montrent que nous devons à l'avenir, pour estimer les consommations théoriques de nutriments, utiliser l'estimation de la chlorophylle *a* plutôt que le comptage cellulaire. En effet, la variation entre les essais automnaux des consommations de nutriments est plus réduite si nous nous référons à la chlorophylle *a* plutôt qu'à la densité cellulaire. Ce résultat est intéressant car les techniques indirectes de mesure de la biomasse que nous utilisons (Secchi, absorbance 680 nm) sont fonction de l'abondance des pigments chlorophylliens, et sont plus étroitement liés à la chlorophylle *a* qu'à la densité cellulaire, si la quantité de chl *a* par cellule varie.

### 1.3 CONCLUSIONS DES ESSAIS *IN SITU*

L'orientation naturelle de nos cultures vers l'espèce *S.costatum*, confirme les résultats de mars 1994. Il n'est pas nécessaire en effet d'ensemencer une culture sur eau de mer contrairement à une culture sur eau de forage. Toutefois, à l'automne, la croissance plus lente, nous incitera à l'avenir à redémarrer des cultures avec un minimum de 100 à 200 000 cellules par millilitre, de façon à réduire le temps de production.

Il apparaît d'autre part que le fait d'ajouter en cours de croissance des nutriments favorise leur surconsommation. Il serait intéressant de comparer les consommations entre une culture avec un apport unique initial pour produire X cellules par ml et une culture où on apporte d'abord les besoins pour X/2 cellules par ml et quelques jours après le restant (soit à nouveau pour X/2).

Le nombre maximal de cellules obtenues dans les essais à luminosité faible (essais E, F, G) reste bien en dessous de 1 million de cellules par ml, malgré une température de l'eau cette année, supérieure à 10°C, même jusqu'à la mi-décembre.

L'eau de la réserve a entraîné l'introduction d'algues "parasites", en cours de culture, par le renouvellement de l'eau. En effet la réserve du CREMA, seule source disponible d'eau de mer en période de mortes-eaux, contenait, à plusieurs reprises, une concentration élevée de diatomées du genre Nitzchia. Ces diatomées moins exigeantes en silice que S. costatum, trouvent souvent des conditions favorables à leur croissance dans les marais salés endigués de nos côtes. Mais, même mélangées en nombre à une culture de S. costatum, ces algues n'ont jamais pris le dessus dans le bassin de culture. Par contre elles ont probablement contribué à l'assimilation des nutriments. Pour l'application professionnelle de nos résultats, les Nitzchia sont aussi intéressantes comme fourrage pour les huîtres. Le seul inconvénient pourrait être de déséquilibrer les nutriments disponibles par rapport à une consommation théorique calculée pour S. costatum.

## II. : LE FER: UN FACTEUR LIMITANT POUR LA CROISSANCE AUTOMNALE DE Skeletonema costatum? (EXPERIMENTATION IN VITRO)

La croissance de S. costatum a été très lente durant les essais E, F, G d'automne 1994 sur eau de mer enrichie en N/P/Si.

Le fer étant le quatrième composant principal dans les besoins nutritifs des diatomées, il est possible qu'il soit en quantité limitante dans nos cultures, à la période automnale ? Les océanographes spécialistes du phytoplancton sont en train de s'apercevoir que ce composé pourrait être l'élément limitant dans certaines mers du globe où les éléments nutritifs majeurs sont présents alors que la biomasse algale reste très faible (Martin et al., 1994 ; Wells et al., 1995)

Nous avons tenté de répondre à cette question, par une expérimentation in vitro, réalisée en décembre 1994.

### 2.1 CONNAISSANCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les chloroplastes, organites cellulaires photosynthétiques, renferment plusieurs protéines. On peut mettre en évidence des protéines de structure, de nombreuses enzymes, et une protéine contenant du fer : **la ferrédoxine**. Celle-ci intervient dans les réactions photochimiques (Berkaloff et al., 1967). Les principaux acteurs sont les photons, la chlorophylle a, la ferrédoxine, **le cytochrome b6** et **le cytochrome f**, contenant aussi du fer (Bougis, 1974). La réaction consiste en une succession de réductions qui aboutit à la transformation d'ADP en ATP. Le fer est aussi présent dans une enzyme qui permet la transformation des nitrates en ammoniacque : **la nitrate réductase**.

Les besoins en fer varient suivant les espèces. Dans notre cas, S. costatum est une algue côtière qui nécessite une quantité importante de cet élément, de l'ordre de 150 µg/litre (Ryther & Kramer, 1961). D'après Jacques (1979), le fer étant insoluble dans les milieux neutres ou faiblement alcalins (eau de mer), il n'est métabolisable que sous forme chélatée (FeCl<sub>3</sub>+EDTA) encore appelée fer séquestrène. Ce dernier auteur propose deux milieux de culture (Provasoli ; Mac Lachlan) l'un contenant 112 µg de fer chélaté et l'autre 502 µg pour un litre de culture. Par contre, les pays du Sud Est

asiatique pratiquent un enrichissement en fer non chélaté dans les cultures de masse en bassin extérieur de S. costatum des écloseries de pénéides, avec semble-t-il des résultats effectifs (Chen & Ramos, 1989 ; Tseng, 1988). Les concentrations apportées varient de 1700 à 2200 µg/litre (FeCl<sub>2</sub> ou FeCl<sub>3</sub>). Le coût du chélateur étant élevé, la question reste posée de son utilité en grands volumes.

## **2.2 OBJECTIF DE L'EXPERIMENTATION *IN VITRO***

Des tests *in vitro* de culture sont proposés pour évaluer l'effet possible d'un milieu enrichi en fer chélaté et non chélaté sur la croissance de S. costatum, en comparaison avec une culture témoin, représentative de nos conditions habituelles.

## **2.3 MATERIELS ET METHODES**

Trois milieux de culture avec chacun quatre réplicats, ont été choisis :

- **contrôle** : eau + nutriments N/P/Si
- **FeCl<sub>3</sub>** : eau + nutriments + 150µg/l Fe Cl<sub>3</sub>
- **Fe seq** : eau + nutriments + 150µg/l Fe Cl<sub>3</sub> + EDTA (chélateur)

L'expérience s'est déroulée entre le 8/12/94 et le 15/12/94 dans la salle d'algues du CREMA ; elle a été équipée pour l'expérimentation de 12 flacons de 4 litres avec des cannes de bullage et bouchons. Un bullage léger a été maintenu constant dans tous les flacons. La température a été thermostatée à 17°C et la lumière (tubes néon de type "gro lux F 58 W") fournissait une irradiance de 100 µmoles.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. La photopériode était de 14 heures de jour et 10 heures de nuit.

### **Préparation des milieux de culture**

L'eau de cet essai provenait d'un bassin extérieur en culture automnale semi continue de S.costatum (phase exponentielle de croissance). La concentration était de 77 200 cellules/ml. Une dilution de 75% avait été effectuée juste auparavant. Les nutriments N/P/Si ont été apportés pour produire 1,5 millions de cellules par ml afin de ne pas être limitant. Le rapport N/P/Si/Fe utilisé a été 9,2/1/3,5/0,2.

### **Suivi**

Quotidiennement, la biomasse était évaluée par la mesure de l'absorption à 680 nm et le pH était mesuré.

A J0 et à J4 un bilan complet a été réalisé sur chaque flacon (chlorophylle a ; sels nutritifs; absorption 680 nm ; Multisizer ; comptage sur cellule de Malassez ; pH).



## 2.4 RESULTATS

Dès J1, la teneur en chlorophylle a (chl<sub>a</sub>) pour les milieux FeCl<sub>3</sub> et Feseq est nettement supérieure au milieu contrôle (figure 15). A J4, l'écart est encore plus important : la concentration moyenne en chlorophylle a pour FeCl<sub>3</sub> et Feseq atteint respectivement 870 et 847 µg/l soit environ 50% de plus que le milieu de contrôle. Une ANOVA à un facteur et un test de Tukey (tableau 4) montrent que les différents traitements sont significativement différents (P<0,05).

**Tableau 4 : Concentration moyenne en µg/litre de chlorophylle a des trois milieux à J4 sur les 4 réplicats et résultat de la comparaison des moyennes par Anova**

<b>milieu de culture</b>	<b>moyenne</b>
<b>contrôle</b>	<b>582,7<sup>a</sup></b>
<b>fer non chélaté</b>	<b>870,1<sup>b</sup></b>
<b>fer chélaté</b>	<b>847,0<sup>b</sup></b>

les moyennes n'ayant pas la même lettre en exposant, sont significativement différentes d'après le test à posteriori de Tukey

Le rapport µg chl a/10E7 cellules est de 3 µg pour FeCl<sub>3</sub> et Feseq et de 2 µg pour le milieu de contrôle.

En observant les figures 16 et 17, nous constatons que le pH et l'absorption à 680 nm sont également supérieurs pour les milieux enrichis en fer. Les mesures d'absorption ont également une différence significative entre le milieu contrôle et Feseq/FeCl<sub>3</sub> (P<0,05).

Par contre, la concentration cellulaire (comptage sur Malassez) à J4 pour les trois milieux atteint environ 3 millions de cellules par ml. Par l'analyse de variance à un facteur, il est démontré que les moyennes des concentrations cellulaires des 3 milieux n'ont pas de différence significative (P>0,05).

## 2.5 DISCUSSION

Cette expérimentation montre que nos cultures extérieures de S.costatum réalisées en période automnale sont sûrement carencées en fer. L'apport de fer sous forme chélatée ou non chélatée a les mêmes effets et entraîne une augmentation de la teneur en chlorophylle a par cellule. Nos résultats sont en accord avec ceux de Sakshaug & Holm-Hansen (1977) effectués sur des cultures de S.costatum et Pavlova lutheri (tableau 5). La culture en batch était réalisée à 18°C dans des flacons de 9 litres avec agitation par bullage et mélangeur magnétique. L'intensité lumineuse provenait de deux tubes fluorescents qui fournissaient une intensité de 241 µmoles.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>.

**Tableau 5 : Bioessais de *S.costatum* sur des cultures carencées en fer et évolution de la biomasse chlorophyllienne ( $\mu\text{g chl}a/l$ )**

temps	témoin	Fe	EDTA	Fe+EDTA
0 h	51	51	51	51
31 h	70	81	68	82
50 h	85	215	84	224
68 h	93	206	87	189

d'après Sakshaug & Holm-Hansen (1977)

Nous retiendrons qu'en automne, un enrichissement en fer augmente la quantité de chlorophylle *a* sans augmenter la quantité de cellules : pour une même concentration à J4, la teneur en pigments chlorophylliens est plus importante en milieu enrichi en fer. Cependant, il apparaît que la concentration en chlorophylle *a* par cellule en automne est quatre fois moins élevée qu'au printemps (tableau 6). Il devrait en fait être constaté une quantité plus importante de chl *a* à l'automne pour compenser une énergie lumineuse plus faiblement reçue. Il est donc probable que d'autres éléments minéraux soient en quantité limitantes. Il nous faudra comparer le milieu utilisé complété en fer avec un milieu dit "complet" pouvant nous servir de référence.

**Tableau 6 : Teneur en chlorophylle *a* de *S. costatum* suivant la période d'essai (pg chl *a* par cellule)**

<i>in situ</i>	printemps 1993	1,1	(source : Froissard, 1994)
	automne 1994	0,1 à 0,4	
<i>in vitro</i>	contrôle	0,2	
	Fe Cl <sub>3</sub>	0,3	
	Fe seq	0,3	

**Tableau 7 : Rapport N/P/Si/Fe (atome/atome) de différents milieux de culture**

Milieux	N	P	Si	Fe
Cheng & Antia (1970)	10,0	1	6,0	0,2
Conway (Walne, 1970)	9,3	1	-	0,003
Guillard & Ryther (1962)	24,3	1	2,2	0,3
Tseng, grands volumes (1988)	14,1	1	0,1	0,5
Hussenot & Brossard (notre expérience)	9,3	1	3,5	0,2

Des tests sur les besoins quantitatifs en fer seraient également importants à engager. En effet les milieux de culture utilisés pour les diatomées peuvent contenir des concentrations très variables selon les auteurs (tableau 7). Le milieu de Cheng & Antia utilisé en salle d'algues au CREMA, serait un milieu approprié de référence, proche dans son rapport des nutriments essentiels de ce que nous utilisons, sauf en silice (plus riche que notre formulation), et aussi plus complet pour tous les autres éléments

(métaux et oligo-éléments) que nous n'apportons pas en plus de ce que peut contenir déjà l'eau de mer. Il contient un chélateur des métaux.

## 2.6 RECOMMANDATIONS

Les milieux contenant du fer non chélaté et chélaté ont des résultats similaires. Pour les cultures en grands volumes, il est donc possible de baisser considérablement le coût du fer en utilisant un produit industriel distribué par Langlois Chimie, solution à 41% de perchlorure de fer ( $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ), utilisée pour le traitement des eaux. Le prix du fer chélaté est de 313F le kg (solution à 13% de fer) au lieu de 2,60 F le kg pour la solution de fer non chélaté (solution à 41% de fer).

La stratégie de fertilisation du fer qui pourrait être retenue peut partir du fait que 150  $\mu\text{g/l}$  de Fe suffisent pour produire environ 1,5 millions de cellules par ml. Cela donne un besoin de 100  $\mu\text{g}$  de Fe pour  $10^9$  cellules.

**Tableau 8 : Coût des produits fertilisants pour produire  $10^9$  cellules en période automnale (soit 292 $\mu\text{g}$  chla), équivalent au besoin nutritif journalier d'une huître de 50/80g.**

composant	masse utilisée ( $\mu\text{g}$ )	prix au kg (francs)	coût pour $10^9$ cellules	
			(francs)	(%)
fer non chélaté	100	2,60	0,0000003	(0.8%)
silicate de soude liquide	7076	3,30	0,0000233	(72.7%)
double superphosphate	2164	1,50	0,0000032	(10.0%)
Ammonitrate	3129	1,70	0,0000053	(16.5%)
<b>COÛT TOTAL</b>			<b>0,0000321</b>	<b>(100%)</b>

Le tableau 8 représente le coût total d'apport en engrais pour alimenter pendant un jour une huître de 50/80g en *S. costatum*. Pour engraisser 1 kg huître pendant 30 jours, cela coûterait  $15 \times 30 \times 0,0000321$  soit 1,45 centimes. A ce jour le coût total de production de la culture d'algues (incluant l'amortissement, l'électricité, la main-d'oeuvre) ne peut pas être évalué, car la technique à utiliser pour l'automne n'est pas arrivée à un état de maturité suffisant.

Le perchlorure de fer ne représente que 0,8% du coût total. Pour une augmentation de la teneur en chlorophylle *a* de 49%, il paraît donc très intéressant d'apporter l'élément fer à la soupe initiale N/P/Si. Si l'on utilisait le fer séquestrène, le coût du fer à lui seul représenterait aussitôt 54% du coût global des engrais.

### III. CONCLUSION GENERALE

La culture en masse de diatomées sur eau de mer enrichie, pose à l'automne des problèmes nouveaux qui n'étaient pas apparus lors des essais précédents tous menés au printemps (microcosmes en 1993, cultures de masse en 1994).

L'orientation naturelle s'est faite vers l'espèce Skeletonema costatum pour tous les essais, tous menés sans ensemencement de la souche.

La croissance a été plus lente qu'au printemps, limitée probablement plus par la lumière que par la température. Les biomasses maximales atteintes n'ont pas dépassé 300 000 cellules par ml sauf dans l'essai D du début de l'automne qui a bénéficié d'une énergie lumineuse plus importante, atteignant 1,2 millions de cellules par ml. Les travaux sur l'eau de forage de Bouin, montrent également une diminution de la biomasse à cette époque de l'année, avec un maximum de 700 000 cellules par ml. (Brault et al. , 1994).

Il devrait être possible néanmoins, sur un milieu de culture performant de dépasser les niveaux de biomasse atteints durant les essais extérieurs. Il est probable, d'après les conclusions de notre expérimentation in vitro sur le fer, que les cellules de diatomées des cultures en masse n'aient pas eu une disponibilité en fer (et peut-être d'autres métaux ?) suffisante pour bien synthétiser la chlorophylle *a* et pour rapidement réduire les nitrates disponibles dans le milieu après l'épuisement de l'azote ammoniacal.

La quantité de chlorophylle *a* par cellule a été très faible durant tous nos essais extérieurs effectués sans ajout de fer, alors que les conditions de lumière réduites auraient dû au contraire augmenter ce taux. Les essais de l'automne prochain nous permettront de voir si l'utilisation de milieux de culture plus complets accéléreront les croissances, et auront un effet sur le taux de chlorophylle *a* par cellule.

A ce jour pour améliorer les cultures de masse à l'automne, nous recommanderions de :

1. **utiliser une source d'azote facilement assimilable** (azote ammoniacal) qui ne nécessite pas la synthèse de la nitrate réductase, et donc limite les besoins en fer

2. **ajouter du fer sous forme de perchlorure de fer** à une dose minimum de 150 µg de Fe/l,

3. **rester pour l'instant sur une technique de culture en batch**, alors qu'au printemps la culture de type semi-continu est une technique efficace qui peut fonctionner au moins sur 4 ou 5 cycles de renouvellement quotidien (Gautier et al., soumis),

4. **raccourcir les longs temps de mise en route de la culture** en ensemençant avec un autre bassin arrivé à terme, de façon à redémarrer avec un minimum de 100 000 cellules par ml.

## IV. : BIBLIOGRAPHIE

- Berkaloff A., Bourguet J., Favard P., Guinnebault M., 1967. Biologie et physiologie cellulaire. Hermann, Paris, pp.144-145.
- Bougis P., 1974. Ecologie du plancton marin. Tome I - Le phytoplancton. Masson et Cie, Paris, 196 pp.
- Brault I., J.P. Baud, J. Haure, 1994. Faisabilité biologique de l'élevage intensif en bassin de l'huitre plate Ostrea edulis. Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. RIDVR-94-21/RA-BOUIN, Bouin, France, 50 pp.
- Chen K.J. & S.L. Ramos, 1989. Prawn farming. West Point Aquaculture Corp., Manila. 186 pp.
- Cheng J.Y. & N.J. Antia, 1970. Enhancement by glycerol of phototrophic growth of marine planktonic algae and its significance to the ecology of glycerol pollution. *J. Fish Res. Bd. Can*, **27**, 335-346.
- Froissard S., 1994. Culture semi-continue de la diatomée marine Skeletonema costatum en microcosmes extérieurs. Perspectives d'application des cultures massives de microalgues. Thèse vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 91 pp.
- Gautier D., C. Ledu, J. Hussenot, A. Gérard, 1993. Production en masse de Skeletonema costatum en bassins extérieurs par fertilisation minérale : étude d'un cycle estival. Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. RI.DRV-9403.RA/CREMA-L'HOUMEAU, L'Houmeau, France, 26 pp.
- Gautier D., C. Dobbelaere, J. Hussenot, F. Mornet, 1994. Mise en évidence de la toxicité de l'azote ammoniacal sur la division cellulaire de "l'algue fourrage" Skeletonema costatum. In Bordeaux Aquaculture '94. Measures for success, European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, pp.77-78.
- Gautier D., J. Hussenot, S. Froissard, G. Blanchard, (soumis). Outdoor semi-continuous culture of the diatom Skeletonema costatum: testing the effect of dilution rate on growth and yield. *J. Appl. Phycol.*

- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H., 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. Cyclotella nana Hustedt, and Detonula confervacea (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**: 229-239.
- Hitchcock, G.L., 1980. Diel variation in chlorophyll a. Carbohydrate and protein content of the marine diatom Skeletonema costatum. *Marine Biology*, **37**, 271-278.
- Hussenot J., 1994. Salon Pollutec 94 - compte rendu. Rapport CREMA, 3 pp.
- Hussenot J., D. Gautier, 1994. Techniques d'utilisation de la silice pour la production de masse des algues diatomées. synthèse des travaux 1989-1993. Rapports internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER, n° RI.DRV-9403.RA/CREMA-L'HOUMEAU, L'Houmeau, France, 26 pp.
- Hussenot J., Dobbeleare C., (à paraître). Essai de culture en masse en bassin béton en période printanière, changement d'échelle. Rapport d'expérience CREMA L'Houmeau.
- Jacques G. (Ed.), 1979. Phytoplancton. Biomasse, production, numération et culture. Editions du Castillet, Perpignan, 107 pp.
- Martin, J.H., Coale, K.H., Johnson, K.S., Fitzwater, S.E., Gordon, R.M., Tanner, S.J., Hunter, C.N., Elrod, V.A., Nowicki, J.L., Coley, T.L., Barber, R.T., Lindley, S., Watson, A.J., Van Scoy, K., Law, C.S., Liddicoat, M.I., Ling, R., Stanton, T., Stockel, J., Collins, C., Anderson, A., Bidigare, R., Ondrusek, M., Latasa, M., Millero, F.J., Lee, K., Yao, W., Zhang, J.Z. Friedrich G., Sakamoto, C., Chavez, F., Buck, K., Kolber, Z., Greene, R., Falkowski, P., Chisholm, S.W., Hoge, F., Swift, R., Yungel, J., Turner, S., Nightingale, P., Hatton, A., Liss, P. and Indale, N.W., 1994. Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, **371**, 123-129.
- Ryther J.H., D.D. Kramer, 1961. Relative iron requirement of some coastal and offshore plankton algae. *Ecology*, **42**, 444-446.
- Sakshaug E., O. Holm-Hansen, 1977. Chemical composition of Skeletonema costatum (Grev.) Cleve and Pavlova (Monochrysis) lutheri (Droop) Green as a function of nitrate-, phosphate-, and iron-limited growth. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **29**, 1-34.
- Sauriau P.G., J.P. Baud, 1992. Mesure de la rétention de Skeletonema costatum par Ruditapes philippinarum (mollusque, bivalve) en fonction de la longueur des colonies algales: principes méthodologiques. In: Société française de malacologie. Aspects récents de la biologie des mollusques., IFREMER, Brest, France., pp.83-96.
- Strickland J.D.H., T.R. Parsons, 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Fish. Res. Board of Canada Bulletin*, **167**, 310 pp.

- Tseng W-Y., 1988. Shrimp mariculture. A practical manual; Chien Cheng Publ., Kaohsiung, China.
- Walne, P.R., 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera Ostrea, Crassostrea, Mercenaria and Mytilus. *Fishery Invest.*, Lond., Ser. 2, **26**(5): 1-62.
- Wells, M.L., Price, N.M. and Bruland, K.W., 1995. Iron chemistry in seawater and its relationship to phytoplankton: a workshop report. *Mar. Chem.*, **48**, 157-182.



## **V. FIGURES**

(pages 24 à 39 non numérotées)

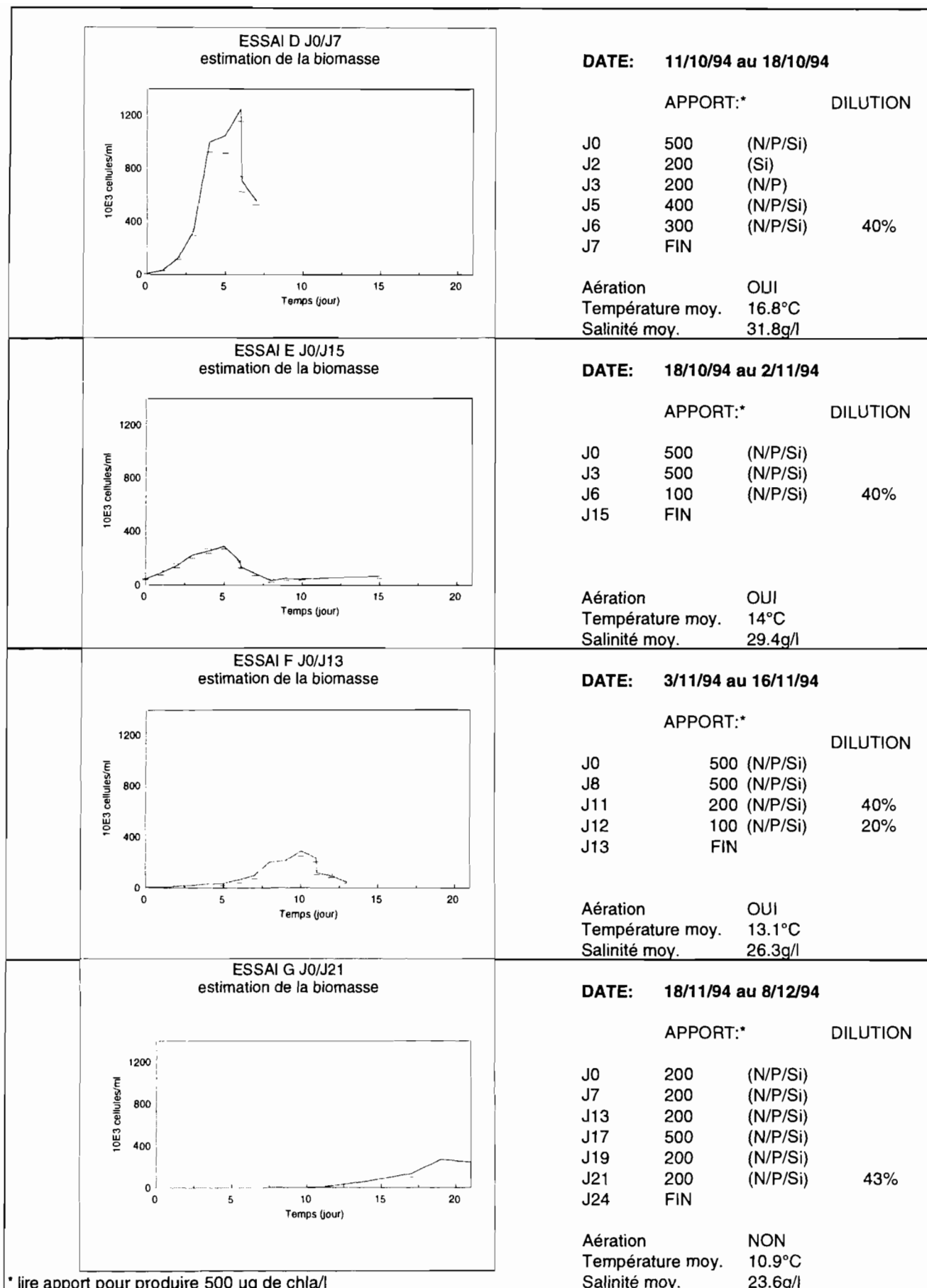


Figure 1 : Récapitulatif des essais en période automnale 1994

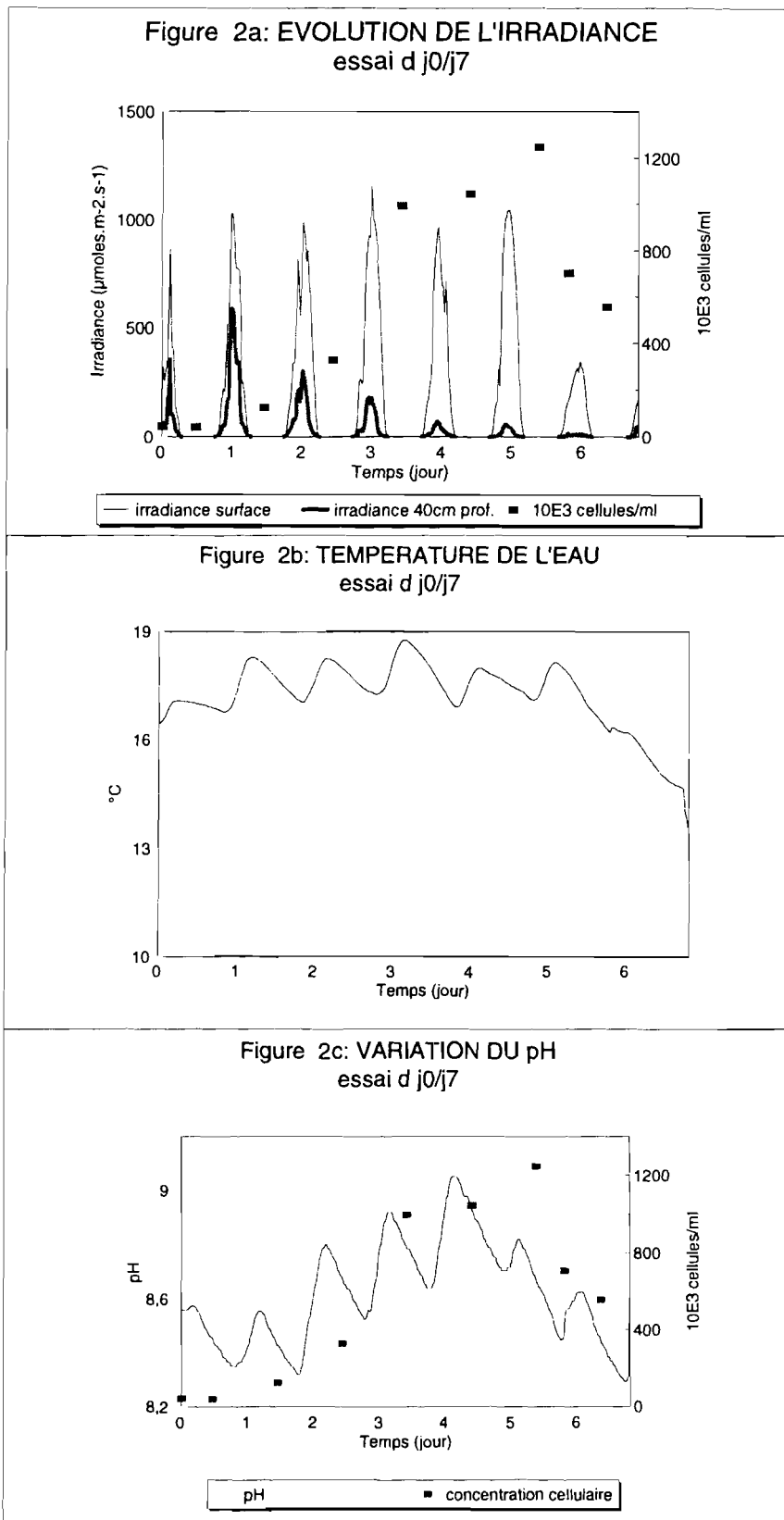


Figure 2: Evolution des paramètres lumière, température et pH d'après les enregistrements en continu durant l'essai D

Figure 3a: EVOLUTION DE L'IRRADIANCE  
essai e j0/j15

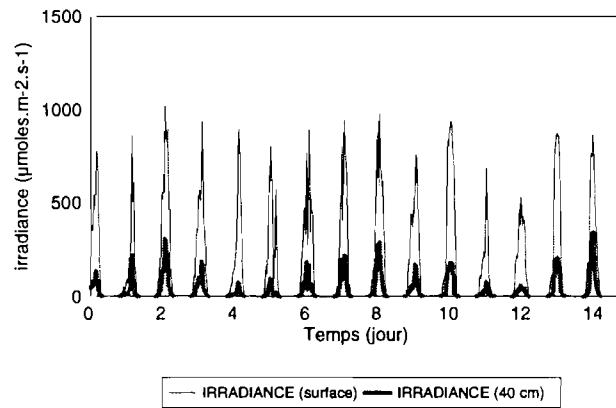


Figure 3b: TEMPERATURE DE L'EAU  
essai e j0/j15

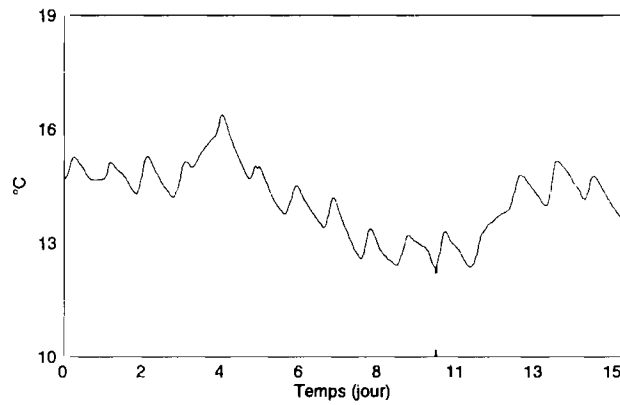


Figure 3c: VARIATION DU pH  
essai e j0/j15

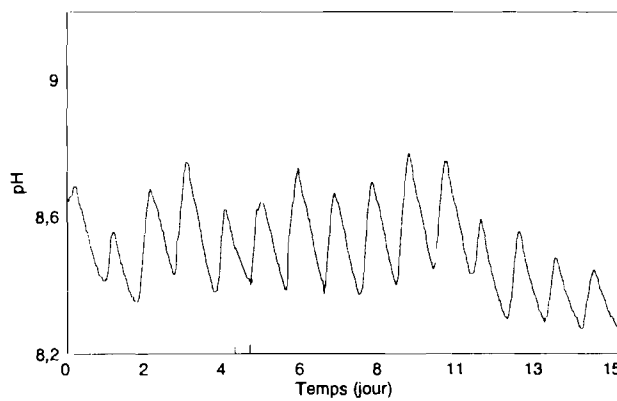


Figure 3: Evolution des paramètres lumière, température et pH,  
d'après les enregistrements en continu durant l'essai E

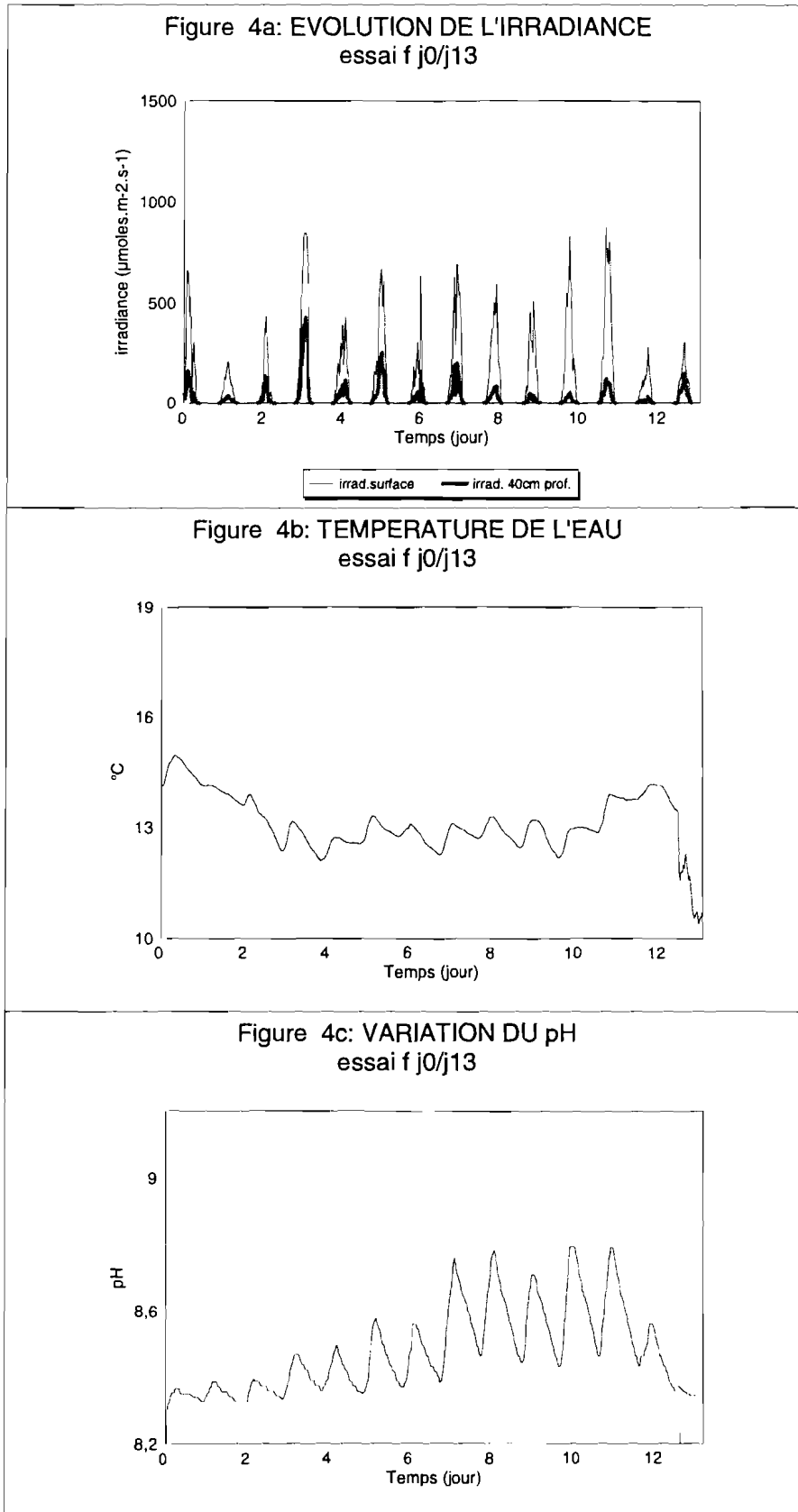


Figure 4: Evolution des paramètres lumière, température et pH d'après les enregistrements en continu durant l'essai F

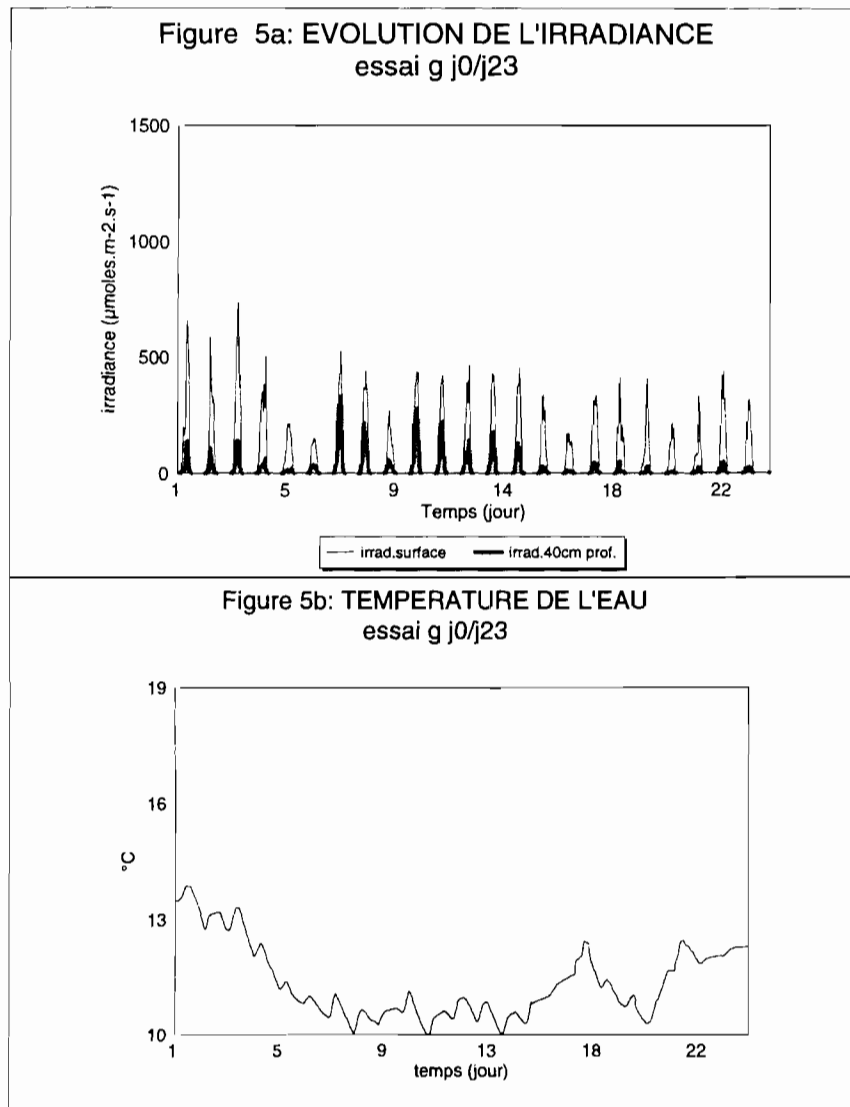


Figure 5: Evolution des paramètres lumière, température d'après les enregistrements en continu durant l'essai G

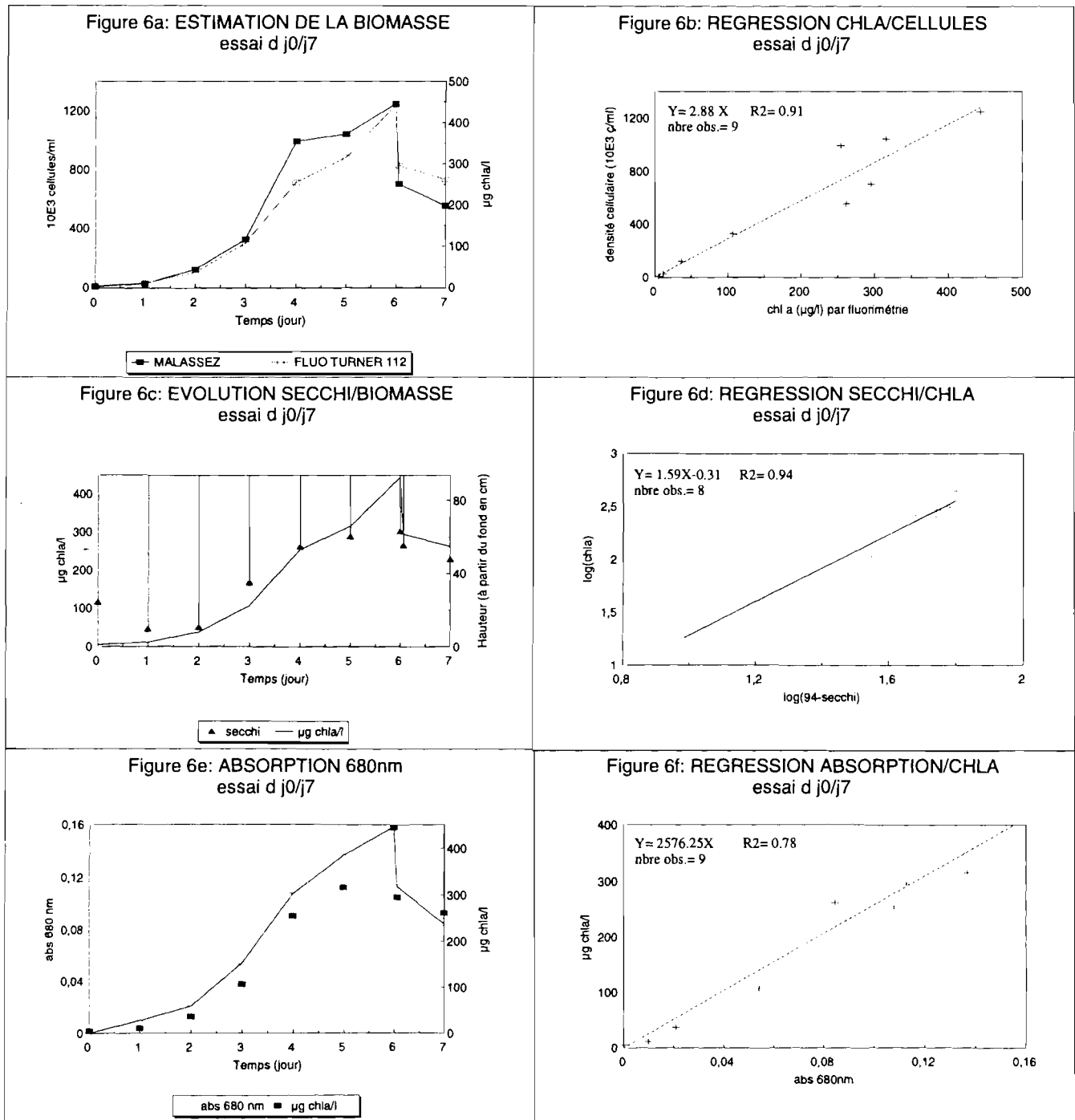


Figure 6: Essai D, estimation matinale de la biomasse microalgale par différentes techniques et corrélations linéaires établies entre la teneur en chlorophylle a et le dénombrement cellulaire, le disque de Secchi et la chlorophylle a, l'absorption à 680 nm et la chlorophylle a

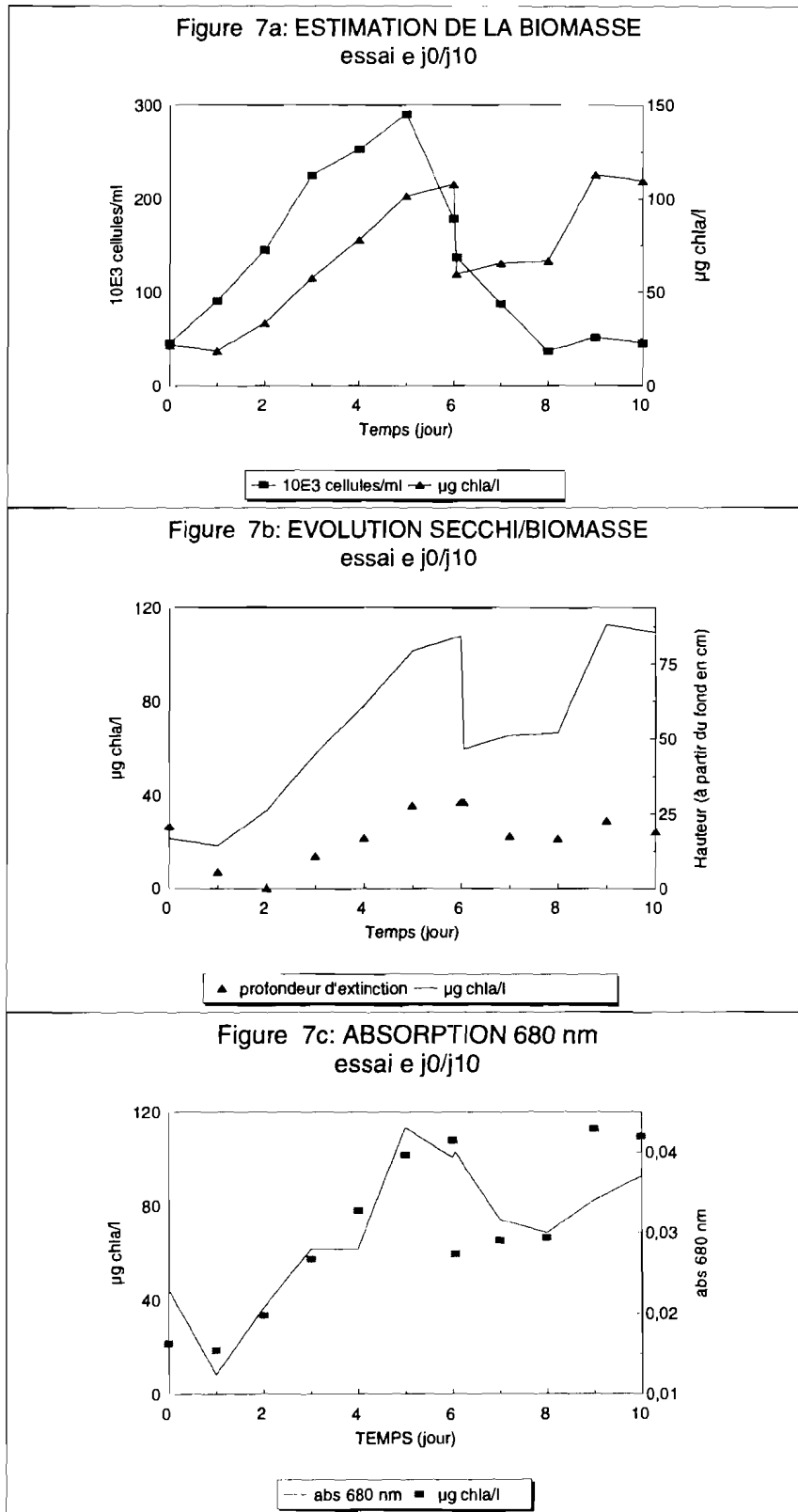


Figure 7: Essai E, estimation matinale de la biomasse microalgale par différentes techniques de mesure



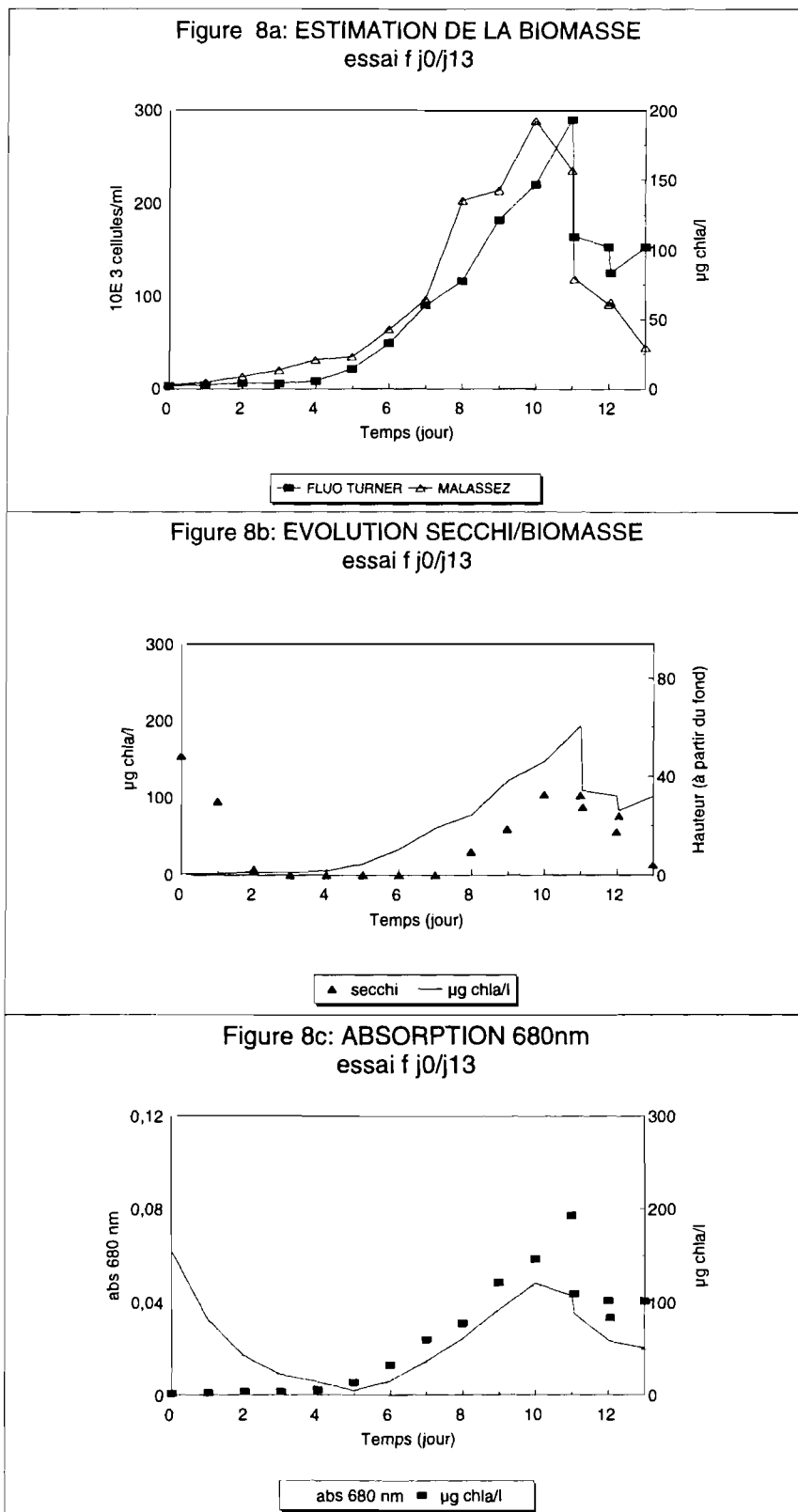


Figure 8: Essai F, estimation matinale de la biomasse microalgale par différentes techniques de mesure

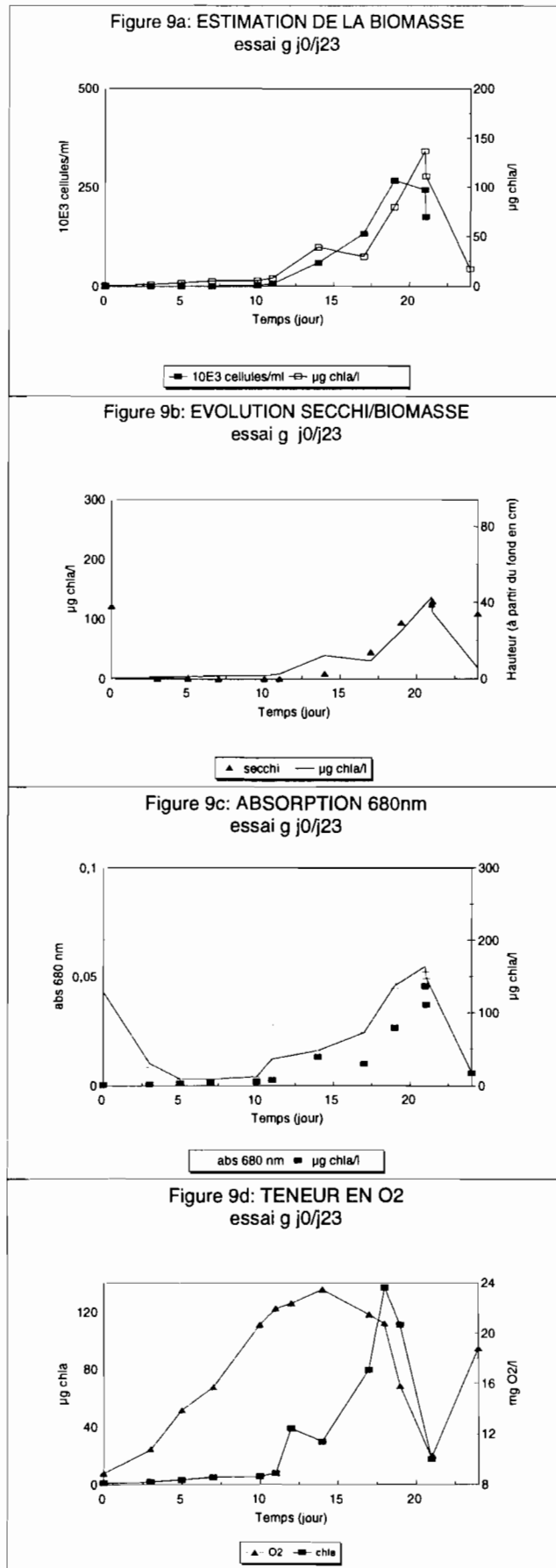


Figure 9: Essai G, sans aération, estimation de la biomasse matinale par différentes techniques et évolution de la concentration en oxygène dissous mesuré à 9h00

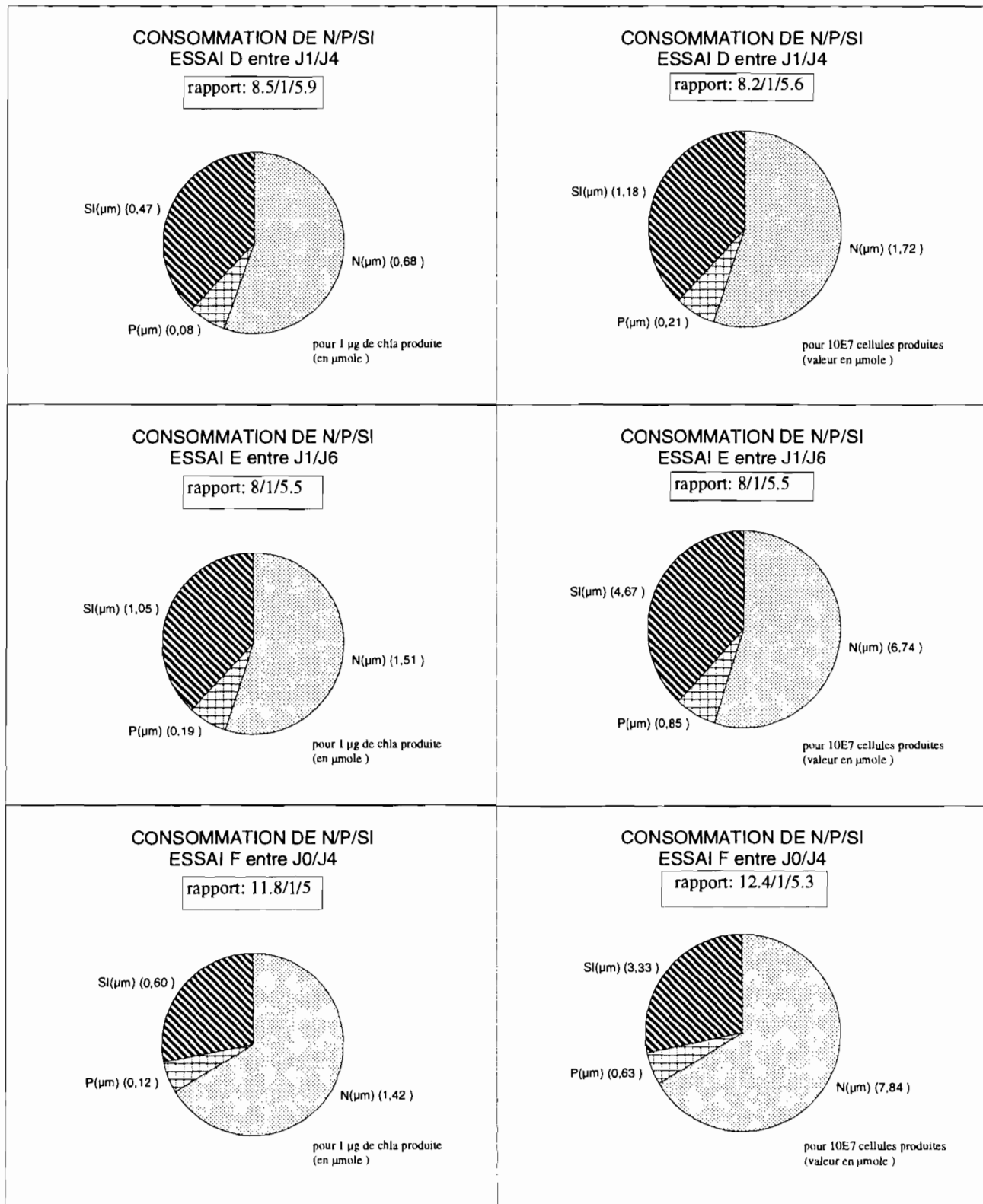


Figure 10 : Calcul des consommations N/P/Si pour les différents essais

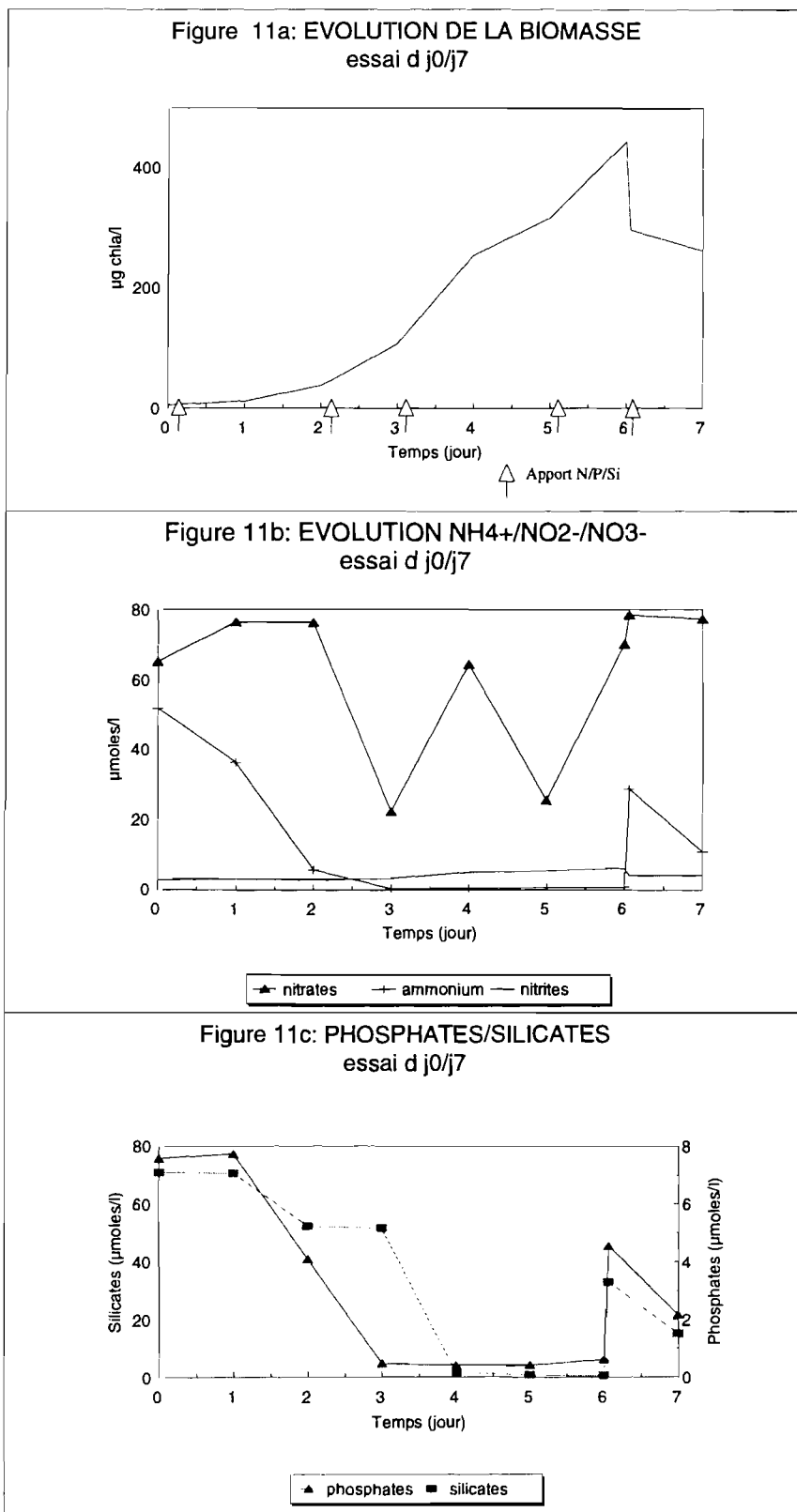


Figure 11: Essai D, analyses de la composition en N/P/Si

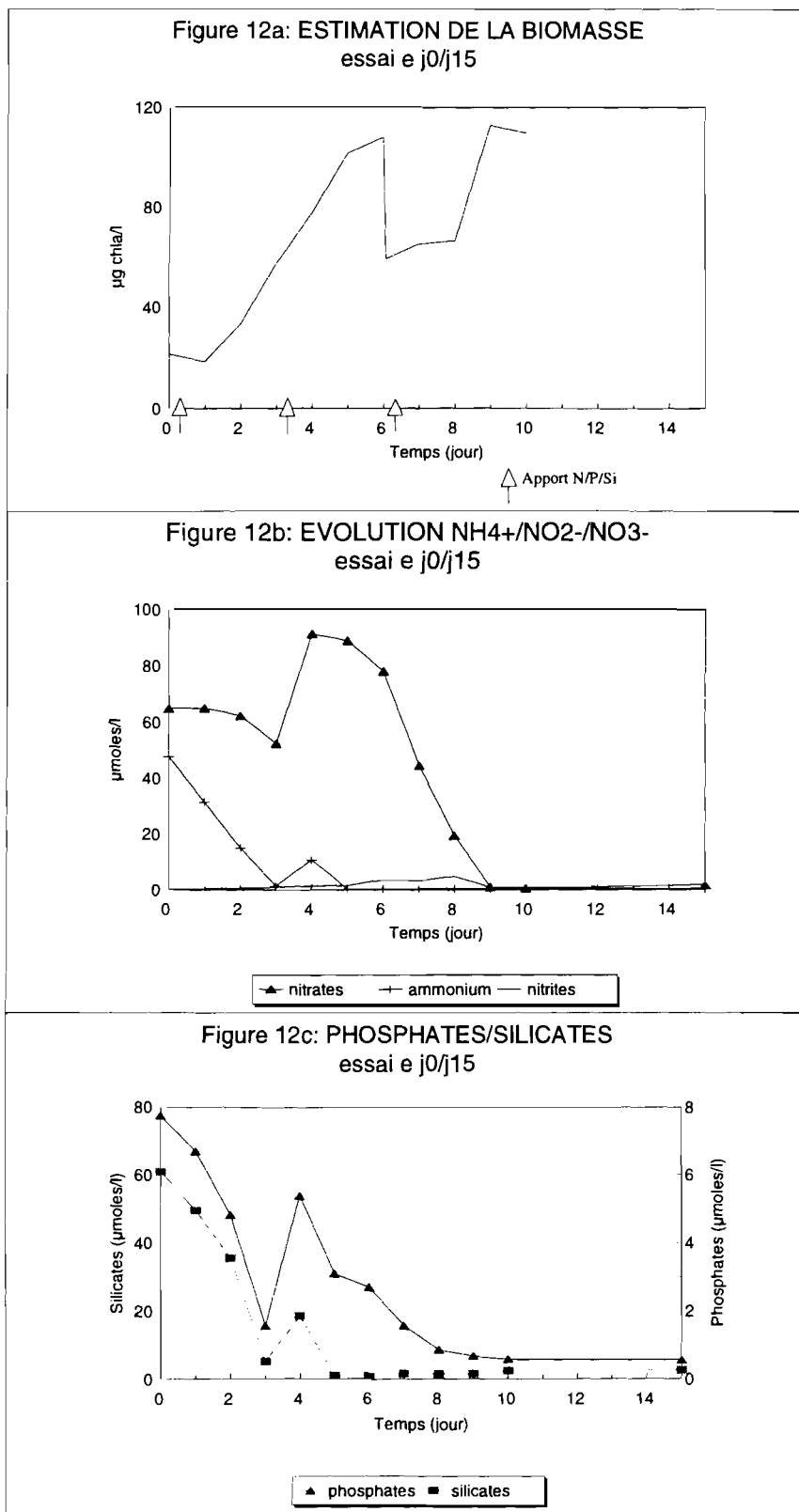


Figure 12: Essai E, analyses de la composition en N/P/Si

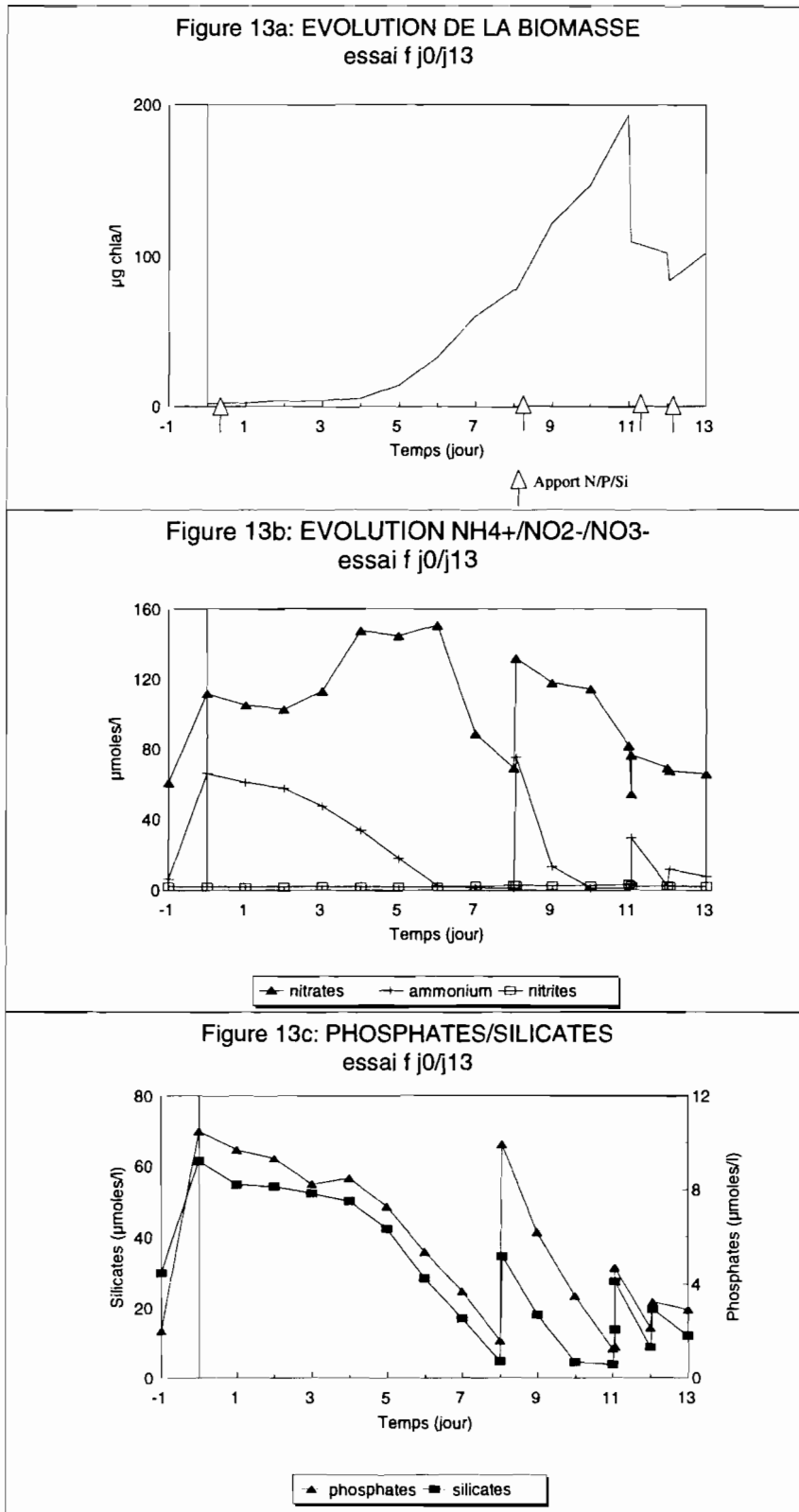


Figure 13: Essai F, analyses de la composition en N/P/Si

Figure 14: Comparaison des corrélations Cellules= f (chl a)

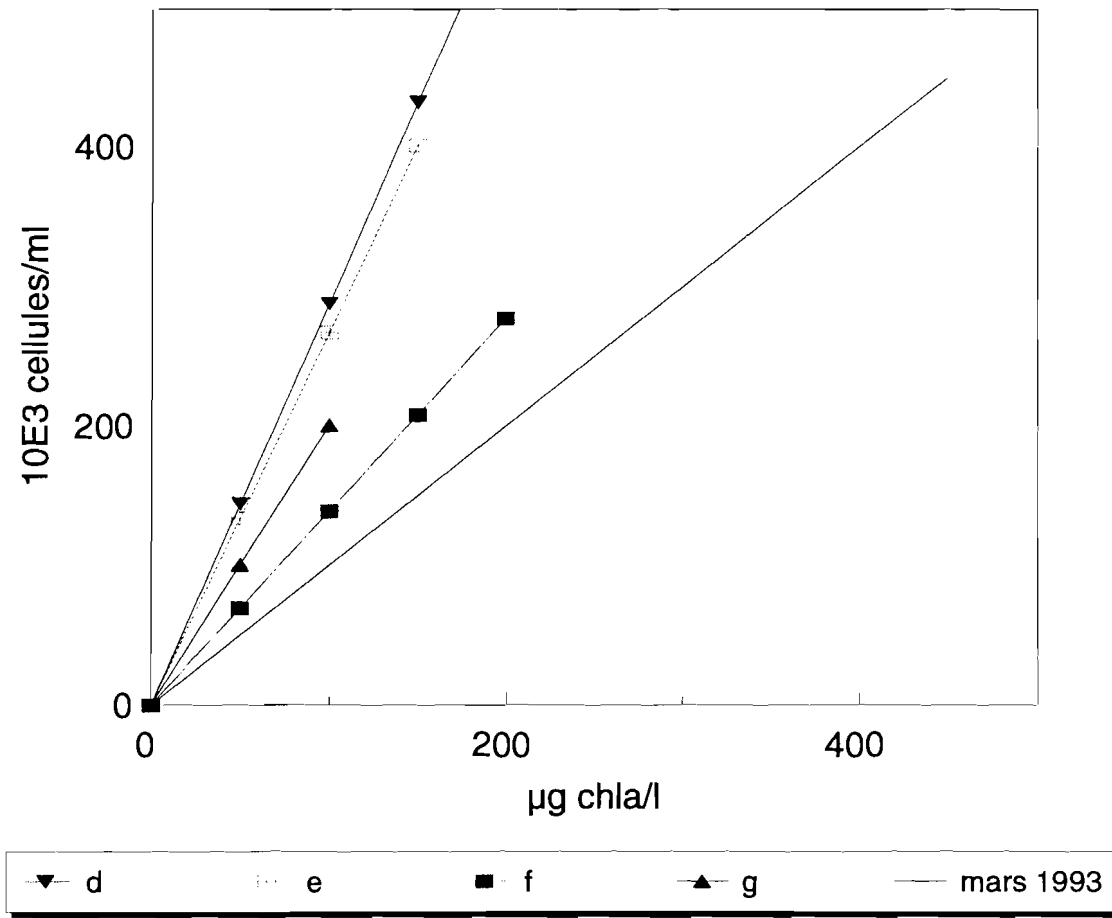


Figure 15: Evolution de la biomasse  
essai fer entre J0/J4

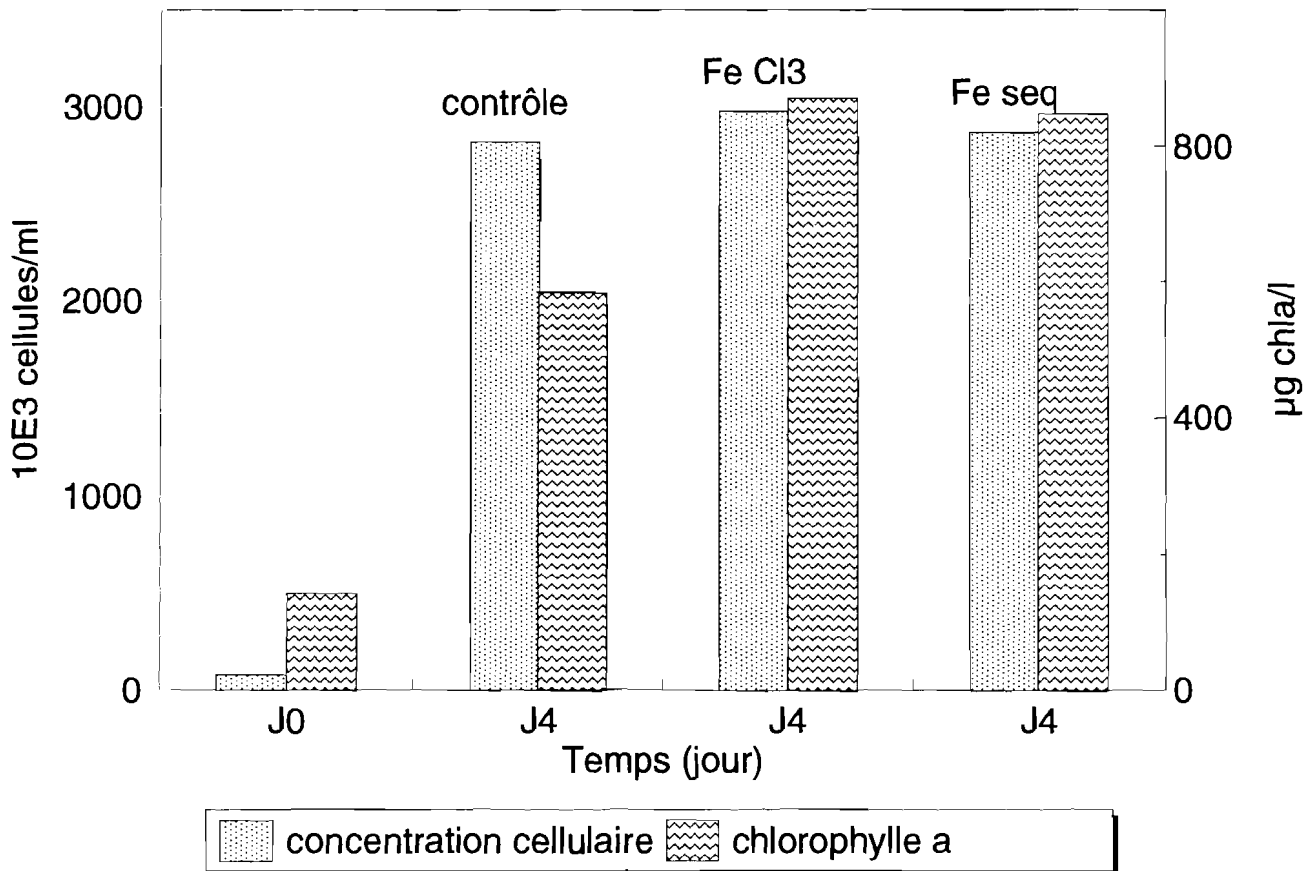




Figure 16: VARIATION DU pH  
essai fer J0/J6

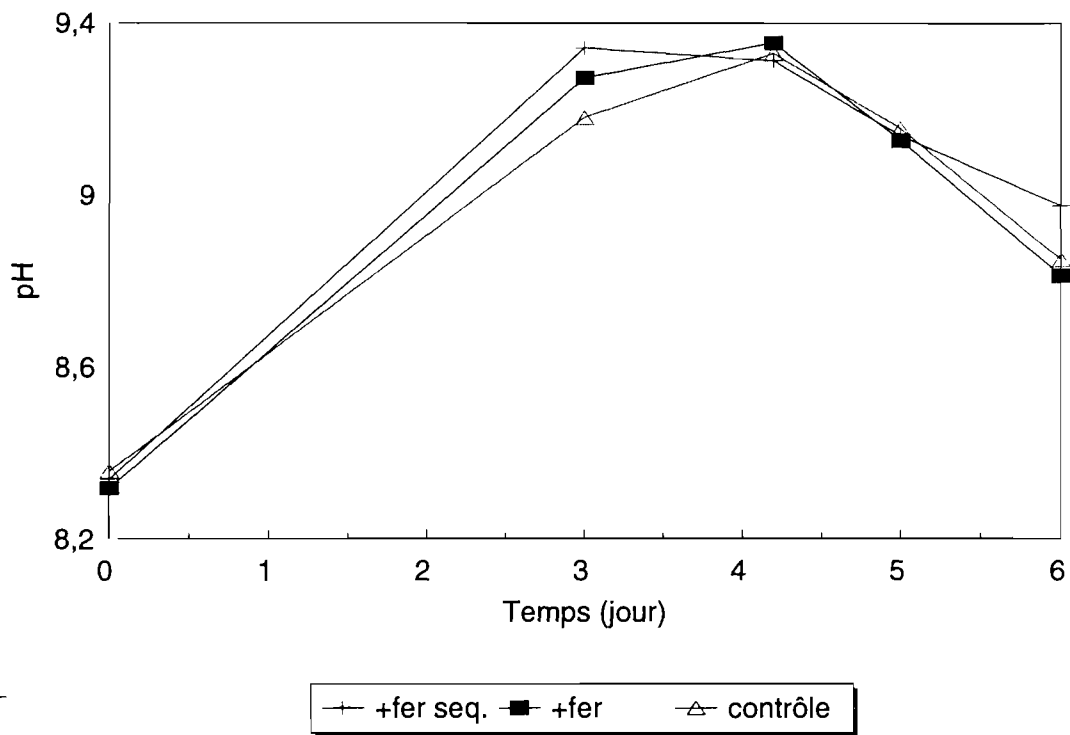
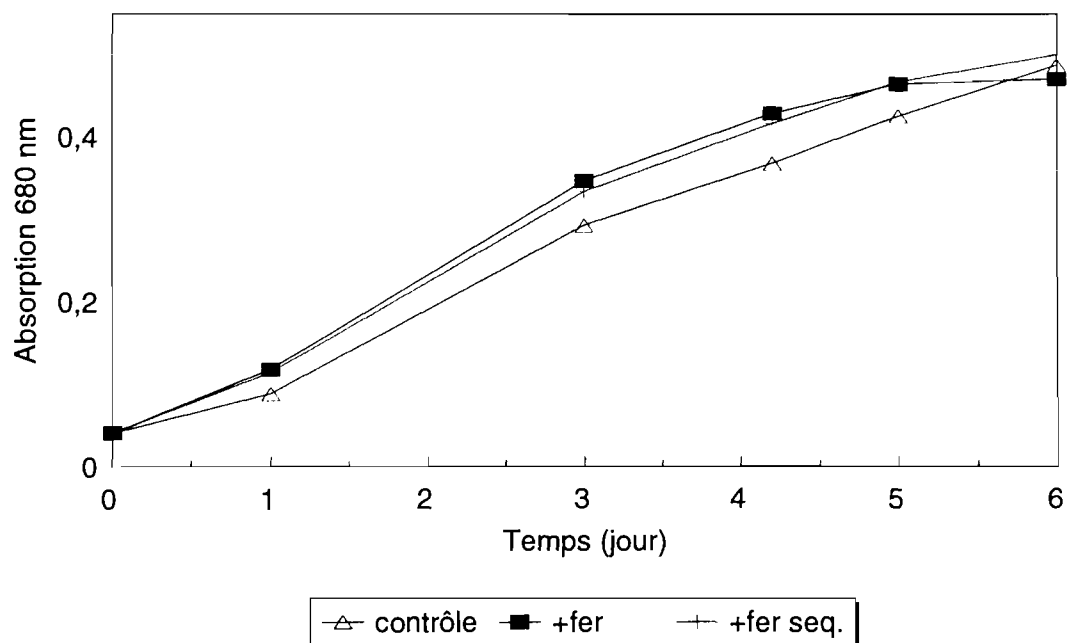


Figure 17: ESTIMATION DE LA BIOMASSE  
essai fer J0/J6



## **VI. ANNEXES**

## **ANNEXE 1**

### **ESTIMATION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE AU MULTISIZER PAR LA TECHNIQUE DE SAURIAU ET BAUD (1992)**

## **Annexe 1 : Estimation de la concentration cellulaire par la méthode de Sauriau & Baud utilisant un compteur de particules.**

Le Coulter counter "Multisizer" du CREMA estime la quantité de particules dans un volume déterminé et les répartit en classe de taille. Chaque classe de taille correspond à un des 256 canaux du compteur de particules.

### **Rappel de la méthode de calcul :**

1) Le compteur fournit des résultats exprimés en unité de volume d'une particule supposée sphérique.

La méthode de Sauriau & Baud (1992) permet d'évaluer la longueur de la particule (**l**) grâce à l'équation :

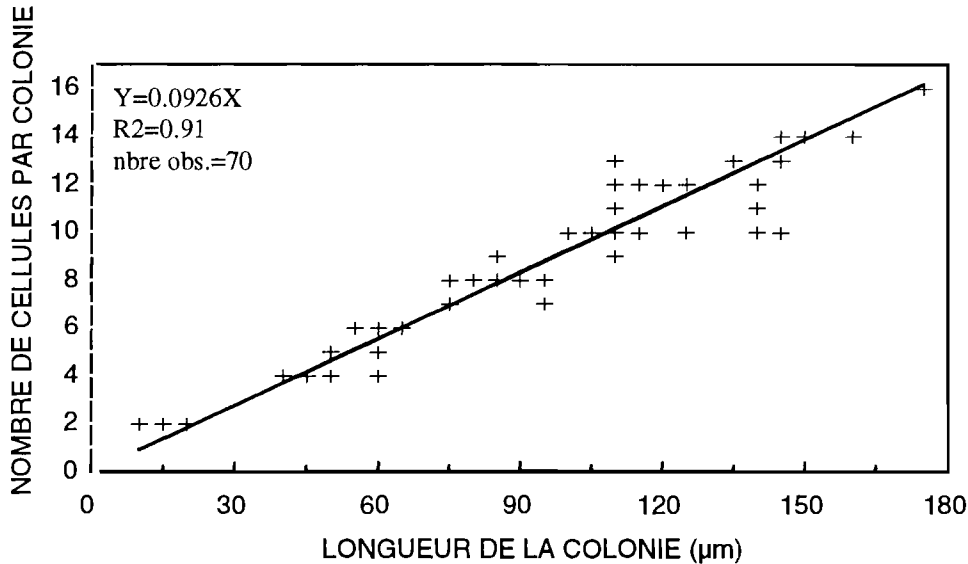
$$l = (D^3 \times 4) / (d^2 \times 6) \quad (1)$$

**D**: diamètre coulter de la particule,  
**d**: diamètre réel de la particule)

2) La diatomée S. costatum a la particularité de former des chaînes de cellules. Le compteur évalue la quantité de particules isolées dans un volume déterminé et non la quantité de cellules de S. costatum. Cela correspond donc au nombre de chaînes. Une régression "longueur de la chaîne/nombre de cellules" de nos essais a permis d'obtenir une équation reliant le nombre de cellules (**n**) à la longueur de la particule (**l**) :

$$n = 0,0926 l \quad (2)$$

## REGRESSION CELLULE/LONGUEUR DE CHAINE Skeletonema costatum essai G



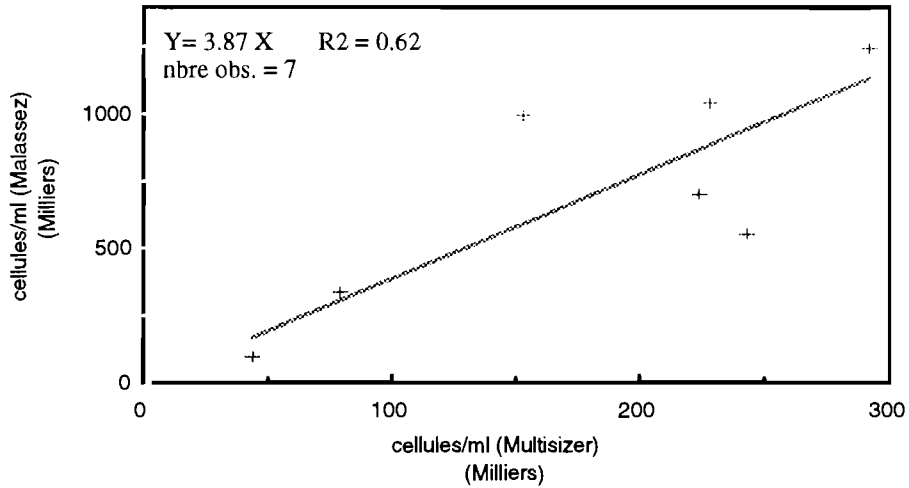
L'équation (3) est obtenue en remplaçant "1" dans l'équation (2) :

$$n = \frac{0,0926 (D^3 \times 4)}{d^2 \times 6} \quad (3)$$

### Premier essai d'application à nos cultures :

A l'essai D, les calculs ont été réalisés de j2 à j7, période à laquelle la population phytoplanktonique était essentiellement constituée de S.costatum. Une régression a été effectuée entre les résultats obtenus au Multisizer et ceux obtenus au comptage manuel. Le faible  $R^2$  de la droite de régression (0,62) prouve une mauvaise fiabilité des résultats. La source majeure d'erreur pourrait provenir du choix arbitraire du diamètre valvaire moyen des colonies (d). Nous avons choisi un diamètre moyen ( $d=4\mu\text{m}$ ) plus petit que Sauriau et Baud ( $d=4,5\mu\text{m}$ ), et malgré cela notre estimation par le Multisizer donne une sous évaluation. Il faut faire attention au fait que toute modification de (d) dans les calculs nécessite l'intégration des canaux correspondants, avec un déplacement du premier canal sélectionné, correspondant à des particules constituées d'une seule cellule individuelle.

Corrélation Malassez= F(Multisizer)  
Automne 1994



Pour avoir un résultat correct il serait souhaitable à l'avenir d'établir réellement la valeur de  $d$  par microscope à balayage, ce que nous n'avons pas pu faire pour des raisons de panne technique de l'appareil à l'époque des cultures.

Pour l'instant, le compteur de particules est un outil remarquable pour apprécier qualitativement la population phytoplanctonique. Il permet en effet pour des faibles densités de cellules de voir apparaître le pic cellulaire, en situant sur l'échelle des abscisses la taille des particules ramenées à la forme de sphères. Il est certain que cet appareil est beaucoup plus simple d'emploi avec des cellules individuelles. Il sera intéressant par exemple pour apprécier l'importance de la faune prédatrice du plancton sur l'eau brute ou sur un échantillon concentré si la densité des animaux est faible.

## **ANNEXE 2**

### **TABLEAU DES CALCULS DE CONSOMMATION DES NUTRIMENTS ESSENTIELS : AZOTE, PHOSPHORE, SILICE PAR UNITE DE CHLOROPHYLLE *a* ET PAR CELLULE.**

CONSOMMATION DE N/P/Si  
ESSAI D J0/J7

JOUR	10E3 C/ml	CHLA µg/l	NTOT.	P	Si	APPORT	NTOT.	P	Si
mesures à 9h00						à 9h30			
J0	8,50	5,17	119,83	7,58	71,01	500(N/P/Si)	120	13	45
J1	29,00	11,42	115,93	7,73	70,63		0	0	0
J2	98,00	37,05	84,92	4,09	52,29		0	0	0
J2P						500(Si)	0	0	45
J3	327,17	107,06	26,00	0,48	51,59		0	0	0
J3P						500(N/P)	120	13	0
J4	994,67	254,80	69,90	0,42	1,56		0	0	0
J5	1043,33	316,33	31,52	0,42	0,84		0	0	0
J5P						500(N/P/Si)	120	13	45
J6	1247,33	443,95	77,08	0,63	0,68		0	0	0
J6P		295,77	111,32	4,55	32,99	300(N/P/Si)	72	8	27
J7	553,83	262,16	92,14	2,17	15,20		0	0	0

(par ml)	PROD CEL. (c/ml)	PROD chla (µg/ml)	CONSO N (µm/ml)	CONSO P (µm/ml)	CONSO Si (µm/ml)
J1-J0	20500	0,006	0,004	0,005	0,000
J2-J1	69000	0,026	0,031	0,004	0,018
J3-J2	229170	0,070	0,059	0,004	0,046
J4-J3	667500	0,148	0,076	0,013	0,050
J5-J4	48660	0,062	0,038	0,000	0,001
J6-J5	204000	0,128	0,074	0,013	0,045
J7-J6	0	0,000	0,019	0,006	0,018

pour 1 µgchla	CONSO			RAPPORT
	N(µm)	P(µm)	Si(µm)	
J1-J0	0,62	0,84	0,06	0.7/1/0.1
J2-J1	1,21	0,14	0,72	8.5/1/5.0
J3-J2	0,84	0,05	0,65	16.3/1/12.7
J4-J3	0,52	0,09	0,34	5.8/1/3.8
J5-J4	0,62	0,00	0,01	/
J6-J5	0,58	0,10	0,35	5.8/1/3.5
J7-J6	/	/	/	/
J4-J1	0,68	0,08	0,47	8.5/1/5.9

10E7 cel.	CONSO			RAPPORT
	N(µm)	P(µm)	Si(µm)	
J1-J0	1,90	2,57	0,19	0.7/1/0.07
J2-J1	4,49	0,53	2,66	8.5/1/3.8
J3-J2	2,57	0,16	1,99	16.3/1/12.6
J4-J3	1,14	0,20	0,75	5.8/1/3.8
J5-J4	7,89	0,00	0,15	/
J6-J5	3,65	0,63	2,21	5.8/1/3.5
J7-J6	/	/	/	/
J4-J1	1,72	0,21	1,18	8.2/1/5.6



CONSOMMATION DE N/P/SI  
ESSAI E J0/J15

JOUR	10E3 C/ml	CHLA µg/l	NTOT. (µM)	P (µM)	SI (µM)	APPORT	NTOT. (µM)	P (µM)	SI (µM)
J0	45,83	21,59	112,98	7,75	60,92	500(N/P/Si)	120	13	45
J1	90,50	18,50	96,80	6,70	49,46		0	0	0
J2	145,17	33,45	77,74	4,80	35,49		0	0	0
J3	225,67	57,53	54,51	1,57	5,21		0	0	0
J3P						500(N/P/Si)	120	13	45
J4	253,00	78,16	103,18	5,38	18,53		0	0	0
J5	290,83	101,66	90,96	3,11	0,98		0	0	0
J6	179,00	108,01	81,75	2,70	0,82		0	0	0
J6P	137,17	59,61				100(N/P/Si)	24	2,6	9
J7	87,17	65,36	48,07	1,58	1,68		0	0	0
J8	36,67	66,55	24,76	0,86	1,47		0	0	0
J9	51,50	112,93	2,43	0,68	1,53		0	0	0
J10	45,33	109,61	1,12	0,58	2,52		0	0	0
J15	67,67		2,19	0,56	2,61		0	0	0

(par ml)	PROD CEL. (c/ml)	PROD chla (µg/ml)	CONSO N (µm/ml)	CONSO P (µm/ml)	CONSO SI (µm/ml)
J1-J0	44670	0,000	0,023	0,006	0,000
J2-J1	54670	0,015	0,019	0,002	0,014
J3-J2	80500	0,024	0,023	0,003	0,030
J4-J3	27330	0,021	0,071	0,009	0,032
J5-J4	37830	0,024	0,012	0,002	0,018
J6-J5	0	0,006	0,009	0,000	0,000
J7-J6	0	0,000	0,058	0,004	0,008
J8-J7	0	0,001	0,022	0,000	0,000
J9-J8	14830	0,046	0,001	0,000	0,000
J10-J9	0	0,000	0,000	0,000	0,000
J15-J10	22340				

CONSO pour 1 µgchla	N(µm)	P(µm)	SI(µm)	RAPPORT	THEORIE
J1-J0	0,00	0,00	0,00	/	
J2-J1	1,27	0,13	0,93	9.8/1/7.2	
J3-J2	0,96	0,13	1,26	7.4/1/9.7	
J4-J3	3,46	0,45	1,54	7.7/1/3.4	
J5-J4	0,52	0,10	0,75	5.2/1/7.5	
J6-J5	1,45	0,06	0,03	24.2/1/0.5	
J7-J6	0,00	0,00	0,00	/	
J8-J7	18,76	0,15	0,00	/	
J9-J8	0,03	0,00	0,00	/	
J10-J9	0,00	0,00	0,00	/	
J6-J1	1,51	0,19	1,05	8/1/5.5	9.3/1/3.5

CONSO 10E7 cel.	N(µm)	P(µm)	SI(µm)	RAPPORT
J1-J0	5,19	1,41	0,00	/
J2-J1	3,49	0,35	2,56	10/1/7.3
J3-J2	2,89	0,40	3,76	7.2/1/9.4
J4-J3	26,10	3,36	11,59	7.8/1/3.4
J5-J4	3,23	0,60	4,64	5.4/1/7.7
J6-J5	0,00	0,00	0,00	/
J7-J6	0,00	0,00	0,00	/
J8-J7	0,00	0,00	0,00	/
J9-J8	0,88	0,07	0,00	/
J10-J9	0,00	0,00	0,00	/
J6-J1	6,74	0,85	4,67	8/1/5.5

CONSUMMATION DE N/P/SI  
ESSAI F J0/J13

JOUR mesure à 9h00	10E3 C/ml	CHLA µg/l	NTOT. (µM)	P (µM)	SI (µM)	APPORT	NTOT. (µM)	P (µM)	SI (µM)
0	4,00	2,10	69,16	2,04	29,97		0,0	0,0	0,0
0P	4,00	2,10	179,77	10,48	61,55	500(N/P/Si)	120,0	13,0	45,0
1	7,00	2,54	168,03	9,71	54,80		0,0	0,0	0,0
2	13,00	4,00	162,33	9,33	54,23		0,0	0,0	0,0
3	20,00	3,87	162,81	8,24	52,3		0,0	0,0	0,0
4	31,00	5,49	183,82	8,48	50,13		0,0	0,0	0,0
5	34,50	14,17	164,77	7,29	42,28		0,0	0,0	0,0
6	64,00	32,73	155,76	5,37	28,46		0,0	0,0	0,0
7	96,83	60,14	92,44	3,72	17,14		0,0	0,0	0,0
8	203,17	77,66	73,45	1,62	4,74		0,0	0,0	0,0
8P	203,17	77,66	210,38	9,94	34,70	500(N/P/Si)	120,0	13,0	45,0
9	213,83	121,72	134,28	6,20	18,19		0,0	0,0	0,0
10	288,83	146,77	118,59	3,51	4,58		0,0	0,0	0,0
11	235,00	193,39	1,55	1,27	3,85		0,0	0,0	0,0
11D	118,83	109,58	3,46	1,36	13,96		0,0	0,0	0,0
11P	118,83	109,58	29,68	4,71	27,53	200(N/P/Si)	48,0	5,2	18,0
12	91,33	102,33	2,69	2,16	8,83		0,0	0,0	0,0
12P	93,50	83,62	13,92	3,27	19,71	100(N/P/Si)	24,0	2,6	9,0
13	44,50	102,02	18,35	2,93	12,10		0,0	0,0	0,0

(par ml)	PROD CEL. (c/ml)	PROD chla (µg/ml)	CONSO N (µm/ml)	CONSO P (µm/ml)	CONSO SI (µm/ml)
J1-J0	3000	0,000	0,012	0,003	0,007
J2-J1	6000	0,001	0,006	0,000	0,001
J3-J2	7000	0,000	0,000	0,001	0,002
J4-J3	11000	0,002	0,000	0,000	0,002
J5-J4	3500	0,009	0,019	0,001	0,008
J6-J5	29500	0,019	0,009	0,002	0,014
J7-J6	32830	0,027	0,063	0,002	0,011
J8-J7	106340	0,018	0,019	0,002	0,012
J9-J8	10660	0,044	0,076	0,007	0,027
J10-J9	75000	0,025	0,016	0,003	0,014
J11-J10	0	0,047	0,117	0,002	0,001
J12-J11	0	0,000	0,045	0,003	0,019
J13-J12	0	0,018	0,006	0,000	0,008

CONSO pour 1 µgchla	N(µm)	P(µm)	SI(µm)	RAPPORT	THEORIE
J1-J0	0,00	0,00	0,00	/	
J2-J1	3,90	0,26	0,39	15/1/1.5	
J3-J2	0,00	0,00	0,00	/	
J4-J3	0,00	0,00	1,34	/	
J5-J4	2,19	0,14	0,90	15.6/1/6.4	
J6-J5	0,49	0,10	0,74	4.9/1/7.4	
J7-J6	2,31	0,06	0,41	38.5/1/6.8	
J8-J7	1,08	0,12	0,71	9/1/5.9	
J9-J8	1,73	0,15	0,61	11.5/1/4	
J10-J9	0,63	0,11	0,54	5.7/1/4.9	
J11-J10	2,51	0,05	0,02	50.2/1/0.4	
J12-J11	0,00	0,00	0,00	/	
J13-J12	0,31	0,00	0,41	/	
J10-J4	1,42	0,12	0,60	11.8/1/5	9.3/1/3.5

CONSO 10E7 cel.	N(µm)	P(µm)	SI(µm)	RAPPORT
J1-J0	39,13	10,97	22,50	3.6/1/2
J2-J1	9,50	0,63	0,95	15/1/1.5
J3-J2	0,00	1,56	2,76	/
J4-J3	0,00	0,00	1,97	/
J5-J4	54,43	3,40	22,43	16/1/6.6
J6-J5	3,05	0,65	4,68	4.7/1/7.2
J7-J6	19,29	0,50	3,45	38.6/1/6.9
J8-J7	1,79	0,20	1,17	9/1/5.9
J9-J8	71,39	6,38	25,15	11.2/1/3.9
J10-J9	2,09	0,36	1,81	5.8/1/5
J11-J10	0,00	0,00	0,00	/
J12-J11	0,00	0,00	0,00	/
J13-J12	0,00	0,00	0,00	/
J10-J4	7,84	0,63	3,33	12.4/1/5.3

## RAPPORTS INTERNES DRV 1995

N°RI DRV	DEPARTEMENT	LABORATOIRE	AUTEURS	TITRE	DATE SORTIE	DIFFUS	NB PAGES	TIRAGE
95-01	DRV/RA	RA/PORT EN BESSIN	PH.Goulletquer, J.P.Joly, E.Le Gagneur, F.Ruelle	LA MYTILICULTURE DANS LA MANCHE, BIOMASSES EN ELEVAGE ET CROISSANCE DE MYTILUS EDULIS.L	fév-95	Libre	83	150
95-02	DRV/RA	CREMA	J.HUSSENOT, N.BROSSARD	PREMIERS ESSAIS AUTOMNAUX DE CULTURE EN MASSE (24m3) DE DIATOMEES SUR EAU DE MER FERTILISEE EN N, P, Si	jan-95	Rest	48	80