

CROISSANCE ET SPECTRE DE TAILLE DE TROIS ALGUES EN CULTURES
NON RENOUVELLEES, UTILISEES POUR LA NUTRITION DE LARVES DE
BIVALVES EN ECLOSERIE.

par

René ROBERT, Edouard HIS
I.F.R.E.MER., 33120 Arcachon (France)

ABSTRACT : THE GROWTH AND THE SIZE FREQUENCY OF THREE MARINE UNICELLULAR ALGAE, IN BATCH CULTURES, USED AS FOOD FOR LARVAE OF BIVALVE MOLLUSCS

A channelyser was used in conjunction with a Coulter counter to determine size frequency distributions and growth phases of three marine unicellular algae, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* and *Tetraselmis suecica*, over a 50 days period.

The exponential phase of growth lasts 11 days for the first two species and 13 days for the last one. *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* is the smallest algae with a mean cell diameter of 3.5 μm . *Isochrysis galbana*'s mean cell diameter is equal to 4.5 μm . Its size increases during the stationary phase of growth. *Tetraselmis suecica*'s mean cell diameter is equal to 8 μm . The same phenomena as described with *Isochrysis galbana* was equally observed.

RESUME :

Les différentes phases de croissance de trois algues unicellulaires marines utilisées en aquaculture, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* et *tetraselmis suecica* ont été étudiées pendant 50 jours au moyen d'un compteur de particules sous des conditions de cultures contrôlées. Parallèlement, le spectre de taille des cellules a été déterminé avec analyseur C 1000.

La phase exponentielle de croissance est de 11 jours chez les deux premières espèces, de 13 chez la dernière. *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* est la plus petite avec une taille moyenne de 3.5 μm . Son volume cellulaire est constant. La taille moyenne d' *Isochrysis galbana* est de 4.5 μm . Une augmentation du volume cellulaire est observée en phase stationnaire. La taille modale de *Tetraselmis suecica* est de 8 μm . Là encore, une augmentation du volume cellulaire apparaît en phase stationnaire.

Mots clés : algues unicellulaires, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*, *Tetraselmis suecica*, croissance, spectre de taille.

Key words : unicellular marine algae, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*, *Tetraselmis suecica*, growth, size frequency distribution.

INTRODUCTION

Une des difficultés rencontrées dans les écloséries de bivalves est la production en quantité suffisante d'algues servant à l'alimentation des larves. La taille cellulaire, la valeur nutritive et la facilité de production sont les trois principaux critères définissant la qualité d'une algue et permettant son utilisation en éclosérie. Si de nombreuses études ont été consacrées à ces deux derniers (CHRETIENNOT-DINET et al., 1986), les données concernant la taille sont fragmentaires. Or ce critère est important, puisque le faible

diamètre de la bouche et de l'oesophage des véligères, qui varie selon l'âge et l'espèce, empêche l'ingestion de particules d'un diamètre supérieur à 10µm (THORSON, 1950; FRITZ et al., 1984).

Dans le contexte d'une éclosure, la taille des espèces nanoplanctoniques n'est pas toujours connue de façon précise. En particulier, peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la distribution en taille des cellules et à son évolution au cours du temps. WILSON (1979) n'aborde ce problème que pendant la phase exponentielle de croissance. Les données d'ALFONSO et LEAL (1981) et de LEAL (1983) sont plus précises mais les observations n'ont été réalisées qu'en faibles volumes (250 ml), par mensuration au microscope optique de 120 cellules par échantillon.

Isochrysis galbana Parke, (Prymnesiophyceae), *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (Paulsen) Takano, (Bacillariophyceae) et *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher (Prasinophyceae) sont les trois espèces régulièrement produites dans notre laboratoire pour alimenter les élevages de larves de bivalves d'intérêt commercial : *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Mytilus galloprovincialis* (ROBERT et al., 1982). Conformément aux indications de HELM et MILLICAN (1977), les deux premières sont apportées quotidiennement dès le premier stade (larve D). *Tetraselmis suecica*, plus volumineuse, n'est utilisée que lorsque les véligères atteignent la taille moyenne de 120µm (formes umbonées).

Pour des études d'écophysiologie larvaire, il nous paraissait important de définir avec précision les modalités d'évolution des trois algues de références afin de standardiser leur utilisation à des fins expérimentales, le facteur nutritionnel ne devant pas interférer avec les phénomènes biologiques étudiés par ailleurs (action d'un micropolluant ou action des facteurs physicochimiques du milieu).

Les différentes phases de croissance, dans des volumes de production d'*Isochrysis galbana*, de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* et *Tetraselmis suecica*, ainsi que les spectres de tailles correspondants ont donc été recherchées.

MATERIELS ET METHODES

Les cellules d'*Isochrysis galbana* ont une forme elliptique, un peu tronquée à la partie antérieure et arrondie postérieurement. Elles possèdent deux flagelles égaux ou sub-égaux et un haptonème court.

(CHRETIENNOT-DINET et al., 1986) (fig. 1 et 2).

Chaetoceros calcitrans forma *pumilum* est une espèce induite de culture. Les valves sont elliptiques et les soies sont fines, droites et courtes (CHRETIENNOT-DINET et al., 1986) (fig. 1 et 2). Les cellules de *Tetraselmis suecica*, sont ovoïdes et comprimées latéralement. Leur base est arrondie et ne présente pas de torsion en vue dorsale. Le puits flagellaire est étroit, à deux lobes; quatre flagelles de même longueur ou un peu plus

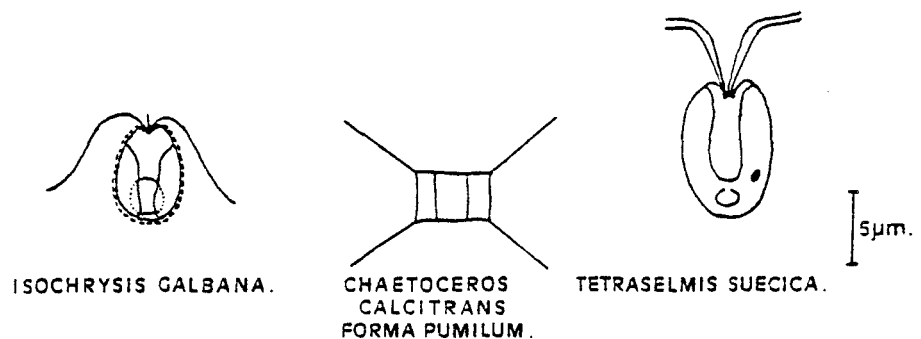


Figure 1 : Représentation schématique des trois algues fourrages (d'après CHRETIENNOT-DINET et al., 1986).

court que la cellule y sont insérés (CHRETIENNOT-DINET et al., 1986), (fig. 1 et 2).

Les souches utilisées dans cette étude sont monospécifiques mais non axéniques. L'entretien des cultures est assuré sur Erd-Schreiber (FØYN, 1934). La production en masse est effectuée selon la technique des volumes croissants (500 ml, 2l et 6l) (FLASSCH, 1978; LAING et HEPPER, 1983). Le milieu de Conway (WALNE, 1966) est utilisé, auquel on ajoute du métasilicate de sodium dans le cas des diatomés (LAING, 1979). Un abaissement de la salinité favorisant la productivité (LAING et UTTING, 1980), l'eau de mer servant à la confection des milieux, est d'abord ramenée à la valeur de 25%±1% par adjonction d'eau distillée.

Les algues sont maintenues en permanence sous une intensité lumineuse de 3 000 lux, en salle climatisée, à la température de 20°C±1°C.

Seules les cultures en ballons (6l) sont agitées par bullage d'air comprimé, filtré à 2µm.

Tous les deux jours, 20 ml de culture environ sont prélevés stérilement dans chacun des ballons et dilués en eau de mer filtrée à 0.2µm. Les concentrations cellulaires sont alors mesurées au compteur de particules, équipé d'un tube à orifice de 100µm d'ouverture.

Rappelons qu'en phase exponentielle, les algues se divisent dans un temps caractéristique appelé temps de division. Le développement de la population est de la forme :

$N_1 = N_0 \cdot e^{k_e t}$ où N_1 est le nombre de cellules au temps t_1 , N_0 celui au temps t_0 , k_e la constante de croissance et $t = t_1 - t_0$. Pour les cultures d'algues, il est usuel d'utiliser le logarithme de base 2, où : $k = \frac{3.32 \cdot \log \frac{N_1}{N_0}}{t_1 - t_0}$

(GUILLARD, 1979).

La distribution en taille des cellules est parallèlement observée à l'aide d'un analyseur C 1000 à 100 canaux, muni d'une table traçante. Les représentations graphiques sont réalisées à l'aide de deux mesures cumulatives par échantillon. Les volumes, minimum, moyen et maximum des populations nanoplanctoniques sont calculés par la formule suivante :

$$V = A \cdot I \cdot K_V \cdot \left(BCT + \frac{n \cdot \overline{w}}{100} \right)$$

A correspond à la valeur de l'atténuateur, affichée sur le compteur de particules, I est

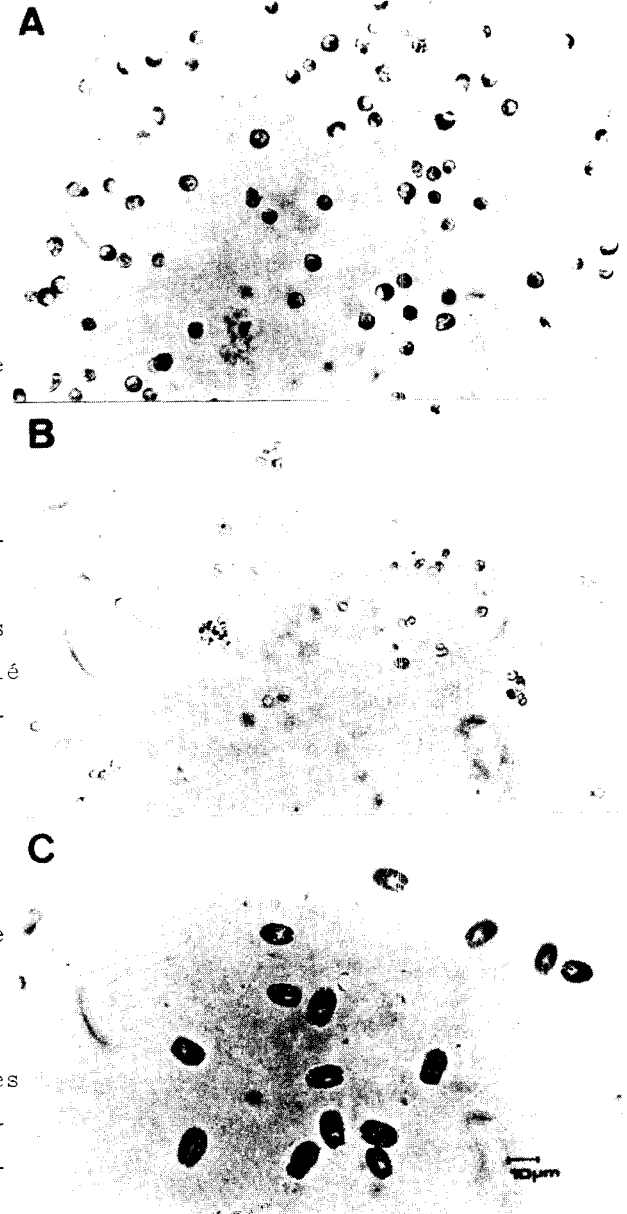


Figure 2 : Clichés photographiques (x400) d'*Isochrysis galbana* (A), de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* (B) et de *Tetraselmis suecica* (C) en cultures non renouvelées.

celle du courant d'ouverture, K_V est la constante propre à l'appareil, BCT représente la valeur du seuil bas, ww est la largeur de la fenêtre d'analyse et n est le numéro du canal où l'on désire acquérir l'information. Le C 1000 permet d'obtenir une distribution en volume. Si l'on assimile chacune des cellules algales à une sphère, il est possible d'extrapoler la distribution en taille au moyen de la formule suivante :

$$D = \sqrt[3]{\frac{6 \cdot V}{\pi}}$$

D représente le diamètre et V le volume cellulaire.

Pour chaque espèce, six cultures ont été suivies pendant une durée variant de 40 à 50 jours. Les valeurs obtenues ont permis l'établissement des courbes de croissance moyenne.

Pour chaque souche, la distribution en volume de la population était analysée tous les deux ou trois jours. Comme il nous semblait difficile d'établir une représentation graphique moyenne (peu de signification biologique et perte d'information), le spectre de taille présenté, pour chaque espèce, correspond à l'évolution d'une d'entre elles. Néanmoins les phénomènes décrits étaient similaires pour les six souches.

L'évolution de la salinité dans les ballons a été suivie par la méthode d'Harvey (STRICKLAND et PARSONS, 1972). Celle du Ph a été contrôlée à l'aide d'un Ph mètre LCD portatif.

RESULTATS

1. *Isochrysis galbana*

La croissance moyenne

permet d'observer l'existence d'une brève phase de latence, 2 jours, une phase exponentielle de 11 jours et une phase stationnaire très importante de 36 jours (fig. 3). Si nous nous plaçons dans l'hypothèse où les divisions se font à intervalle régulier, donc dans la phase linéaire de la courbe de croissance exponentielle,

$$K = \frac{3.32}{13-2} \cdot \log \frac{16}{1.6} = 0.302$$

Quinze mesures effectuées sur le même échantillon ont permis de noter une bonne reproductibilité du spectre quel que soit l'âge de la souche.

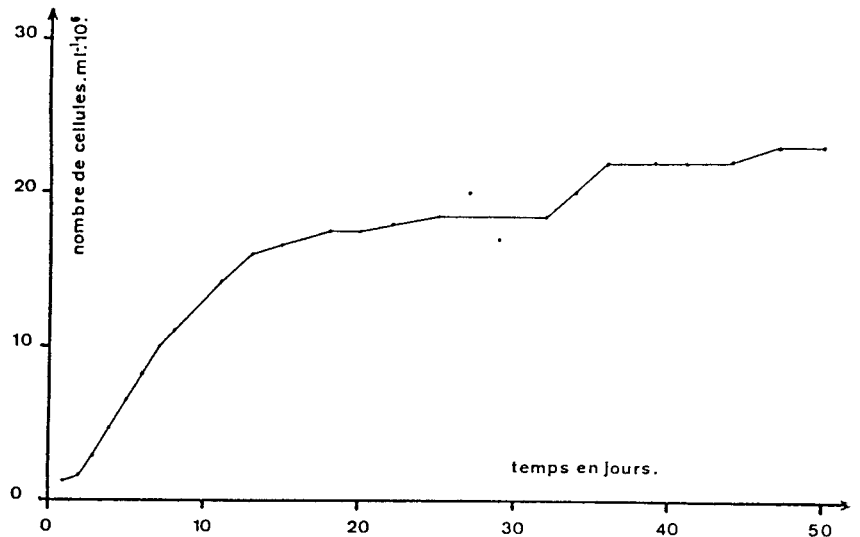


Figure 3 : Courbe de croissance moyenne de cultures d'*Isochrysis galbana* en ballon de 6l sur milieu de Conway.

L'analyse du volume cellulaire d'une même culture en fonction du temps permet de constater qu'il n'y a pas de changement notable du volume moyen de la population algale pendant les dix premiers jours, c'est à dire pendant la phase exponentielle de croissance (fig. 4). La distribution est unimodale, peu étendue, assimilable à une courbe de Gauss, malgré une légère dissymétrie. Le volume minimum est de $15\mu\text{m}^3$ ($D \approx 3\mu\text{m}$), le volume moyen est de $40\mu\text{m}^3$ ($D \approx 4.2\mu\text{m}$) et le volume maximum de $100\mu\text{m}^3$ ($D \approx 5.8\mu\text{m}$).

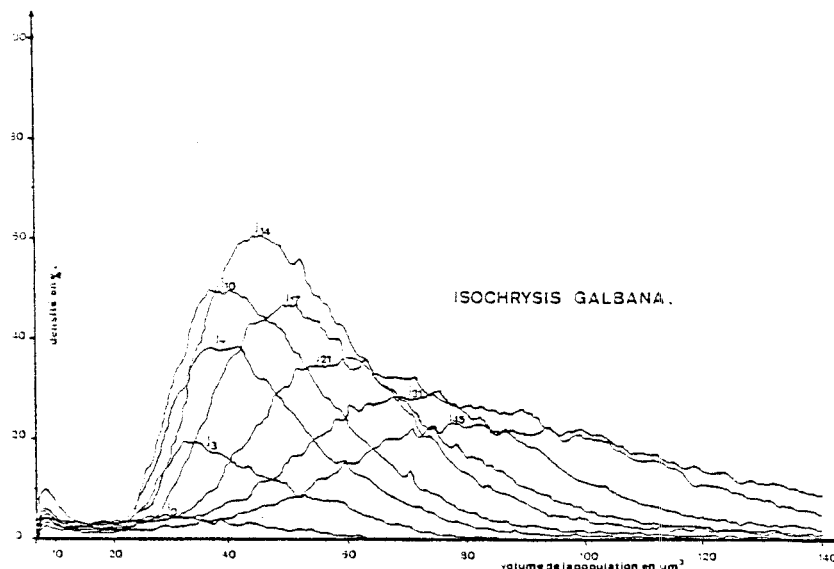


Figure 4 : Evolution de la distribution du volume cellulaire d'une population d'*Isochrysis galbana* dans le temps. (J_0 représente le jour de l'ensemencement de la culture, J_3 correspond au 3ème jour de la culture, J_7 au 7ème jour). Dilution 1/100ème.

A partir du quatorzième jour, (phase stationnaire), on observe un léger décalage du spectre vers les valeurs supérieures qui correspond à une augmentation du volume cellulaire. Ce phénomène s'accroît au cours du temps. De même la courbe de distribution s'étale. Ainsi après quarante cinq jours de culture, le volume minimum est de $25\mu\text{m}^3$ ($D \approx 3.6\mu\text{m}$), le volume moyen de $85\mu\text{m}^3$ ($D \approx 5.5\mu\text{m}$) et le volume maximum de $185\mu\text{m}^3$ ($D \approx 7\mu\text{m}$), (fig. 4).

Parallèlement la salinité du milieu augmente dans les ballons. Ainsi au septième, quatorzième, vingt et unième et quarante cinquième jour, celle ci est respectivement égale à 26%, 29%, 30% et 39,5%. Le Ph, quant à lui, reste stable, 8.50 à 8.80.

2. *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum*

Il n'existe pas de phase de latence (fig. 5). On observe une phase exponentielle d'une durée de onze jours, une phase stationnaire de vingt jours, une phase de décroissance rapide. Le nombre de divisions par jour $K = \frac{3.32 \cdot \log \frac{20}{1}}{11-0} = 0.393$.

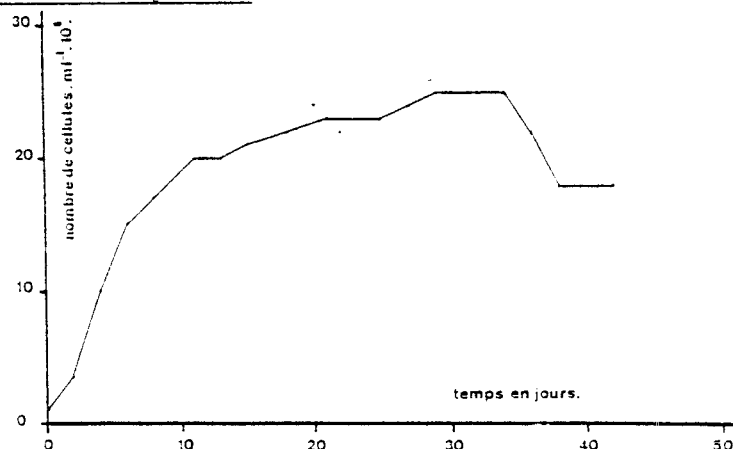


Figure 5 : Courbe de croissance moyenne de cultures de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* en ballon de 6l sur milieu de Conway.

Une bonne reproductibilité du spectre a été observée chez cette espèce quel que soit l'âge de la culture.

Il n'y a pas de changement notable de la distribution en phase exponentielle ou stationnaire (fig. 6). La distribution, étendue, est unimodale. Le volume minimum est de $5\mu\text{m}^3$ ($D \approx 2.1\mu\text{m}$), le volume moyen de $23\mu\text{m}^3$ ($D \approx 3.5\mu\text{m}$) et le volume maximum de $70\mu\text{m}^3$ ($D \approx 5.1\mu\text{m}$).

3. *Tetraselmis suecica*

Il existe une phase de latence bien marquée de trois jours, une phase exponentielle de treize jours et une phase stationnaire en dents de scie de vingt trois jours (fig. 6). La phase de décroissance n'est pas atteinte après trente neuf jours de culture. Le taux journalier de division $K = \frac{3.32}{16-3} \cdot \log \frac{26}{3.1} = 0.236$

Quinze mesures réalisées sur le même échantillon ont permis de constater une non reproductibilité du spectre. La distribution est identique au cours des cinq premières mesures, une augmentation du volume cellulaire lors des cinq lectures suivantes puis une diminution lors des cinq dernières sont observées. Le phénomène a été également constaté sur des échantillons formolés ou fixés au lugol. La salinité de l'eau de dilution n'intervient pas. Seules les deux premières mesures ont donc été prises en compte.

Il n'y a pas de changement notable de la distribution pendant les dix huit premiers jours, excepté au quatorzième, où le volume cellulaire moyen diminue légèrement (fig. 7). La distribution est unimodale et peu étendue. Le volume minimum est de $100\mu\text{m}^3$ ($D \approx 5.8\mu\text{m}$), le volume moyen de $240\mu\text{m}^3$ ($D \approx 7.8\mu\text{m}$) et le volume maximum de $550\mu\text{m}^3$ ($D \approx 10.15\mu\text{m}$).

Au delà du dix huitième jour, le mode se déplace progressivement vers les grandes tailles; il y a donc augmentation du volume cellulaire en phase stationnaire. Ainsi, après quarante deux jours de culture, le volume minimum est de $200\mu\text{m}^3$ ($D \approx 7.26\mu\text{m}$),

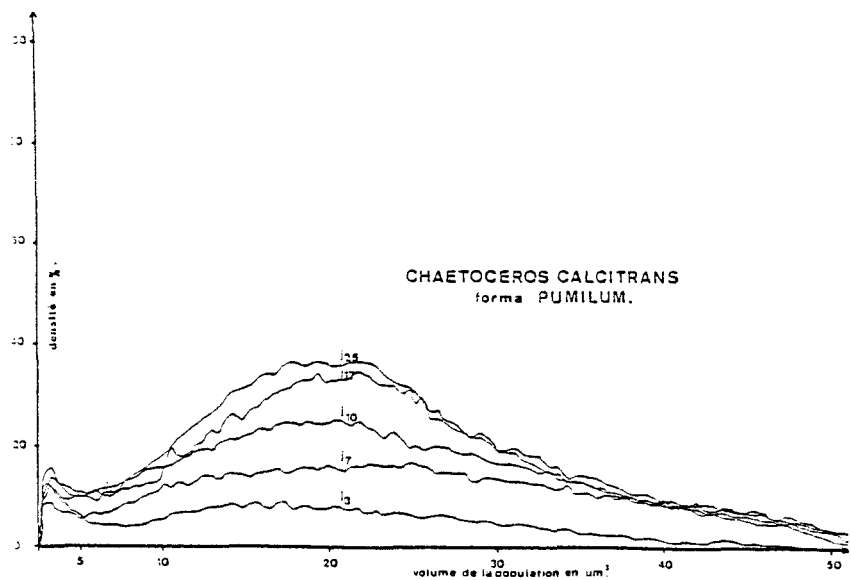


Figure 6 : Evolution de la distribution du volume cellulaire d'une population de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* dans le temps. (Jx représente le Xème jour de culture). Dilution 1/100ème.

le volume moyen de $380\mu\text{m}^3$ ($D=9\mu\text{m}$) et le volume maximum de $900\mu\text{m}^3$ ($D=12\mu\text{m}$). Parallèlement la salinité augmente dans les cultures.

Ainsi au septième, quatorzième, vingt huitième et quarante deuxième jour, celle ci est respectivement égale à 28,5%, 29,5%, 37% et 42,5%.

DISCUSSION

Une bonne croissance de *Isochrysis galbana* est obtenue et la phase stationnaire est atteinte en treize jours avec une densité cellulaire moyenne de $1.6 \cdot 10^7$ cellules. ml^{-1} . Des valeurs voisines sont rapportées dans la littérature (WALNE, 1966; FLASSCH, 1973; LE BORGNE et al., 1978; WILSON, 1978; BAYNES et al., 1979). La plus forte densité cellulaire notée est de $2.3 \cdot 10^7$ cellules. ml^{-1} , valeur proche de celle de différents auteurs (KAIN et FOGG, 1958; WISELY et PURDAY, 1961). Par contre, le nombre de divisions cellulaires par jour n'est que de 0.302, alors que KAIN et FOGG (1958) signalent des valeurs de 0.36 à 0.79. La phase exponentielle observée ici est relativement longue, les volumes cellulaires minimum et moyen étant du même ordre que ceux présentés par WILSON

(1978). Par contre, la taille maximum de $6\mu\text{m}$ est supérieure à celle qui est rapportée par cet auteur ($5\mu\text{m}$). Une augmentation progressive du volume cellulaire est notée en phase stationnaire (passage à $5.5\mu\text{m}$ pour la taille moyenne le quarante cinquième jour de culture). Les valeurs rapportées dans la littérature, $5.5\mu\text{m}$ (DAVIS et GUILLARD, 1958), $5-6\mu\text{m}$ (BAYNE, 1965), $4.8\mu\text{m}$ (WALNE, 1970) sont très voisines. Il est vraisemblable

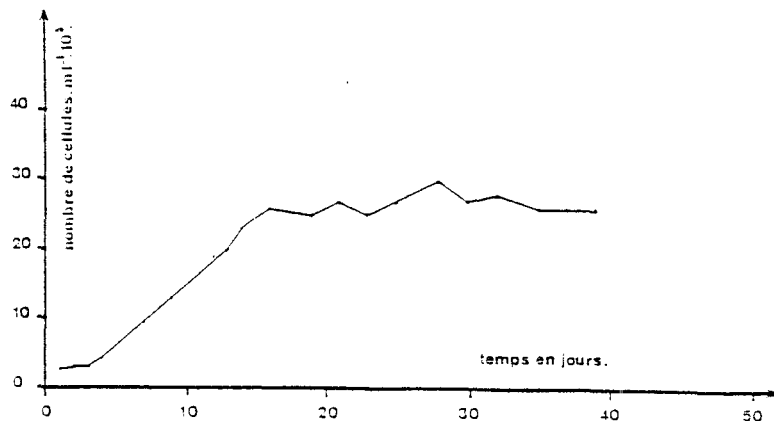


Figure 7 : Courbe de croissance moyenne de cultures de *Tetraselmis suecica* en ballon de 6l sur milieu de Conway.

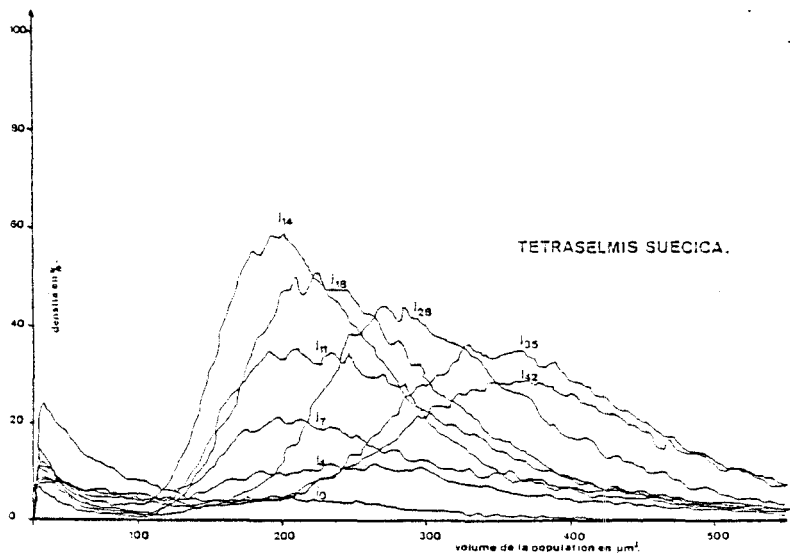


Figure 8 : Evolution de la distribution du volume cellulaire d'une population de *Tetraselmis suecica* dans le temps. (J_0 représente le jour de l'ensemencement de la culture, J_x correspond au x ème jour de culture.. Dilution 1/20ème.

qu'elles correspondent également à des observations effectuées pendant cette même phase stationnaire. Une bonne croissance de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* est obtenue; la densité cellulaire est de $2 \cdot 10^7$ cellules . ml⁻¹ au bout de onze jours. Toutefois de meilleurs résultats sont signalés par LAING (1979), $2,5 - 3 \cdot 10^7$ cellules par ml⁻¹ en quatre jours. Ceux-ci ont été obtenus par insufflation de 1% de CO₂ et par abaissement de la salinité des milieux de culture à 15%. Des valeurs aussi élevées ont cependant été obtenues quand l'inoculum servant à ensemercer les ballons de 6 l avaient poussé sur milieu d'Erd-Schreiber et non sur milieu de Conway.

Pendant les différentes phases de croissance, le mode de la distribution est stable. Il se situe à 3.5µm, valeur voisine des 3µm rapportée par ENRIGHT et al., (1986), mais différente de celle de WALNE (1970) : 4.8µm.

Une bonne croissance est également obtenue chez *Tetraselmis suecica*. La phase stationnaire est atteinte en seize jours avec des concentrations cellulaires de $2.6 \cdot 10^5$ cellules.ml⁻¹. L'aspect en dents de scie observé en phase stationnaire s'explique probablement par la tendance de l'algue à adhérer fortement aux parois des ballons, ce qui engendre des difficultés de prélèvements homogènes avant lecture. Des densités cellulaires du même ordre sont signalées dans la littérature (FLASSCH, 1978; LE BORGNE, 1978; EPIFANIO, 1979). Le spectre de répartition en taille des cellules est stable jusqu'au début de la phase stationnaire; le diamètre est compris entre 6 et 10µm avec une valeur modale de 8µm; puis il augmente progressivement comme chez *Isochrysis galbana*. Les valeurs notées sont comparables à celles que rapporte WALNE (1970), diamètre égal à 8.6µm. Par contre, celles de LE BORGNE et al., (1978), 14µm, semblent surestimées.

Isochrysis galbana et *Tetraselmis suecica* présentent une augmentation non négligeable de leur volume cellulaire en fin de phase de croissance algale. Comme toute cellule végétale libre, les flagellés se divisent par bipartition et augmentent de volume avant la phase de scissiparité. Il n'est donc pas surprenant, qu'en phase stationnaire au cours de laquelle la division cellulaire est ralentie, les cellules algales soient plus volumineuses. A l'inverse, le volume cellulaire de *Chaetoceros calcitrans* forma *pumilum* reste constant. Comme toutes les diatomés, elle possède un frustule qui constitue un exosquelette réduisant les variations du volume cellulaire. LAING (1985) constate néanmoins que la taille des cellules de cette Bacillariophyceae augmente lorsque la concentration en silice diminue. Plus le milieu est riche en cet élément plus la taille des cellules est petite. Dans nos conditions expérimentales le métasilicate de sodium est en excès ce qui se traduit par la présence d'un important précipité au fond des ballons. Ce sel n'étant pas limitant, les phénomènes décrits par cet auteur n'ont pas été retrouvés.

Nos résultats sont par contre en opposition avec ceux d'ALFONSO et LEAL, (1981) et LEAL (1983) qui considèrent que le volume cellulaire maximum est atteint en fin de phase exponentielle. Rappelons que leurs observations ont été réalisées, en faible volume, au microscope optique, sur des échantillons de 120 cellules seulement. La distribution du volume cellulaire effectuée au C 1000 concerne 10^4 à 10^5 cellules.

L'augmentation du volume cellulaire observée chez les flagellés compense largement le phénomène d'osmorégulation qui aurait dû se traduire, au contraire, par une diminution de la taille des organismes. En effet, une augmentation de la salinité en fonction de l'âge des cultures a été notée (évaporation).

L'augmentation du volume cellulaire des algues, liée au ralentissement des divisions, peut être indirectement due à la limitation de la croissance par certains éléments : épuisement d'un ou plusieurs nutriments.

Au cours de la phase stationnaire où l'on note un accroissement de la taille des flagellés, EPIFANIO (1979) met en évidence une modification de la composition biochimique des algues fourrages.

On sait que la microflore bactérienne associée augmente avec l'âge des cultures (PRIEUR et LEROUX, 1975) et que, lorsque le niveau bactérien devient trop élevé, des mortalités affectent les élevages larvaires (CALABRESE et DAVIS, 1970). Ceci explique les résultats généralement plus satisfaisants que l'on obtient en écloserie de bivalves lorsque des cultures en phase exponentielle sont employées. L'utilisation des algues en phase linéaire de croissance est donc intéressante à double titre : stabilité des tailles et présence réduite de bactéries.

Afin de répondre aux objectifs définis antérieurement le schéma d'utilisation de ces trois algues dans notre laboratoire est le suivant : emploi des cultures après une semaine de croissance en ballon et renouvellement des souches tous les quatre jours. On se trouve donc toujours en phase exponentielle pendant laquelle la taille des cellules est stable chez les trois espèces.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALFONSO, E., et LEAL, S., 1981. Influencia de diferentes factores en el volumen celular de algas planctónicas en cultivo. *Revista de Investigaciones Marinas*, 2 (1) : 3-26.
- BAYNE, B.L., 1965. Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L). *Ophelia*, 2 : 1-47.
- BAYNES, S.M., EMERSON, L., et SCOTT, A.P., 1979. Production of algae for use in the rearing of larval fish. *Fisheries Research Technical Report*, 53 : 13-18.
- CALABRESE, A., et DAVIS, H.C., 1970. Tolerances and requirements of embryos and larvae of bivalve molluscs. *Helgol. Wiss. Meeresunters*, 20 : 553-564.
- CHRETIENNOT-DINET, M.J., ROBERT, R., et HIS, E., 1986. Utilisation des "algues fourrages" en aquaculture. *Année biologique*, 25 (2) : 97-119.
- DAVIS, H.C., et GUILLARD, R.R., 1958. Relative value of ten genera of micro-organisms as food for oyster and clam larvae. *U.S. Fish. Wildl. Serv. Fish. Bull.*, 58 : 293-304.
- EPIFANIO, C.E., 1979. Growth in bivalve molluscs : nutritional effects of two or more species of algae in diets fed to the american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) and the hard clam *Mercenaria mercenaria* (L). *Aquaculture*, 18 : 1-12.

- FLASSCH, J.P., 1978. Production d'algues unicellulaires à des fins d'aquaculture. 4 : 1-11.
- FØYV, B., 1934. Lebenszyklus, Cytologie und Sexualität der Chlorophyceen *Cladophora subriana* Kutzing. *Arch. Protistenk.*, 33 : 1-56.
- FRITZ, L.W., LUTZ, R.A., FOOTE, M.A., VANDOVER, C.L., et EWART, J.W., 1984. Selective feeding and grazing rates of oyster (*Crassostrea virginica*) larvae on natural phytoplankton assemblages. *Estuaries*, 7 : 513-518.
- GUILLARD, R.R.L., 1973. Division rates. in Handbook of Phycological methods. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, London, New-york, New-Rochelle, Melbourne, Sidney : 289-313.
- KAIN, J.M., et FOGG, G.E., 1958. Studies on the growth of marine phytoplankton. II. *Isochrysis galbana* Parke. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 37 : 781-788.
- LAING, I., 1979. Recommended procedures for the culture of *Chaetoceros calcitrans*. *Fisheries Research Technical Report*, 53 : 8-12.
- LAING, I., 1985. Growth response of *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae) in batch culture to a range of initial silica concentrations. *Marine Biology*, 85 : 37-41.
- LAING, I., et UTTING, S.D., 1980. The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture*, 21 : 79-86.
- LAING, I., et HEPPEL, B.T., 1983. A simple method for the production of marine algae in polyethylene bags. *Fisheries Notice*, number 73 : 1-11.
- LEAL, S., 1983. Volumen celular de dos especies de algas planctónicas en cultivo. *Revista de Investigaciones Marinas*, 4 (2) : 17-39.
- LE BORGNE, Y., MARIN, J., et VERGONZANNE, G., 1978. Cultures et élevages de masse dans le contexte d'une éclosure-nurserie de mollusques bivalves, les productions phytoplanktoniques et le grossissement des post-larves. *Actes de Colloques, CNEOX*, 7 : 105-154.
- PRIEUR, D., et LEROUX, S., 1975. Comparative growth of some algal populations and their associated bacteria in laboratory cultures. *10 th. Eur. Symp. Mar. Biol.*, 1 : 345-355.
- ROBERT, R., HIS, E., et MAURER, D., 1982. L'unité d'écophysiologie et de molysmologie larvaire des bivalves d'intérêt commercial du laboratoire I.S.T.P.M. d'Arcachon. *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, 45 (3) : 197-209.
- STRICKLAND, J.D.H., et PARSONS, T.R., 1968. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.* 167 : 1-131.
- THORSON, G., 1950. Reproduction and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.*, 125 : 1-45.
- WALNE, P.R., 1966. Large Scale culture of larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery Investigations. Série II.* 25 (4) : 1-53.
- WALNE, P.R., 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalve of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest.*, London, Ser. 2, 26 : 1-62.
- WILSON, J.H., 1979. Observations on the grazing rates and growth of *Ostrea edulis* L. larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 38 : 187-199.
- WISELY, B. et PURDAY, C., 1961. An algal mass-culture unit for feeding marine invertebrate larvae. *Tech. Pap. Div. Fish. Oceanogr. CSIRO, Aust. N° 12.*