

Effet de l'apport de fer et sa relation avec un chélateur (EDTA) sur la croissance et la composition minérale des algues (*platimonas suecica*) et des rotifères (*Brachionus plicatilis*)

par

Lassâad Chouba*, Jhon Henri Robin**

* Institut National Scientifique et Technique d'Océanographie et de Pêche Salammbô

**IFREMER Centre de Brest ; 29270 Plouzané - France

ملخص

محور هذه الدراسة يتلخص في كيفية الدمج والتأثيرات الناتجة عن تغيير كميات المعادن (الحديد، الزنك، النحاس والمنقّاتاز) بالنسبة للطحالب المجهرية (بلاتيموناس سيسك) والروتيفار (براكيونيس بليكاتيليس). ان الكميات الوافرة من الكيلاتير (EDTA) تنقص من تولد الطحالب والروتيفار المزروعة بطريقة Bloom. كما نلاحظ ايضا نقصا في دمج كميات المعادن في الطحالب. وهذا له انعكاس كبير على دمج الزنك في الروتيفار. ان النمو الاقصى لبلاتيموناس سيسك قد حصل بالوسط الزراعي الذي يحتوي على 267 ميكروغرام من الحديد بالتر 4,97 ملغ بالتر في EDTA. هذا الوسط اعطى ايضا احسن نمو الروتيفار. ان دمج الحديد في الطحالب مرتبط بالكمية الموجودة بالوسط الزراعي، كما لا يوجد اي ارتباط ظاهر بالنسبة للكميات المختلفة من الحديد وكميات الزنك، النحاس والمنقّاتاز. ان كميات المعادن الموجودة في الروتيفار تتأثر بكميات الحديد المستهلكة من طرف الطحالب كما نلاحظ ايضا ان الكميات المرتفعة المستعملة في هذه التجارب تقوي ادماج الحديد وتنقص الزنك، النحاس والمنقّاتاز. يختلف التضارب بين الحديد والمعادن الاخرى على مستوى الطحالب و الروتيفار.

RESUME

Afin d'étudier l'incorporation des oligoéléments dans la chaîne trophique, les répercussions des variations de la composition en minéraux traces (Fe, Zn, Cu, Mn) du milieu de culture des algues unicellulaires sont suivies dans une chaîne alimentaire artificielle constituée par des algues (*Platymonas suecica*) et des rotifères (*Brachionus plicatilis*). Une forte teneur en chélateur diminue la production des algues et des rotifères cultivés en bloom ; elle diminue l'incorporation des minéraux traces dans les algues mais cet effet ne se répercute notablement au 2^e maillon de la chaîne (chez les rotifères), que pour l'incorporation du zinc. Une croissance optimale de *Platymonas suecica* est obtenue avec un milieu contenant 267 µg de Fe/l et 4,97 mg/l d'EDTA. Ce milieu donne aussi les meilleurs croissances des rotifères. L'incorporation du fer dans les algues est directement corrélée à la dose présente dans le milieu, les autres minéraux (Zn, Cu, Mn) ne sont pas clairement affectés par les différentes concentrations de fer. Par contre la teneur des rotifères en minéraux est influencée par les doses de fer employées pour la culture des algues, les fortes concentrations testées augmentent l'incorporation du fer et diminuent celle du zinc, du cuivre et du manganèse. Les interactions entre le fer et les autres minéraux ne sont donc pas semblables pour les algues et pour les rotifères.

Mots-clés : Algues, Rotifères, Minéraux traces, Fer.

ABSTRACT

In order to study the incorporation of trace elements into a trophic chain, the effects of the variations in the composition of trace minerals (Fe, Zn, Cu, Mn) of the algal culture medium are followed in an artificial food chain consisting of the unicellular alga *Platymonas suecica* and the rotifer *Brachionus plicatilis*, cultivated in bloom. A high level of chelating agent decreases the production of algae and rotifers, it depresses the absorption of trace minerals into algae, but this effect is clearly reflected in the 2nd level of the food chain (in rotifers) only as far as zinc is concerned. An optimum growth of *P. suecica* is obtained when the medium contains 267 µg/l of Fe and 4,97 mg/l of EDTA. This medium gives also the best growth of rotifers. In the algae, iron absorption is directly correlated with its concentration in the medium. The absorption of other minerals (Zn, Cu, Mn) is not dependent on iron concentrations. However the trace mineral contents of rotifers are (i.e. at the second step of the food chain) influenced by the iron levels in algal culture : high Fe concentrations increase its absorption and decrease that of zinc, copper and manganese. Therefore the interactions between iron and other minerals are not similar in rotifers and algae.

Keywords : Algae, Rotifers, Trace metals, Iron

I - INTRODUCTION

L'utilisation des proies vivantes (algues, rotifères, artemia) reste encore d'un point de vue technique la meilleure voie pour l'élevage des larves de poissons marins. Les algues unicellulaires représentent l'aliment naturel des rotifères le plus efficace pour assurer la production

La composition minérale du milieu d'enrichissement pour la culture des algues phytoplanctoniques a connu plusieurs modifications depuis les travaux de Hutner (1948) jusqu'à l'élaboration des derniers milieux d'enrichissements employés dans des différentes stations aquacoles (Milieu de Provasoli et al. 1957); milieu de Guillard et Ryther, 1962; milieu de Walne, 1966). Ces milieux ont été principalement étudiés pour obtenir une bonne croissance des algues.

En ce qui concerne les minéraux traces, les travaux de Hayward (1969), Riley et Roth (1971), Foster (1977), Goering et al. (1977) Sunda et Lewis (1978), Morel et al. (1979), McKnight et Morel (1980), Huntsman et Sunda (1980), Rueter et Morel (1981), Foster et Morel (1982) ont été orientés principalement vers la détermination des doses nécessaires ou non toxiques de minéraux traces et surtout du fer dont l'influence sur le métabolisme et la composition chimique des algues phytoplanctoniques a été étudiée.

Les nombreuses études consacrées au fer montrent l'importance de ce minéral dans la culture des algues microphytes (Gran; 1933, Ryther et Kramer, 1961; Menzel et Ryther, 1961; Harvey, 1947; Goldberg, 1952; Hayward, 1968; 1969).

La solubilité du fer dépend de la quantité de chélateur, qui a une influence sur le pH du milieu de culture (Cooper, 1937). L'action du chélateur (EDTA) dépend de la constante de complexation (pkc) de chaque minéral. (Johnston, 1964; Duursma et Sevenhuysen, 1966).

Les travaux sur l'influence des différents minéraux et en particulier des minéraux traces à plusieurs niveaux trophiques sont cependant très rares. Le travail de Robin (1989) met en évidence l'effet d'une supplémentation minérale des rotifères sur l'élevage de larves des poissons, en utilisant une technique d'enrichissement des rotifères. Par contre l'effet des minéraux traces des algues sur les rotifères n'a pas été étudié.

Pour suivre l'incorporation des minéraux traces et particulièrement du fer dans une chaîne alimentaire artificielle (algues - rotifères), nous avons d'abord étudié l'effet de la concentration en chélateur (EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique), puis celle du fer sur la production et la composition minérale des algues (*Platymonas suecica*) et des rotifères (*Brachionus plicatilis*) dans des cultures expérimentales..

II - MATERIEL ET METHODES

Culture des algues

Les études portant sur la croissance et la composition des algues sont réalisées en cultures en bloom dans des ballons de 2 litres en pyrex, à $20 \pm 1^\circ\text{C}$ avec un éclairage continu de 6 Klux. L'eau de mer utilisée est préfiltrée à $1\ \mu\text{m}$ et stérilisée à l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes, après refroidissement le milieu d'enrichissement est ajouté à raison de 1 ml/l; le ballon est inoculé avec une souche (5 ml/l) adaptée au même milieu nutritif. Les cultures sont soumises en permanence à un bullage d'air (2,5 l/mn) additionné de CO_2 (1 %), stérilisé par un filtre à $0,45\ \mu\text{m}$. Des agitations

manuelles sont faites pour homogénéiser la culture avant chaque comptage (6 comptages par jour à l'aide d'une cellule de Malassez).

Culture des rotifères

Les cultures de rotifères sont réalisées en blooms, selon la méthode décrite par Trotta (1983) dans des sacs polyéthylène de 40 l. Ces sacs sont remplis avec de l'eau de mer filtrée à 1 μ m, l'eau est décontaminée par une acidification (pH = 1,9 à 2,2) avec HCl, 24 heures après l'eau est neutralisée (pH entre 8 et 8,5) avec du carbonate de sodium. L'eau est enrichie à l'aide des milieux nutritifs (1 ml/l), un inoculum d'algue (2 l) issu d'une culture entretenue avec le même milieu nutritif, est ensemencé dans chaque volume. Les cultures, conduites à $22 \pm 2^\circ$ C, reçoivent un éclairage continu de 8 Klux, un bullage d'air sans adjonction de CO₂ est assuré pendant toute la culture. Quand la culture d'algue arrive en fin de croissance exponentielle, un inoculum de rotifères (10 Rotif./ml) est introduit. L'évolution de la concentration en rotifères est suivie quotidiennement par comptage de 2 échantillons de 1 ml.

Analyses

Les algues sont récupérées à la fin de leur phase de croissance, le volume de culture est centrifugé à 2600 g pendant 20 mn, le culot est lavé avec une solution isotonique de formiate d'ammonium (Parson et al., 1961). Les rotifères sont filtrés sur un tamis de 63 μ m, puis rincés à l'eau distillée. Après mesure du poids sec et minéralisation sèche à 550°C, les cendres sont dissoutes dans HCl à 10% . La concentration en métaux (Fer, Zinc, Cuivre, Manganèse) est déterminée à l'aide d'un Spectrophotomètre d'Absorption Atomique de Flamme (SAAF, Varian AA: 1275).

Milieux expérimentaux

Les milieux expérimentaux (M.E.B.) utilisés dans cette étude sont issus de résultats obtenus dans un travail antérieure (Chouba, 1988) qui a servi à fixer les taux de zinc, cuivre, manganèse.

Le tableau 1 montre la composition du milieu expérimental et du milieu de Walne (1966) dit "de Conway" utilisé comme témoin. Le pH des milieux expérimentaux est ajusté par la soude à 6,5, puis ils sont stérilisés à l'autoclave (120°C, 20 mn). La solution vitaminique est ajoutée stérilement à raison de 100 ml/l. Les milieux d'enrichissement sont stockés sous forme concentrée.

Influence du chélateur : Quatre doses d'EDTA sont testées sur la culture des algues et des rotifères chacune en 2 répétitions dans le temps. Les doses d'EDTA sont déterminées comme suit : la dose minimale est calculée d'après la définition de Provasoli et al.(1957) de façon à avoir une équivalence molaire (M/m.M) entre l'EDTA et la somme des métaux : Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, Co) elle représente ici 2,484 mg d'EDTA / l avec le milieu de base contenant 267 μ g/l de fer (concentrations dans la culture). Les autres ont été fixées suivant la même définition à : 2 M / m.M, soit 4,968 mg/l.; 5 M/m.M, soit 12,420 mg/l.; 18 M/m.M , soit 45 mg/l (dose du milieu de Walne).

Pour étudier l'influence du fer, les milieux nutritifs sont aussi réalisés avec le milieu de base tableau (1), où la concentration en fer varie de 117 à 1770 μ g de Fe / l ; avec principalement la concentration de 267 μ g/l (celle du milieu de Walne, 1966) ; et de 700 μ g/l (milieu de Provasoli, 1957). La dose d'EDTA est fixée à 1 M/m.M, ajustée en fonction de la quantité du fer ajoutée. Trois expériences ont été réalisées sur les algues avec différentes concentrations de fer, deux répétitions successives ont été conduites sur les rotifères avec quatre doses de fer.

Tableau 1 : Composition minérale des milieux d'enrichissement pour la culture des algues unicellulaires (Solutions concentrées de stockage); (1) Témoin : Walne, 1966, (2) milieu expérimental de base et (3) milieu final recommandé.

Doses en g/l	Témoin (1)	Milieu de base (MEB) (2)	Milieu recommandé (3)
Na NO ₃	100	100	100
Na H ₂ PO ₄	20	20	20
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	45	VARIABLE	4,9
Fe Cl ₃ , 6H ₂ O	1,3	VARIABLE	1,3
Zn Cl ₂	0,021	-	-
CH ₃ COOZn, 2H ₂ O	-	0,0994	0,0994
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,020	0,0395	0,0395
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,360	0,1628	0,1628
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,009	0,0031	0,0031
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,020	0,0729	0,0729
H ₃ BO ₃	33,6	0,0638	0,0638

SOLUTION VITAMINIQUE:

- Thiamine hydrochlorure (B1) : 200 mg
- Cyanocobalamine (B12) : 10 mg
- Eau distillée : 100 ml
- Dosage : 0,1 ml / litre d'eau de mer

III - RESULTATS

Effet de l'EDTA sur la production et la teneur en minéraux des algues et des rotifères nourris de celles-ci

Les résultats de la croissance journalière des algues des expériences a et b, comparés à l'aide d'une analyse de variance, ne montrent aucune différence significative ($P > 0,05$) entre les algues cultivées avec différentes doses d'EDTA (fig.1).

La composition minérale des algues est représentée sur la figure 2 : la teneur en Fe, Zn, Cu et Mn dans les algues varie significativement ($P < 0,05$) avec la dose d'EDTA.

Les régressions entre teneurs en minéraux et les concentrations en EDTA (tableau 2) montrent des corrélations élevées avec les quatre minéraux, l'hypothèse d'une relation linéaire peut être retenue. Les pentes peuvent être comparées aux constantes de complexation des métaux pour le chelateur (pkc).

Les taux d'incorporation des métaux ont été calculés en faisant le rapport de la quantité des minéraux incorporés dans les algues par unité de culture divisé par la quantité apportée dans le milieu (tableau 3). Les résultats relatifs au zinc (171, 149 %) avec 1 M/m.M montrent que ces résultats analytiques sont surestimés et ne peuvent avoir qu'une valeur relative. Pour le cuivre, le taux d'incorporation est proche de 100 % de la quantité apportée par le milieu de culture avec les doses faibles d'EDTA, et diminue peu avec les fortes doses. Pour le manganèse les pourcentages d'incorporation avec 1 et 2 M/m.M ne diffèrent pas et sont proches de 100%.

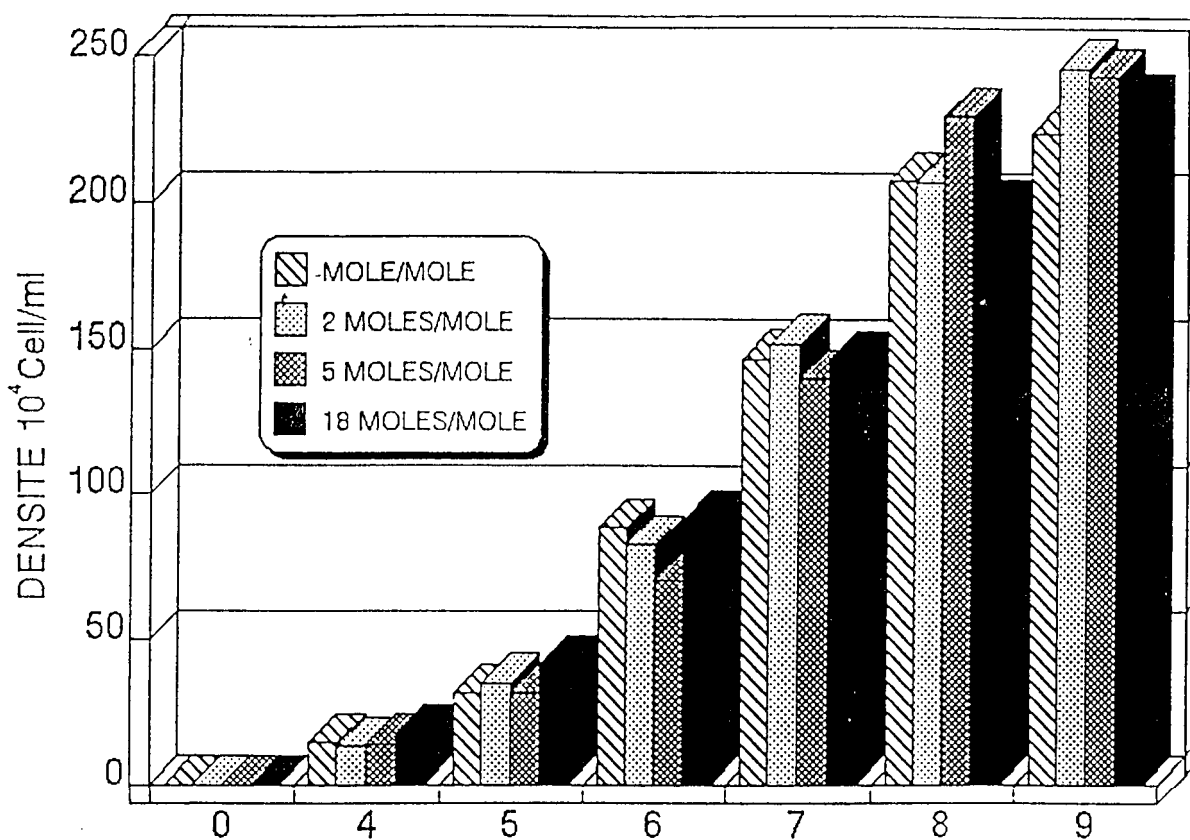
Rotifères

Les résultats concernant l'évolution de la population des algues et des rotifères cultivés en bloom sont résumés sur le tableau 4.

La densité finale obtenue avec le milieu à 18 M/m.M est proche celle du témoin. Les meilleurs taux de production sont obtenus avec les plus faibles concentrations en EDTA.

Dans les rotifères la teneur en minéraux (tableau 5) n'est pas clairement reliée à la dose d'EDTA, sauf pour le zinc dont l'évolution est proche de celle observée dans les algues.

Les teneurs en métaux pour le traitement à 18 M/m.M d'EDTA sont très proches de celle du témoin cultivé sur milieu de Walne (avec la même dose d'EDTA) malgré les différences d'apport de minéraux.



Exp. b

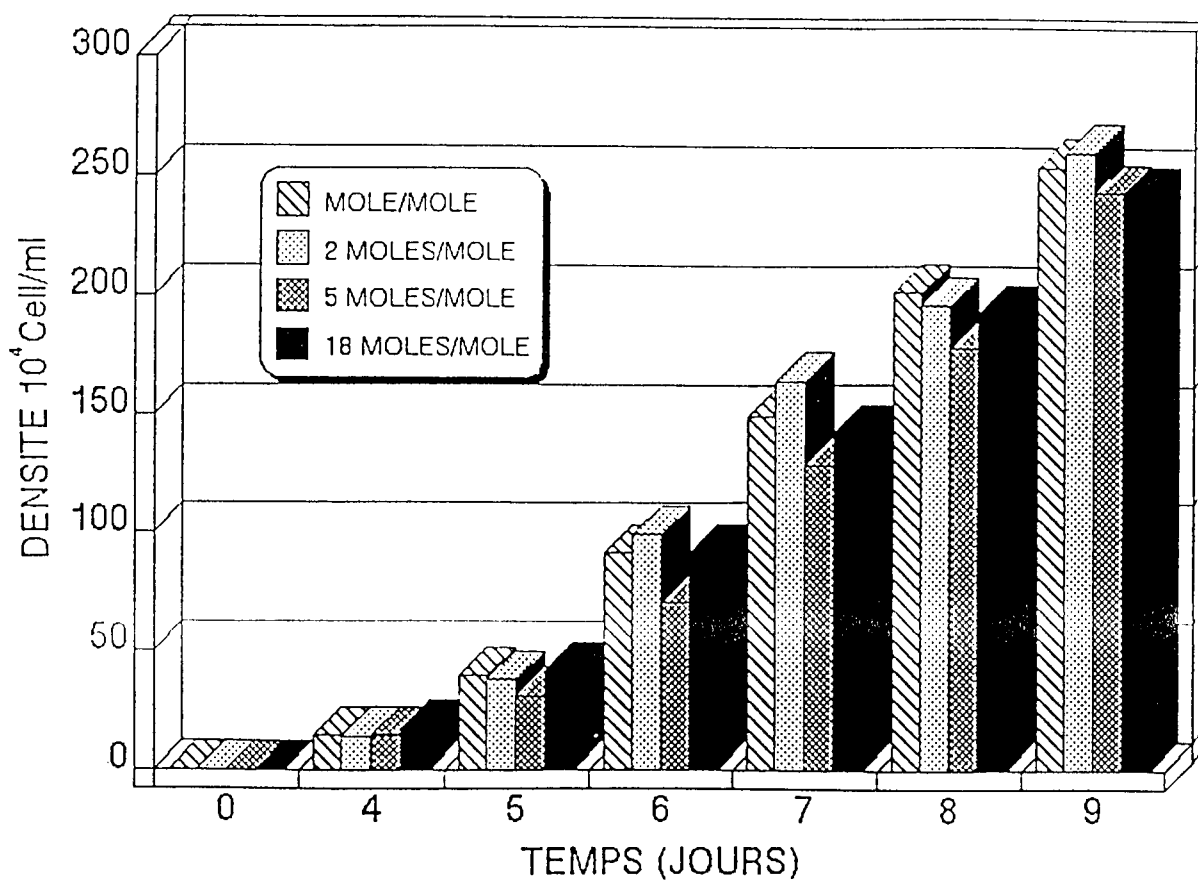


Fig. 1 : Croissance des algues avec des milieux de cultures contenant différentes concentrations de chelateur (EDTA). (Chaque figure correspond à une expérience).

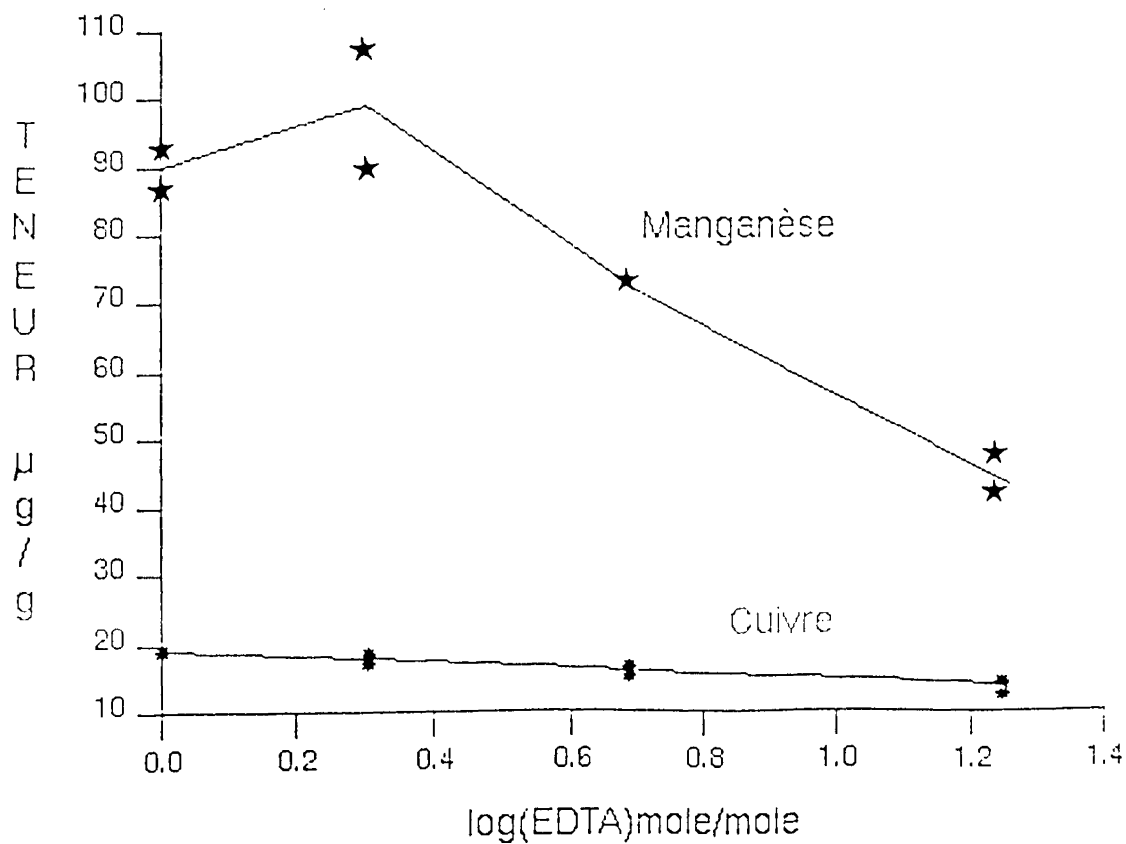
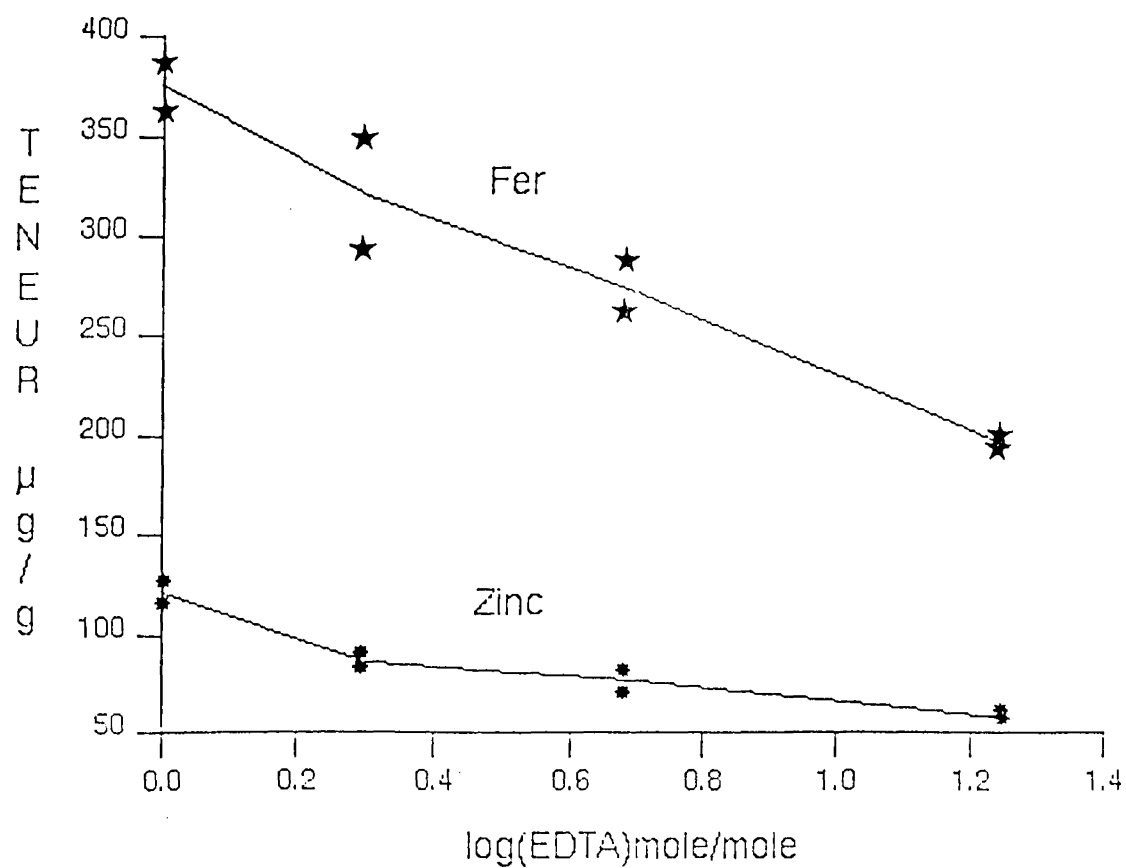


Fig. 2 : Composition en Fer, Zinc, Manganèse et Cuivre dans les algues à différentes concentrations d'EDTA (échelle log).

Tableau 2 : Régression entre la teneur des algues en minéraux µg/g (Y) et la dose d'EDTA dans le milieu d'enrichissement en mole/mole de métaux (X).

$$Y = a - b \text{ Log } X$$

Minéraux	a	b	r ²	pke
Fe	369,496	61,645	0,923	24,2
Zn	111,850	20,759	0,869	16,5
Cu	18,626	1,780	0,975	18,8
Mn	99,279	18,399	0,817	14,0

Tableau 3 : Pourcentage de minéraux incorporés dans les algues par rapport à la quantité fournie par le milieu en fonction de la concentration de chélateur (résultats par duplicats).

EDTA (M/mM) mg/l	Fe %	Zn %	Cu %	Mn %
1 2,48	70 - 78	149 - 171	89 - 106	99 - 110
2 4,97	63 - 60	100 - 122	83 - 99	114 - 109
5 12,42	49 - 47	91 - 87	72 - 76	72 - 80
18 45	33 - 36	63 - 71	64 - 65	40 - 48

Influence de la concentration en fer dans le milieu d'enrichissement sur une chaîne trophique courte (algues-rotifères).

Algues

Les résultats de différentes expériences concernant la dose de fer sont regroupés sur la figure 3, exprimés en pourcentage de la croissance maximale par expérience. La meilleure croissance est toujours obtenue avec la dose 267 µg de Fe / l. Une plus faible croissance apparaît assez nettement pour les doses plus faibles, alors qu'une éventuelle inhibition de croissance par les doses fortes est peu marquée.

Les valeurs de la composition en fer des algues cultivées en bloom sont représentées sur la figure 4. La teneur en fer des algues augmente en fonction de la concentration dans le milieu de culture ; la régression entre les deux variables est linéaire et le coefficient de corrélation est élevé ($r^2 = 0,93$).

Une variabilité d'incorporation du fer aux faibles doses entre expériences est observée, mais généralement le pourcentage de fer puisé par les algues est voisin de 30 et 40 % de fer du milieu (figure 5).

Les teneurs en Cu, Zn et Mn ne sont pas clairement influencées par les différentes doses de fer testées (figure 6), les teneurs moyennes ($\pm$ déviation standard) sont de 103 ± 15 µg/g, manganèse et de $18,5 \pm 3,4$ µg/g pour le cuivre, des fluctuations importantes sont observées dans le cas du zinc : 138 ± 50 µg/g..

Tableau 4 : Effet des différentes doses d'EDTA sur la concentration moyenne des algues avant l'inoculation des rotifères (a) et la concentration finale des rotifères cultivés en bloom (b). (*) Ecart type des mesures.

EDTA (M/mM) (mg/l)	1 2,48	2 4,97	5 12,42	18 45	Témoin (c) 45
algues (a) (x 10 ⁴ Cell/ml)	72 ± 12*	90 ± 14	85 ± 6	78 ± 9	70 ± 7
Rotifères (b) (N/ml)	224 ± 17*	230 ± 5	223 ± 18	194 ± 28	182 ± 22

Tableau 5 : Teneur en minéraux dans les rotifères cultivés en bloom avec différentes doses d'EDTA dans le milieu d'enrichissement des algues.

EDTA M/mM	mg/l	Fe µg/g	Zn µg/g	Cu µg/g	Mn µg/g
1	2,48	279	119	14	28
2	5,97	227	89	11	21
5	12,42	216	94	9	34
18	45	234	67	12	27
Témoin	45	248	61	11	31

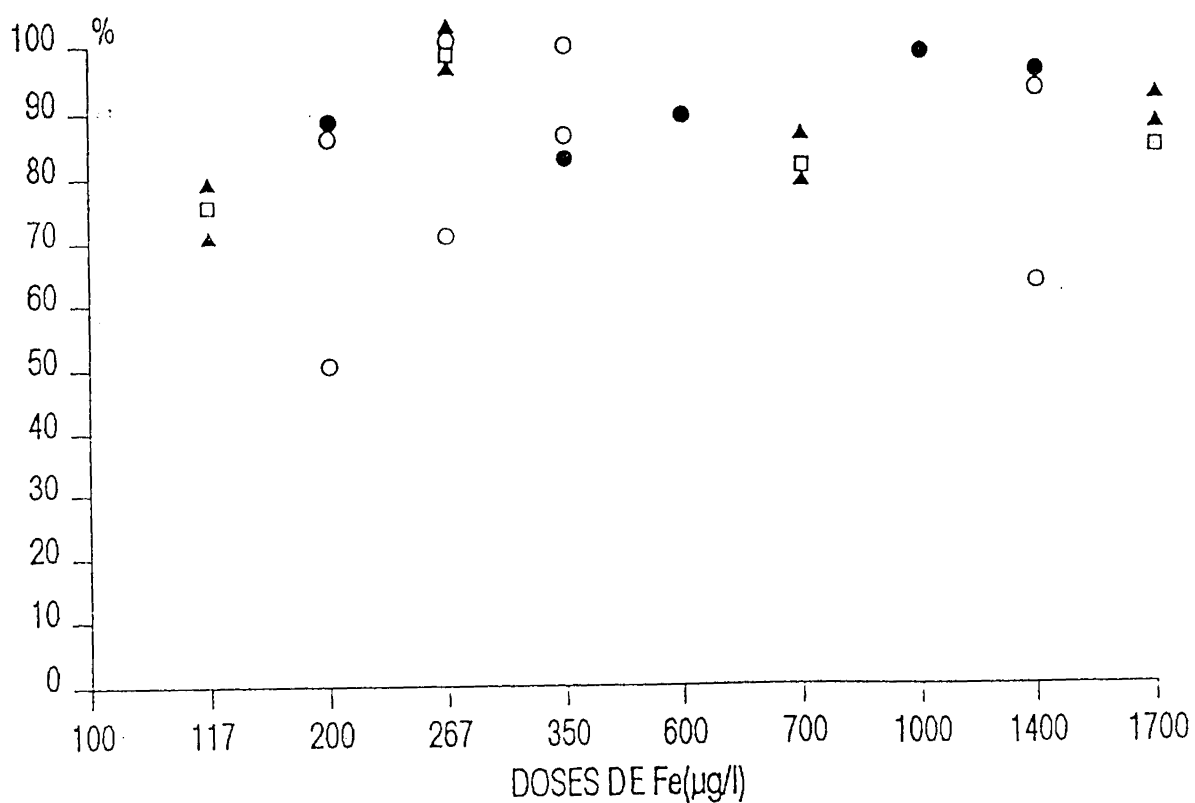


Fig. 3 : Croissance des algues avec différentes teneurs en fer du milieu en pourcentage de la concentration maximale par expérience (chaque symbole correspond à une expérience).

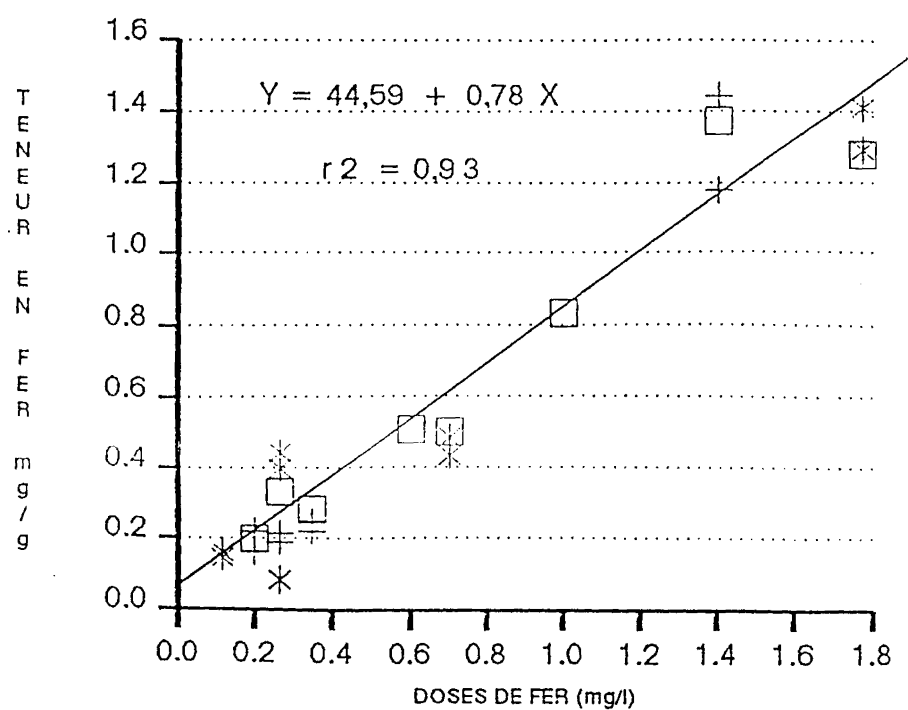


Fig. 4 : Teneur en fer des algues cultivées avec différentes concentrations du fer dans le milieu de culture (chaque symbole correspond à une expérience).

Rotifères

Le tableau 6 montre une variabilité de la densité moyenne finale des rotifères entre les répétitions, mais aucune différence significative n'est mise en évidence entre les traitements. La dose 267 μg de Fe/l qui donne les meilleurs résultats dans l'exp.1 n'a pas pu être étudiée dans l'exp.2 (perte accidentelle).

La teneur en fer du milieu influence la composition des rotifères en ce minéral (tableau 7). Les milieux avec 117g et 267 μg Fe / l donnent dans les rotifères des concentrations voisines en Fe, Zn et Cu, tandis que ceux contenant 700 et 1770 $\mu\text{g/l}$ entraînent des teneurs plus élevées en fer et plus faibles en zinc et cuivre. La teneur en manganèse dans les rotifères est maximale avec 267 μg /l.

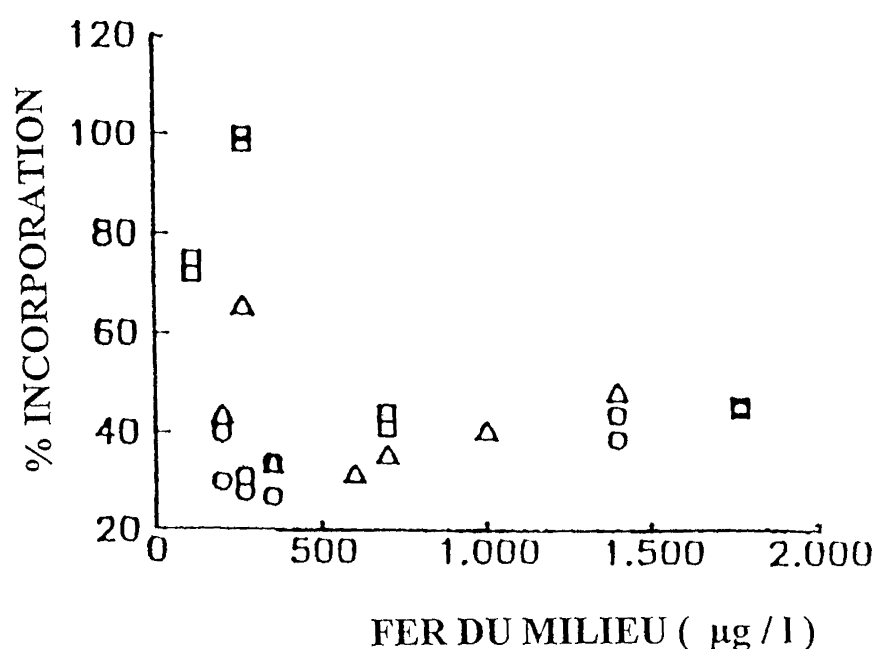


Fig. 5 : Taux d'absorption du fer par les algues en pourcent du fer du milieu (chaque symbole correspond à une expérience).

Tableau 6 : Effet des différentes doses de fer sur la concentration moyenne des algues avant l'inoculation des rotifères (a) et la concentration finale des rotifères (b) cultivés en bloom. (*) Ecart types des mesures.

Fer dans le milieu ($\mu\text{g/l}$)		117	267	700	1770	Témoin contrôl
Algue (a) ($\times 10^4$ Cell/ml)	exp. 1 :	85 $\pm$ 12	94 $\pm$ 15	90 $\pm$ 15	91 $\pm$ 15	87 $\pm$ 4
	exp. 2 :	83 $\pm$ 4	78 $\pm$ 10	82 $\pm$ 7	82 $\pm$ 6	70 $\pm$ 7
Rotifères (b) (N/ml)	exp. 1 :	174 $\pm$ 17	248 $\pm$ 8	232 $\pm$ 4	202 $\pm$ 11	203 $\pm$ 16
	exp. 2 :	198 $\pm$ 3	-	200 $\pm$ 3	176 $\pm$ 24	175 $\pm$ 31

Tableau 7 : Teneur en minéraux dans les rotifères cultivés en bloom avec différentes concentrations de fer dans le milieu d'enrichissement d'algues.

Dose de fer pour algues	Fe (µg/g)	Zn (µg/g)	Cu (µg/g)	Mn (µg/g)
117 µg/l	214	122	18	28
267 µg/l	241	115	15	35
700 µg/l	367	63	11	28
1770 µg/l	348	64	11	23
Témoin (contrôl)	223	59	12	32

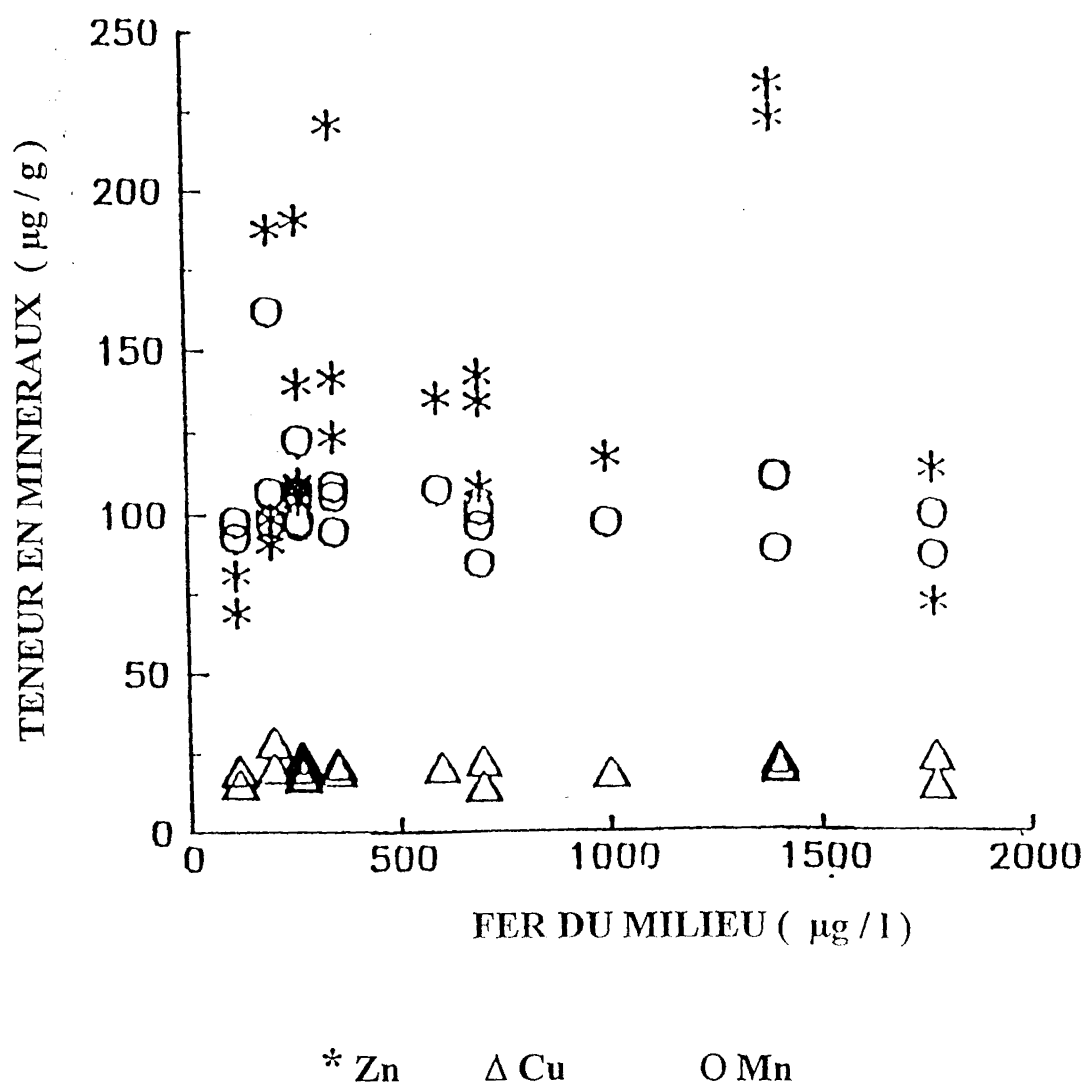


Fig. 6 : Teneurs en zinc, cuivre et manganèse des algues en fonction du fer du milieu de culture.

IV - Discussion

Pour la croissance des algues une quantité déterminée d'EDTA dans le milieu de culture est nécessaire (Johnston, 1964). La disponibilité et la toxicité des métaux sont contrôlées par la présence de l'agent chélateur, le travail de Spencer (1957) montre qu'une concentration en Cu de 2 μM en l'absence de chélateur dans le milieu est toxique pour l'algue *Phaeodactylum tricornutum*, l'effet de toxicité disparaît en présence d'un chélateur. Avec la plus faible dose d'EDTA utilisée les croissances sont légèrement inférieures, une faible toxicité est possible.

La complexation et la solubilisation des minéraux traces sont en relation avec la concentration de chélateur dans le milieu (Duursman et Sevenhuysen, 1966). La complexation permet d'expliquer l'inhibition de l'incorporation des minéraux traces dans l'algue *P. suecica* trouvée avec les fortes doses d'EDTA, comme le montrent les corrélations entre la dose d'EDTA et la teneur en minéraux des algues. D'après le tableau 2 les pentes des régressions trouvées sont d'autant plus fortes que le p_k de complexation est élevé pour Fe, Zn, Mn, mais on remarque que le cuivre, malgré une forte affinité théorique pour le chélateur, présente une pente de régression plus faible que les autres minéraux. L'algue semble avoir une forte affinité pour le cuivre. La teneur du milieu en cuivre doit être ajustée avec précision puisque le chélateur a un effet régulateur sur l'incorporation moins efficace pour ce minéral potentiellement toxique que les autres.

Jusqu'à 2 M/m.M d'EDTA l'incorporation de Mn, Cu et Zn est quasiment maximale. La concentration de 18 M/m.M (celle du témoin) diminue la relation entre EDTA et incorporation des minéraux dans les algues démontre l'importance du rapport minéral / chélateur pour l'incorporation des minéraux et par suite pour la croissance des algues par une meilleure satisfaction des besoins.

Jusqu'à 2 moles/mole d'EDTA l'incorporation de Mn, Cu et Zn est quasiment maximale, parfois nous avons un pourcentage qui dépasse légèrement 100 % ce qui pourrait être dû à la quantité du minéral concerné existant dans l'eau de mer. La concentration de 18 moles/mole (qui celle du milieu de Walne) diminue l'incorporation moitié par rapport à la concentration minimale d'EDTA alors que la densité d'algues obtenue est similaire. Le taux maximal d'incorporation du fer (78 %) est obtenu avec une mole d'EDTA/mole de métaux, est proche de la valeur trouvée par Hayward (1968) pour le *P. tricornutum*. Une forte variabilité de l'incorporation du fer a néanmoins été observée dans la deuxième série d'expériences.

Par contre la croissance des rotifères semble meilleure avec les faibles doses d'EDTA tandis que la densité finale des rotifères, obtenue avec le milieu expérimental, à 18 M/m.M d'EDTA est voisine de celle correspondant au témoin, cela semble indiquer que la dose de chélateur employée de Walne a un effet dépressif sur la croissance des rotifères.

La dépendance entre la dose d'EDTA et de la teneur en minéraux, trouvée dans les algues n'apparaît pas chez les rotifères. Les teneurs de ceux-ci en minéraux ne montrent pas de relation nette avec les différents traitements, sauf pour la teneur en zinc qui évolue de la même façon que celle des algues. On remarque que le traitement qui a la même dose d'EDTA que le témoin donne des teneurs en minéraux semblables à celle trouvées pour le témoin malgré la différence de composition minérale du milieu.

La recherche de la dose optimale de fer pour les algues est gênée par la forte affinité du chélateur pour ce métal (Davies, 1970) et d'autre part par la nécessité de celui-ci pour maintenir le fer en solution. C'est pourquoi la dose d'EDTA conservée est la dose faible étudiée au cours de l'expérience précédente (1 mole/mole de métaux).

Les différences de croissances des algues observées dans la gamme de concentration testée sont relativement réduites. Néanmoins, la meilleure production est obtenue avec la dose 267 µg de Fe/l, les doses inférieures (117, 200) paraissent limitantes. On observe une bonne tolérance de l'algue *P. suecica* aux fortes doses du fer (jusqu'à la dose 1770 µg/l), du fait de la gamme utilisée les niveaux de toxicités ne sont pas définis.

La modification des concentrations de Zn, de Cu et de Mn apportées au milieu d'enrichissement d'après le travail préliminaire (Chouba, 1988) permet un taux d'incorporation dans les algues proche du maximum possible, ce taux dépasse même parfois (surtout pour le zinc) la valeur de 100 % de la quantité apportée par le milieu de culture. Les algues ont pu absorber un complément à partir d'autres sources (eau de mer impuretés des produits), mais ceci peut aussi provenir d'une surestimation due aux techniques analytiques employées, du moins dans le cas du zinc particulièrement délicat à doser.

Les résultats des expérimentations montrent que la teneur en fer dans les algues dépend de la concentration présente dans le milieu, ce qui est en accord avec les résultats de Knauss et Porter (1954) chez *Chlorella sp* et de Hayward (1969) chez *Phaeodactylum tricornutum*.

Les teneurs en Mn et en Cu dans les algues varient peu avec les différentes doses de fer employées. Pour le zinc de fortes variations sont observées.

En ce qui concerne la croissance des rotifères la variabilité entre les deux expériences rend difficile l'interprétation des différences observées. Signalons toutefois qu'un meilleur taux de production est obtenu avec la dose 267 µg de Fe / l.

L'influence du fer est, toutefois plus nette vis-à-vis de la composition minérale. Avec les deux faibles doses (117, 267 µg/l) les teneurs en Zn et en Fe des rotifères sont plus ou moins constantes ; avec les deux autres doses on observe une augmentation importante de la teneur en fer et une diminution des teneurs en zinc, manganèse et cuivre; ce phénomène pourrait s'expliquer par une compétition au niveau de l'incorporation de ces minéraux : Won-Park et Shimizu, (1989) ont montré une influence comparable du fer de l'aliment sur l'incorporation des minéraux chez la civelle. La teneur en fer employées pour la culture des algues a donc une influence sur la teneur en minéraux traces (Fe, Zn, Mn, Cu) des rotifères bien qu'aucune influence du fer sur les autres minéraux n'ait été trouvée au niveau des algues.

Au deuxième niveau de la chaîne alimentaire, chez les rotifères, une amélioration de la croissance est obtenue quand les algues sont cultivées avec les doses faibles d'EDTA (1 et 2 moles/mole de métaux) et avec une dose optimale de fer de 267 µg/l, ce qui correspond aux milieux donnant les meilleures productions d'algues. Le fait d'utiliser une technique de culture en bloom pour les algues et les rotifères introduit un doute dans l'influence des traitements (fer, EDTA) sur la croissance des rotifères. En effet la croissance des animaux dépend de la quantité d'algues disponible et non de leur seule composition ; on observe donc qu'un effet global sans pouvoir attribuer les résultats obtenus à la quantité ou à la qualité des algues, toutes deux influencées par les traitements.

V - CONCLUSION

En conclusion, en présence d'une dose forte d'EDTA, le fer et les autres minéraux traces (Zn, Cu, Mn) sont peu assimilables par la cellule algale. Une amélioration notable de l'incorporation des minéraux par les algues ainsi que de la croissance des rotifères cultivés en bloom est obtenue avec les faibles doses d'EDTA (1 et 2 moles/mole de métaux).

Le taux d'incorporation de fer dans les algues dépend directement de la concentration de ce dernier dans le milieu de culture, ceci se repercute de façon moins marquée pour les rotifères. Dans les algues, les teneurs en zinc, cuivre et manganèse ne varient pas clairement en fonction de la dose de fer. Chez les rotifères, les fortes concentrations en fer diminuent les teneurs en zinc, cuivre et manganèse.

L'incorporation des minéraux dans les rotifères n'est donc pas similaire à celle des algues, en effet les concentrations d'EDTA agit sur la teneur en oligoélément des algues mais ne se repercute sur la composition minérale des rotifères que pour le zinc. A l'opposé, l'expérimentation sur le fer montre que son absorption par les algues n'affecte pas nettement les autres minéraux dans les algues mais influence les différentes teneurs en minéraux traces dans les rotifères. Cet effet peut paraître paradoxal puisque l'on s'attendrait à une atténuation de l'effet des facteurs étudiés (fer) au fur et à mesure que l'on s'élève dans la chaîne trophique.

La présente étude permet donc de déterminer, la composition d'un milieu d'enrichissement des cultures d'algues unicellulaires (tableau 1) donnant de meilleures croissances tout en assurant une bonne incorporation des oligoéléments dans les algues. Ce milieu peut être recommandé pour la production des rotifères ainsi que, sous réserve d'expériences ultérieures, pour d'autre utilisations en aquaculture.

Cette étude permet d'améliorer et de contrôler la "qualité minérale" des rotifères afin de mieux répondre aux besoins des larves de poissons qui s'en nourrissent (Robin, 1989), et d'éviter les fluctuations saisonnières des minéraux observées dans les productions de masse des rotifères (Robin et Chouba, 1989).

VI - BIBLIOGRAPHIE

- Davies A.G., 1970. Iron chelation and the growth of marine phytoplankton. I Growth kinetics and chlorophyll production in cultures of the euryhaline flagellate *Dunalliella tertiolecta* under iron-limiting conditions. *J. mar. biol. Ass. U. K.* 50, 65 - 86.
- Duursma E.K., W. Sevenhuysen, 1966. Note on chelation and solubility of certain metals in sea water at different pH values. *Neth. J. Sea Res.*, 3, 95 - 106.
- Foster L.P., 1977. Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature*, 269, 322-323.
- Foster L.P., F.M.M. Morel, 1982. Reversal of cadmium toxicity in a diatom : an interaction between cadmium activity and iron. *Limnol. Oceanogr.*, 27 (4), 745-752.
- Goering J.J., D. Boisseau, A. Hattori, 1977. Effects of copper on silicic acid uptake by a marine phytoplankton population : controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. of mar. sci.*, 27 (1), 58-65.
- Goldberg E.D., 1952. Iron assimilation by marine diatoms. *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, 102, 243 - 248.
- Gran H.H., 1933. Studies on the biology and chemistry of the golf of marine. II Distribution of the phytoplankton in August, 1932. *Biol. Bull.*, 64, 159 - 181.
- Guillard R.R.L., J.H. RYTHER, 1962. Studies of marine plankton diatoms. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8, 229-238.
- Harvey H.W., 1947. The supply of iron to diatoms. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 22, 205 - 20.
- Hayward J., 1968. Studies on the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. III The effect of iron on growth. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 48, 295 - 302.
- Hayward J., 1969. Studies on the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. V The relationship to iron, manganese and zinc. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 49, 439 - 46.
- Healey F.P., 1973. Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 3 : 69p.

- Huntsman S. A., W. G. Sunda, 1980. The role of trace metals in regulating phytoplankton growth in natural waters. *In: the physiological ecology of phytoplankton* I. Morris, ed., Studies in Ecology, Vol.7, Blackwell Scientific, Boston.
- Hutner S.H., 1948. Essentiality of constituents of sea water for growth of a marine diatom. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 10, 136.
- Johnston R., 1964. Sea water the natural medium of phytoplankton. II Trace metals and chelation and general discussion. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 44, 87 - 102.
- Knauss H.J., J.W. Porter, 1954. The absorption of inorganic ions by *Chlorella pyrenoidosa*. *Pl. Physiol. Lancaster*. 29, 229-34.
- McKnight D.M., F.M.M. Morel, 1980. Copper complexation by siderophores from filamentous blue-green algae. *Limnol. Oceanogr.* 25 : 62 - 71.
- Menzel D.W., J.H. Ryther, 1961. Nutrients limiting the production of phytoplankton in the Sargasso Sea, with special reference to iron. *Deep-Sea Res.* 7.
- Morel F.M.M., 1986. Trace metals-phytoplankton interaction : An overview. *In: P. Lasserne and J.M. Martin (eds), Biogeochemical Processes at the Land-sea Boundary.* Elsevier, Amsterdam.
- Morel F.M.M., J.G. Rueter, D.M. Anderson, R.R.L. Guillard, 1979. Aquil: A chemically defined phytoplankton culture medium for trace metal studies. *J. phycol.* 15 : 135 - 141.
- Parson T.R., K.A. Stephens, J.D.H. Strickland, 1961. On the chemical of eleven species of marine phytoplankters. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 18 (6) : 1001-1016.
- Provasoli L., J.J.A. McLaughlin, M.R. Droop, 1957. The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.* 25 : 392 - 428.
- Riley J.P., I. Roth, 1971. The distribution of trace elements in some species of phytoplankton grown in culture. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 51 : 63-72.
- Robin J.H., 1989. The quality of living preys for fish larval culture : preliminary results on mineral supplementation. "Aquaculture a biotechnology in progress" N. DE Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors, & N. Wilkins (Eds). *European Aquaculture Society*, Vol.2 : 769-774.
- Rutter J.G., F.M.M. Morel, 1981. The interaction between zinc deficiency and copper toxicity as it effects the silicic acid uptake mechanisms in *Thalassiosira pseudonana*. *Limnol. Oceanogr.*, 26 (1) : 67-73.
- Ryther J.H., D.D. Kramer, 1961. Relation iron requirement of some coastal and offshore plankton algae. *Ecology*, Vol. 42 (2),pp: 444 - 446.

- Spencer C.P., 1957. Utilisation of trace elements by marine unicellular algae. *J. gen. Microbiol.* 16 : 282 - 285.
- Sunda W.G., J.H. Lewis, 1978. Effect of coplexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga *Monochrysis lutheri*. *Limnol. Oceanogr.* 23 : 870-876.
- Walne P.R., 1966. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. *Fishery investigation*, Ser. II 25 (4): 53 - 73.
- Won Park C., C. Shimizu, 1989. Quantitative requirements of aluminum and iron in the formulated diets and its interrelation with other minerals in young Eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55 (1) : 111-116.