

Détermination par bioessai de la biodisponibilité des ressources azote et phosphore, dans les eaux du Golfe du Morbihan*

Bioassay determination of the bioavailability of nitrogen and phosphorus resources in Morbihan Gulf waters

B. LE ROUZIC¹, G. BERTRU

Reçu le 12 septembre 1990, accepté pour publication le 16 octobre 1991**.

SUMMARY

In estuarine water, the knowledge of the resources bioavailability is indispensable for understanding phytoplankton dynamics. For assessing nitrogen and phosphorus bioavailability, algal bioassays are the most indicated. Nutrient limitations of an alga exhibit a threshold rather than an additive or a multiplicative response (ELRIFI *et al.*, 1985). In contrast, numerous nutrient limitations are described for an algal population (TILMAN, 1982).

Samples are taken monthly at 1 meter's depth from two French river estuaries, Noyal River and Vannes River, in the Morbihan Gulf from April to July. Main physico-chemical measures (temperature, salinity, nitrate, nitrite, ammonia, total nitrogen, reactive phosphorus and total phosphorus) were taken. Total soluble nitrogen and total soluble phosphorus concentrations were determined after filtration on 0,2 μm , for comparison with bioassays. In addition two kinds of batch bioassays with 250 ml erlenmeyers into controlled environment (17 °C and 180-200 $\mu\text{Einstein}$), were employed :

- Estuarine waters filtered on 200 μm , to remove most of the zooplankton, were enriched with sodium nitrate and/or dipotassium hydrogen phosphate. Algal Growth response, was recorded by fluorescence « *in vivo* », against a blank.

- With the total growth on sterilely filtered (0,2 μm) estuarine waters of two test algae, starved simultaneously in phosphorus and nitrogen in artificial sea water, it was possible to determine the bioavailability of these two elements in the soluble fraction. The cellular density of the two test algae : *Fragilaria elliptica* Schumann and *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, was related to optical density measures at 750 nm. Nitrogen and phosphorus intracellular concentrations, in the whole culture at the end of the growth, gave their bio-

1. Laboratoire d'Evolution des Systèmes Naturels et Modifiés, Université de Rennes I, Av. du Gén. Leclerc, 35042 Rennes Cedex, France.

* Communication présentée au 34^e Congrès de l'Association Française de Limnologie, Metz-Nancy, 29-31 mai 1990.

** Les commentaires seront reçus jusqu'au 30 décembre 1992.

availability for the test algae provided. Nitrogen and phosphorus cell quotas, intracellular concentration per cell, were then compared with their higher and lower cell quotas. Higher and lower cell quotas were measured at the end of the test algae growth in an artificial medium without phosphorus or nitrogen resources. They were similar to those described by DAUTA (1982).

In 1989, an exceptional drought reduced the river flow. Consequently, nutrient flux decreased and phytoplankton density, mainly diatoms, was reduced to between 100 and 800 cells/ml. Sea water dominated in the Morbihan Gulf with salinities higher than 30 ‰.

First, waters filtered on 200 μm and added to which was nitrate and/or phosphate revealed a nitrogen limitation of natural phytoplankton.

Secondly, phosphorus limitation were found in bioassays on sterilely filtered waters, in all the test algae starved for phosphorus and nitrogen. At the end of the growth in bioassays, phosphorus cell quotas of the test algae were generally similar to the lower ones. The growth of the tests algae was limited by that resource.

These contrary results are related to the intracellular storage by the natural phytoplankton and/or the major role of particulate fractions in phosphorus bioavailability.

Phosphorus and nitrogen concentrations assimilated by the test alga : *Fragilaria elliptica*, were inversely related. From May to July 1989 the results showed a simple linear relation between soluble nitrogen source (filtered on 0.2 μm) which was bioavailable for the test alga and natural phytoplankton density ($R^2 = 0.98$). The two measurements of April did not agree with the latter relation, rather because of environmental factors such as temperature (11 °C against 20-21 °C for the next ones), than because of the resources. Moreover, the station B in July exhibited a natural phytoplankton density significantly lower than the station A and independent of the nitrogen bioavailability for the two test algae. The bioavailable phosphorus for *Phaeodactylum tricornutum*, was also significantly lower at station B. That resource can explain the difference in density monitored in July.

The total soluble nitrogen source, inorganic and organic, and just a fraction of the total soluble phosphorus source, were assimilated. The soluble phosphorus assimilated by test algae, after sterile filtration, is not the total bioavailable phosphorus in the water of the Morbihan Gulf and seems to be inversely related to the natural phytoplankton density. A part from mineral phosphorus adsorbed on suspended matter is also bioavailable (BERLAND *et al.*, 1973). However, for the phosphorus resource, bioassays have to be performed on particulate fractions.

Key-words : *phytoplankton, estuary, bioassays, nitrogen, phosphorus, bioavailability.*

RÉSUMÉ

Des dosages physico-chimiques et des numérations du phytoplancton sont réalisés sur des prélèvements d'eau du Golfe de Morbihan (France), conjointement à des bioessais en milieu non renouvelé :

1. Avec le peuplement autochtone, par enrichissement en azote et en phosphore de l'eau filtrée sur 200 μm .
2. Avec deux algues tests épuisées en azote et en phosphore, sur l'eau filtrée stérilement. Les quotas cellulaires des algues tests en fin de croissance sont comparés aux quotas cellulaires minimaux et maximaux préalablement établis.

Les bioessais avec enrichissement révèlent une limitation de la croissance des algues par l'azote. Les bioessais avec *Fragilaria elliptica* présentent une

relation linéaire croissante simple entre la concentration en azote assimilée par l'algue test et la densité cellulaire du peuplement phytoplanctonique naturel. L'azote total en solution représente la fraction utilisée par ces algues : azote biodisponible. Par contre, la fraction « phosphore soluble » ne représente qu'une partie du phosphore biodisponible, et se trouve consommée de manière très diverses par les algues testées. Cependant, l'analyse des quotas cellulaires en fin de croissance des algues tests montre que le phosphore est l'élément impliqué dans la limitation de leur croissance.

Les bioessais exposent des résultats contradictoires de limitation de la croissance. Les algues autochtones utilisent des ressources en phosphore supérieures à celles qui sont mises à disposition des algues tests, par stockage interne ou par consommation du phosphore minéral adsorbé sur les particules en suspension.

Mots clés : *phytoplancton, estuaire, bioessais, azote, phosphore, biodisponibilité.*

INTRODUCTION

La quantité de matière produite par photosynthèse (algues planctoniques et benthiques) dépend des concentrations en substances nutritives biodisponibles (utilisables) pour les algues. Celles-ci sont également responsables, en partie, de la structuration des peuplements. En effet, les rapports entre les différentes ressources (substances nutritives et lumière) associés aux facteurs du milieu (température et salinité) sont à la base de la compétition interspécifique (TILMAN, 1982 ; ELRIFI *et al.*, 1985). Cette approche nécessite une connaissance parfaite des concentrations en ressources réellement biodisponibles.

La limitation de la croissance d'une algue présente un modèle de type seuil, c'est-à-dire qu'elle ne dépend que d'une seule substance à la fois (la substance limitante), et non un modèle additif ou multiplicatif (ELRIFI *et al.*, 1985). Le développement d'un peuplement phytoplanctonique, peut être basé, par contre, sur une limitation par de multiples ressources (TILMAN, 1985).

Bien souvent, l'étude des corrélations entre les paramètres physico-chimiques du milieu et la croissance algale *in situ* ne permet pas d'expliquer les différences de fertilités des eaux (BERLAND *et al.*, 1972 ; MAESTRINI *et al.*, 1984).

L'utilisation, en bioessai, d'algues autochtones ou d'algues tests permet une approche plus directe des caractéristiques du milieu : il s'agit de cultiver des algues dans des conditions où un seul facteur (ou groupe de facteurs) est variable, si la réponse (taux de croissance ou croissance totale) est proportionnelle à ce facteur, celui-ci est alors considéré comme limitant (MAESTRINI *et al.*, 1984).

Les moyens d'approche de la limitation de la croissance des algues par l'azote et le phosphore peuvent porter sur des tests de cinétique d'assimilation

des ressources (CHIAUDANI *et al.*, 1976), sur des analyses chimiques du phytoplancton résident, combiné à des tests physiologiques (PAASCHE *et al.*, 1988) ou comme dans cette étude sur la croissance des algues, résidentes ou de culture, comme indicateur de leur biodisponibilité (KOTAI *et al.*, 1978).

Des bioessais par ajouts d'azote et de phosphore dans l'eau non filtrée, permettent de cerner l'effet de ces substances sur la croissance des algues autochtones (résidentes). La mesure des quantités totales de phosphore et d'azote assimilées en fin de croissance, en milieu non renouvelé, par deux algues tests, *Fragilaria elliptica* et *Phaeodactylum Tricornutum*, permet de connaître la biodisponibilité de ces deux ressources pour les algues étudiées. L'évaluation de la situation des nutriments dans les cellules algales en fin de croissance, par le dosage de leurs quotas cellulaires en azote et en phosphore, renseigne sur la situation nutritive des algues tests vis-à-vis de ces deux ressources.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Quatre campagnes de prélèvements : 26 avril, 29 mai, 19 juin et 19 juillet 1989, concernant deux stations du Golfe du Morbihan (*fig. 1*) situées dans les estuaires externes des rivières de Vannes (A) et de Noyal (B), ont fait l'objet de prélèvements d'eau à 1 m de profondeur (profondeur approximative du maximum de densité en phytoplancton) par mi-marée descendante. Les mesures physico-chimiques concernent la température, les matières en suspension (sur filtre Whatman GFC), le Secchi, la salinité (au nitrate d'argent) et, selon les méthodes de STRICKLAND et PARSON 1968, le dosage des nitrates, des nitrites, de l'ammoniac, du phosphore réactif et des silicates. Les dosages : azote total, phosphore total, azote et phosphore total en solution, par filtration sur $0,2 \mu\text{m}$ (en comparaison avec les bioessais), sont déterminées sous formes de nitrate et de phosphore réactif, après oxydation au persulfate à chaud. Le peuplement phytoplanctonique autochtone fait l'objet d'une numération cellulaire au microscope inversé (HOBRO *et al.*, 1977 ; VENRICK, 1978).

Deux types de bioessais sont effectués au cours de cette étude. Chaque bioessai, portant sur 50 ml d'eau du Golfe et répliqué en trois exemplaires dans des erlenmeyers de 250 ml en borosilicate, se déroule en enceinte thermostatée à 17°C sous un éclairage de $180\sim 200 \mu\text{Einstein}$ de photo-période 12/12.

1) A partir du mois de mai, des enrichissements combinés de l'eau intégrale de la station A sont réalisés avec des solutions de nitrate de sodium, de phosphate de potassium et de l'eau distillée (*tableau 1*) sur les prélèvements de la station A filtrés uniquement sur $200 \mu\text{m}$, afin d'éliminer la majorité des organismes zooplanctoniques. Les effets de la diminution de 2 % de la salinité sur les algues provoquées par les ajouts sont pris en compte par la réalisation de témoins. L'évolution de la croissance des algues autochtones est alors suivie par fluorimétrie *in vivo* pendant 4 jours.

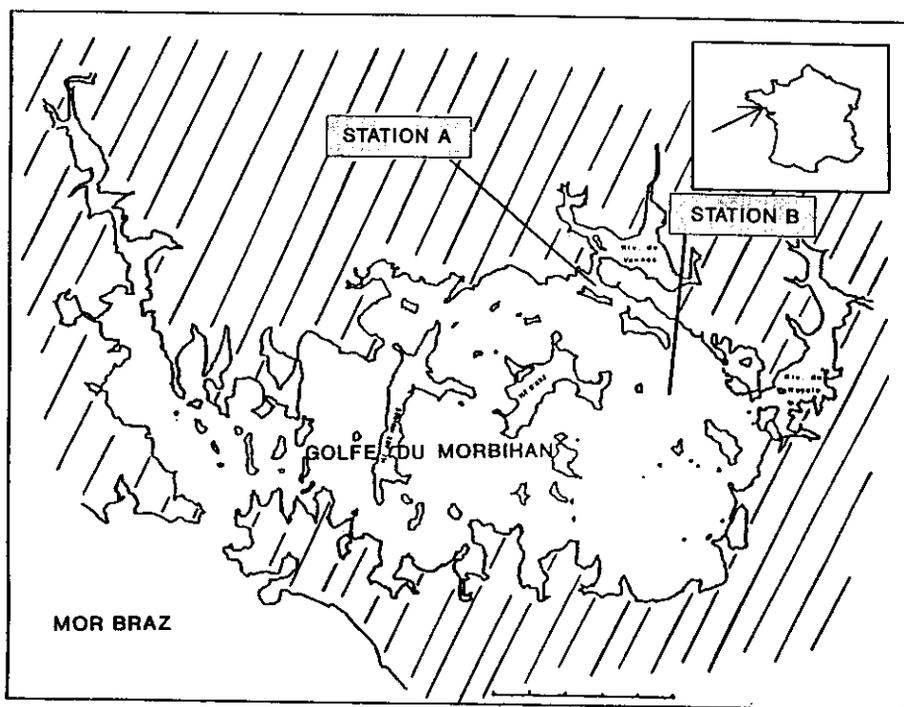


Figure 1 Le Golfe du Morbihan, situation des stations étudiées.
The Morbihan Gulf, stations A and B.

Tableau 1 Combinaison des enrichissements en azote et en phosphore pour 50 ml du Golfe du Morbihan filtrée sur 200 μm (concentration finale en Nitrate : 25 $\mu\text{mol/l}$ et Phosphate : 1 $\mu\text{mol/l}$).

Table 1 Nitrogen and phosphorus enrichments combination for 50 ml of Morbihan Gulf water filtered on 200 μm (final concentration are 25 $\mu\text{mol/l}$ for Nitrate and 1 $\mu\text{mol/l}$ for Phosphate).

Enrichissements	Eau distillée	Nitrate (2 500 $\mu\text{mol/l}$)	Phosphate (100 $\mu\text{mol/l}$)
Témoin	1 ml		
Azote (+N)	0,5 ml	0,5 ml	
Phosphore (+P)	0,5 ml		0,5 ml
Azote et Phosphore (+N et P)		0,5 ml	0,5 ml

2) Tous les prélèvements sont également testés à l'aide de deux diatomées en culture pure, épuisées simultanément en azote et en phosphore et cultivées en milieu synthétique de salinité 25 ‰ (tableau 2).

- *Fragilaria elliptica* Schumann, isolée et déterminée au laboratoire.
- *Phaeodactylum tricornutum* (CCAP), BOHLIN, 1897 (1052/1B) (culture axénique).

Tableau 2 Composition du milieu de culture des algues (Standard Methods, 1980) (71,4 ml de milieu de base et 28,6 ml d'eau distillée pour une salinité de 25 ‰).

Table 2 Algal cultured medium composition (Standard Methods, 1980) (71,4 ml of base medium and 28,6 ml of distilled water for a salinity of 25 ‰).

Milieu de base synthétique de salinité 35 ‰ (pour 1 l)		Supplément (µM)	
SrCl ₂ · 6H ₂ O	20 mg	Nitrate	250
H ₃ PO ₃	30 mg	Phosphate	8,25
KBr	100 mg	Silicates	150
KCl	700 mg	Bicarbonate	600
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 470 mg		
Na ₂ SO ₄	4 000 mg	Micronutriments :	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10 800 mg	Co	0,0125
NaCl	23 500 mg	Cu	0,025
		Fe	0,5
		Mn	0,25
		Mo	0,25
		Zn	0,5
		EDTA	3

En fin de phases de croissance exponentielle, 0,5 ml de suspension d'algue test est ajouté à 50 ml d'eau du Golfe du Morbihan filtrée stérilement sur 0,2 µm. La densité cellulaire initiale par litre est de $1 \cdot 10^7$ pour *F. elliptica* et de $2 \cdot 10^7$ pour *P. tricornutum*. L'algue *P. tricornutum* est utilisée en bioessai à partir de la campagne de juin.

La croissance est suivie par des mesures de densité optique à 750 nm (Standard methods, 1980). Elles sont reliées linéairement à la densité cellulaire par les équations suivantes :

- densité cellulaire/l = $1,08 \cdot 10^{10} \cdot DO$ pour *F. elliptica* ($R^2 = 0,85$; $n = 11$).

- densité cellulaire/l = $1,78 \cdot 10^{10} \cdot DO$ pour *P. tricornutum* ($R^2 = 0,96$; $n = 10$).

Les quotas cellulaires en azote et en phosphore sont dosés uniquement en fin de croissance. Ils sont estimés par différence entre les concentrations totales et les concentrations totales en solution après filtration sur 0,2 µm. Rapportés à la densité cellulaire totale, ils permettent de calculer la quantité totale d'azote et de phosphore assimilée lors de la croissance du peuplement algal.

Pour déterminer l'amplitude maximale de variation des quotas cellulaires, les algues tests sont cultivées initialement dans des milieux appauvris soit en azote, soit en phosphore. Dans ces conditions, les quotas cellulaires mini-

maux, au plateau de croissance, sont établis pour la ressource qui est en défaut dans le milieu et les quotas cellulaires maximaux, pour l'autre ressource.

La possibilité de mise en réserve par les algues de la totalité des substances nutritives du milieu, dans les limites de leurs capacités (NYHOLM *et al.*, 1988) permet d'appréhender en fin de croissance, au plateau, la biodisponibilité de toute substance nutritive absorbée par l'algue test, qu'elle limite ou non la croissance.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La sécheresse exceptionnelle qui a marqué l'ouest de la France en 1989, a fortement réduit le débit des fleuves côtiers aboutissant dans le Golfe du Morbihan. Elle a également affecté les apports en substances nutritives. Les résultats des paramètres physico-chimiques, récapitulés dans le tableau 3, montrent ainsi des concentrations en substances nutritives assez faibles pour des prélèvements réalisés dans des eaux estuariennes en Bretagne. Le milieu marin prédomine dans le Golfe, avec des salinités étagées de 32 ‰ en avril à 35 ‰ en août. Le prélèvement du 26 avril présente le maximum de matières en suspensions : 33,5 mg/l, pour une température de 11 °C, contre des valeurs comprises entre 6,5 et 11,0 mg/l et des températures de 21 et 22 °C lors des campagnes suivantes.

Tableau 3 Résultats des analyses physico-chimiques.

Table 3 Results of the physico-chemical analyses.

Campagne	26/04		29/05		19/06		19/07	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Station								
Profondeur (m)	4,2	3,0	6,5	4,5	5,0	4,4	6,0	5,5
Température (°C)	11	11	21	22	22	22	21	21
Secchi (m)	1,5	1,0	2,0	2,5	2,5	2,5	2,0	1,8
Salinité (‰)	32,1	31,8	33,1	32,8	33,9	33,9	35,1	34,1
MES (mg/l)	16,2	33,5	9,3	6,5	8,7	7,3	9,0	11,0
P réactif (µM)	0,8	0,4	0,4	0,4	1,0	1,0	0,6	0,6
P total (µM)	63,9	15,7	4,6	4,5	6,6	5,9	2,3	2,0
P total solution (µM)	1,9	1,0	3,2	3,4	3,8	3,9	2,1	1,6
NO ₃ ⁻ (µM)	21,7	9,6	6,7	6,3	2,1	3,2	3,1	1,1
NO ₂ ⁻ (µM)	0,62	0,83	0,19	0,20	0,27	0,27	0,16	0,08
NH ₄ ⁺ (µM)	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,6	0,5
N total (µM)	62,8	45,9	18,3	27,6	88,8	77,0	91,0	90,5
N total solution (µM)	43,0	22,7	11,5	13,4	47,8	41,4	14,1	13,1
Si(OH) ₄ (µM)	19,2	14,5	5,6	3,3	8,7	7,3	9,0	13,8

Le peuplement algal est systématiquement dominé par des Diatomées essentiellement des genres *Chaetoceros* et *Rhizosolenia* avec notamment *C. debilis* (Cleve) et *R. setigera* Brightwell. Les Dinophycées et Euglénophycées, principalement présents en juin et juillet, restent peu abondants. Les densités en phytoplancton dans les eaux du Golfe du Morbihan sont illustrées par la figure 2.

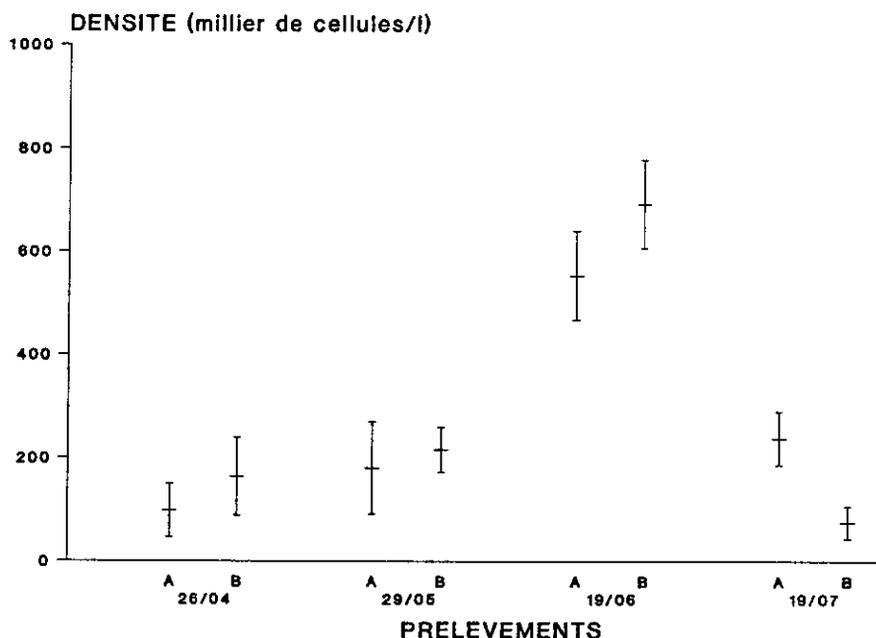


Figure 2 Densité en algues planctoniques dans les eaux du Golfe du Morbihan.
Phytoplanktonique density in Morbihan Gulf waters.

Les bioessais consistant à enrichir en azote et/ou phosphore des échantillons d'eau du Golfe, montrent une nette reprise de croissance des algues autochtones, pour tous les prélèvements concernés, uniquement sous l'action des ajouts contenant de l'azote (nitrate de sodium) (fig. 3). Aucune augmentation significative de la fluorescence, utilisée ici comme indice de croissance, n'est constatée dans les eaux du Golfe additionnées d'eau distillée (témoin) ou de solution de phosphate uniquement.

Une fraction non négligeable du phosphore et de l'azote en solution peut être utilisée pour la croissance des algues test. Les résultats les plus importants sont obtenus avec l'algue *Fragilaria elliptica*, utilisée au cours de toutes les campagnes. La comparaison entre la quantité totale de phosphore et d'azote, absorbée par l'algue test : *Fragilaria elliptica*, dans l'eau filtrée du Golfe, en fin de croissance, montre deux distributions inversées (fig. 4) : le maximum de phosphore correspondant au minimum d'azote et inversement. La

concentration moyenne en azote en solution assimilée par *Fragilaria elliptica*, représente $96 \pm 8\%$ de l'azote total en solution, tous prélèvements confondus (tableau 3). Pour le phosphore, par contre, les quantités de phosphore assimilées ($\mu\text{mol/l}$) : $0,52 \pm 0,08$ ($n = 3$) station A et $0,32 \pm 0,1$ ($n = 3$) station B, lors de la campagne du 19 juin, sont significativement inférieures aux quantités de phosphore total en solution : $3,8 \mu\text{mol/l}$ station A et $3,9 \mu\text{mol/l}$ station B.

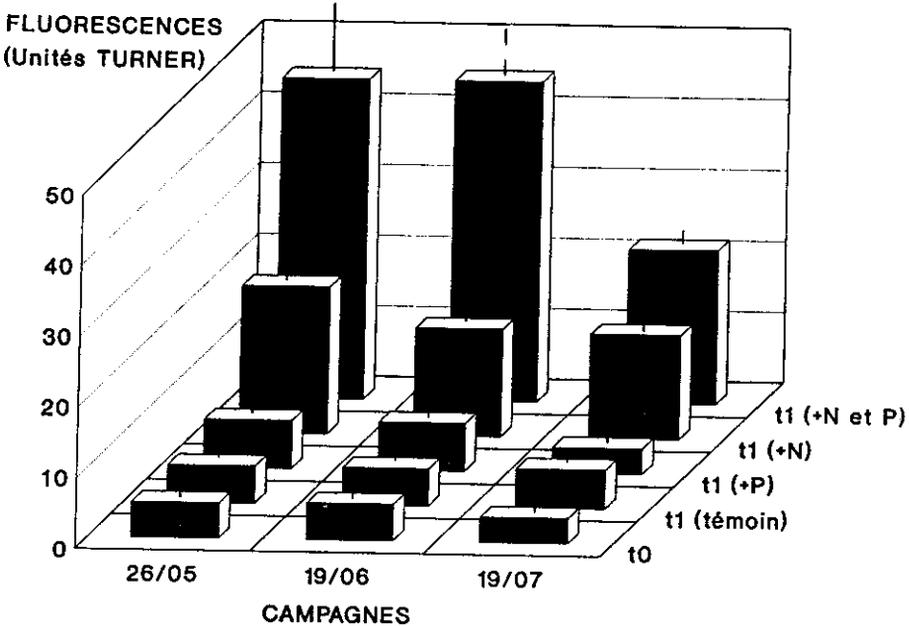


Figure 3 Biomasse des algues planctoniques du Golfe, estimée par fluorimétrie, après quatre jours d'incubation (t1), avec enrichissements combinés en nitrate (+N) et phosphate (+P).

Planktonique algal biomass of the Gulf, estimated by fluorimetry, after four days incubation (t1), with combined enrichments of nitrate (+N) and phosphate (+P).

Les densités en phytoplancton, dans le Golfe, supérieures ou égales à 180 000 cellules par litre apparaissent reliées de façon linéaire à la quantité d'azote en solution assimilée par l'algue test *F. elliptica* (fig. 5). Trois numérations phytoplanctonique présentent des résultats plus faibles : les deux de la campagne du mois d'avril et celui de la station B de la dernière campagne (19/07), avec une densité cellulaire significativement inférieure, au seuil de 95 %, à celle de la station A ($t = 5, 95$; $n = 62$). Les prélèvements de la première campagne (26/04) se distinguent nettement par une température de 11°C contre 21 à 22°C pour les suivantes (tableau 3). Le prélèvement de la station B de la dernière campagne (19/07) se caractérise pour une autre raison : il présente une concentration faible en phosphore en

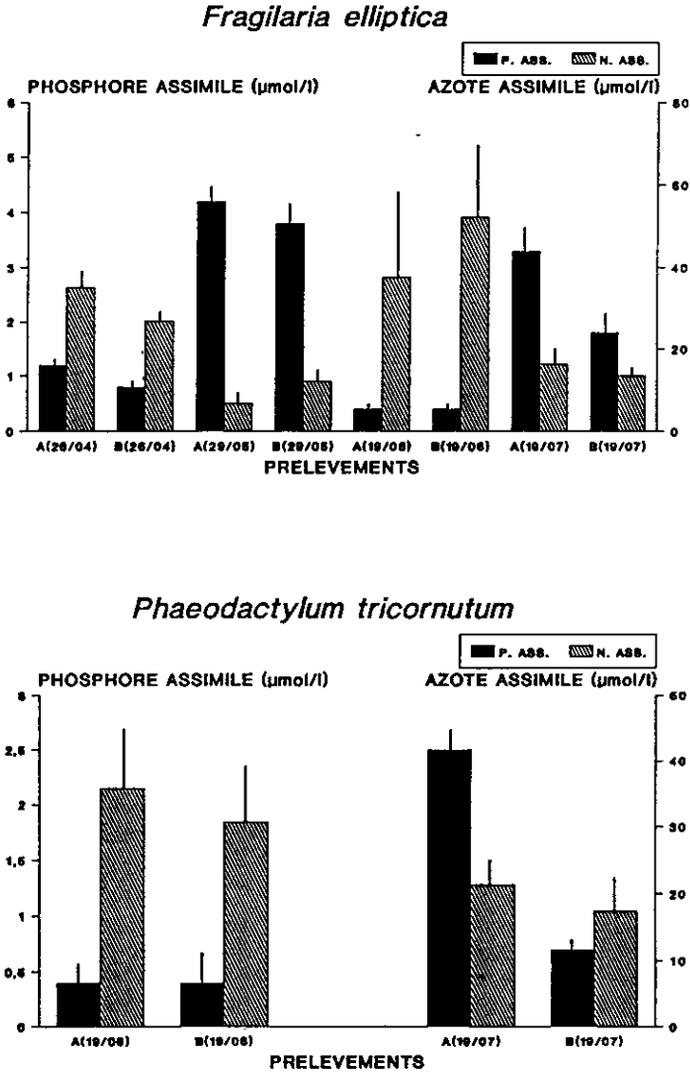


Figure 4 Quantités de phosphore et d'azote assimilées par *F. elliptica* et *P. tricornutum* dans l'eau filtrée, selon les prélèvements, définis par STATION et (DATE).

Phosphorus and nitrogen assimilated by F. elliptica and P. tricornutum in sterily filtered waters, against samples, define by STATION and (DATE).

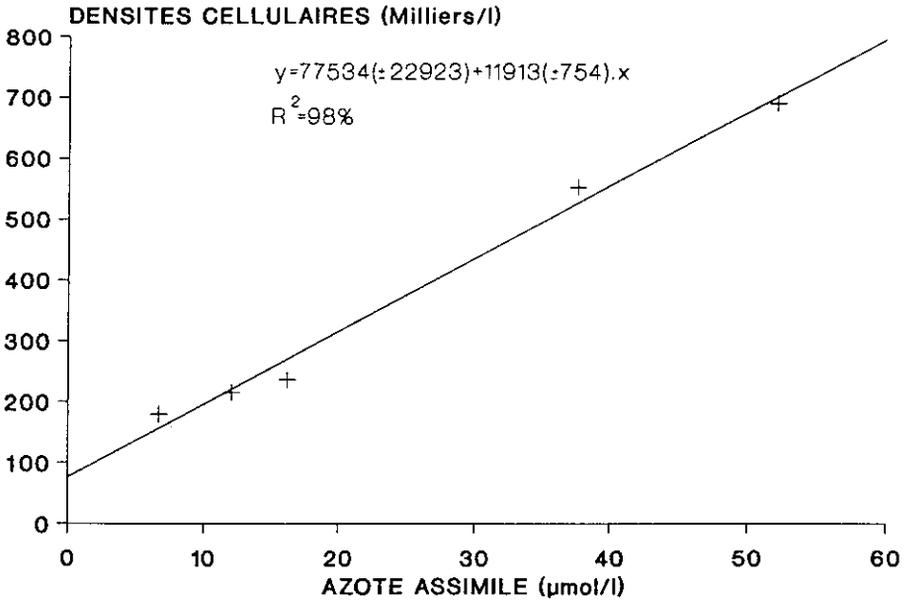


Figure 5 Relation entre la quantité d'azote en solution assimilée en bioessai par *F. elliptica* et la densité en phytoplancton dans les eaux du Golfe (pour les prélèvements où elle est supérieure ou égale à 180 000 cellules/l).
*Relationship between soluble nitrogen quantity assimilated in bioassay by *F. elliptica* and phytoplankton density in Morbihan Gulf waters (when it is higher or equal to 180 000 cells/l).*

solution assimilée par les algues tests en comparaison de celle obtenu pour le prélèvement de la station A de la même campagne. Cette différence est significative au seuil de 95 % ($t = 24, 94$; $n = 6$) avec l'algue *Phaeodactylum tricornutum* (fig. 4), alors que les concentrations en azote en solution assimilées sont presque identiques. Lors de cette campagne, la relation entre la densité cellulaire en phytoplancton des eaux du Golfe et le phosphore en solution assimilée en bioessai permet donc d'impliquer l'élément phosphore dans la régulation du peuplement naturel.

Les dosages des quotas cellulaires minimaux et maximaux des algues tests, en fin de croissance (tableau 4), présentent des valeurs du même ordre de grandeur que ceux répertoriés par DAUTA (1982) pour un ensemble de microalgues. Les quotas cellulaires en phosphore mesurés en fin de croissance sur les deux algues tests lors des bioessais ne diffèrent généralement pas du quota cellulaire minimum de l'algue utilisée (fig. 6). Seules deux séries de bioessais avec l'algue *F. elliptica* donnent des résultats différents, à la dernière campagne (19/07) et surtout à la deuxième campagne (29/05). Ces quotas cellulaires très élevés de la deuxième campagne sont expliqués par la formation exceptionnelle d'amas cellulaires suffisamment stable pour entraîner, par la mesure de la turbidité en densité optique, une sous estimation de la densité cellulaire. Les quotas cellulaires en azote présentent, quant à eux, des écart-types trop importants pour mettre des résultats en évidence (fig. 6).

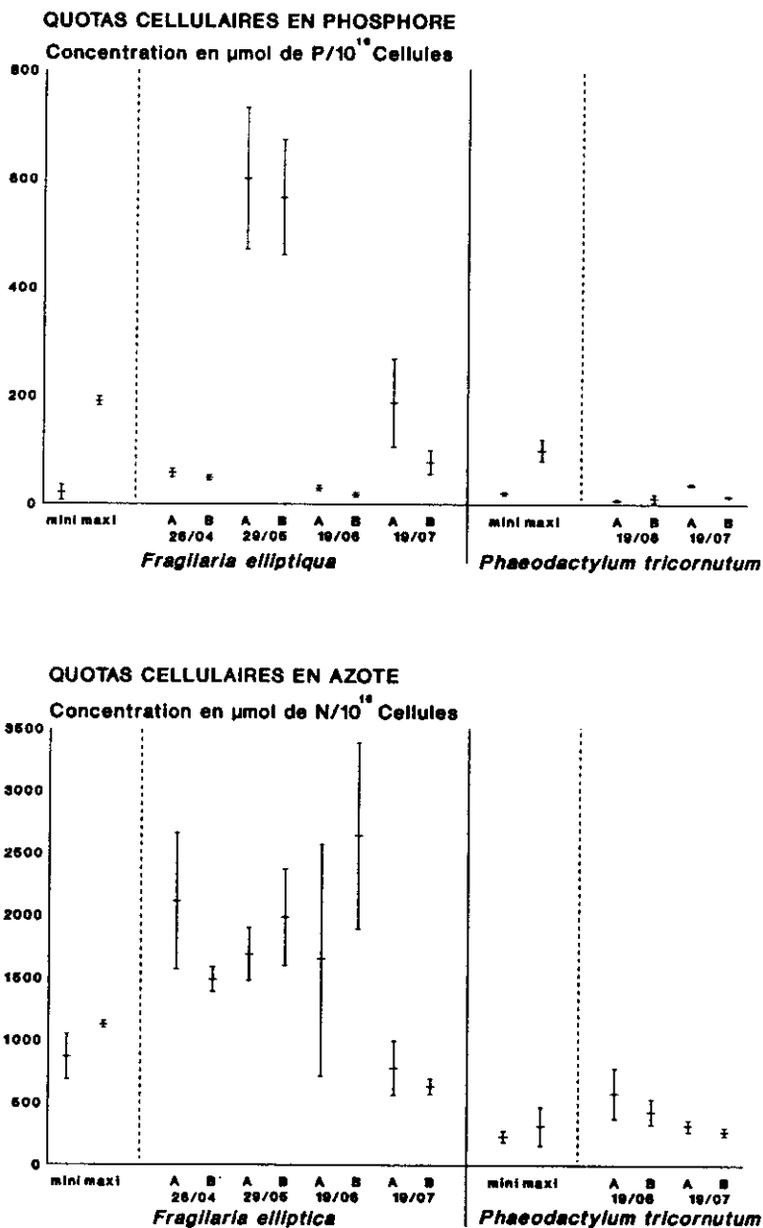


Figure 6 Quotas cellulaires en azote et en phosphore en fin de croissance des algues tests en bioessai, défini par STATION et (DATE), comparés aux quotas cellulaires minimaux et maximaux (en μmol pour 10^{10} cellules).
Phosphorus and nitrogen cell quota at the end of the growth in bioassay, define by STATION and (DATE), are compared to higher and lower cell quota (μmol for 10^{10} cell).

Tableau 4 Quotas cellulaires minimaux et maximaux en phosphore et en azote des algues tests (en μmol pour 10^{10} cellules).

Table 4 Minimum and maximum cell quotas in phosphorus and nitrogen of the test algae (μmol for 10^{10} cells).

<i>Fragilaria elliptica</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
Quota minimal Azote 870 ± 184 Phosphore 21 ± 15	Quota minimal Azote 231 ± 44 Phosphore 20 ± 3
Quota maximal Azote $1\ 130 \pm 28$ Phosphore 191 ± 8	Quota maximal Azote 315 ± 156 Phosphore 100 ± 20

L'absence de croissance significative des algues autochtones, en bioessai sans ajouts d'azote et de phosphore (témoin) peut caractériser un peuplement en situation de croissance nulle, le taux de croissance et le taux de mortalité sont égaux (fig. 3).

Les bioessais, avec enrichissements de l'eau intégrale de la station A montrent une limitation de la croissance du peuplement algal du Golfe essentiellement due à la biodisponibilité en substances azotées (fig. 3). L'évolution symétrique de la densité en phytoplancton dans les eaux du Golfe et de la concentration en azote assimilée en solution par *F. elliptica*, lors des bioessais sur l'eau filtrée des prélèvements les plus denses en phytoplancton (fig. 4), est significative de l'importance de cet élément dans l'eutrophisation du milieu ; la quantité d'azote en solution assimilée étant elle-même liée à la concentration en azote total en solution.

Par contre, la quantité de phosphore, alimentant la croissance du peuplement naturel dans le Golfe, est totalement différente de celle assimilée par les algues tests en bioessai. En effet, aux prélèvements d'eau du Golfe les plus denses en phytoplancton autochtone, correspondent les concentrations les plus faibles en phosphore en solution assimilées par les algues tests. Le phosphore n'étant pas alors l'élément limitant (fig. 3), une autre source de cet élément alimente le peuplement naturel, liée soit à un pool interne, soit à la matière en suspension. Elle n'est donc pas prise en compte lors des bioessais sur l'eau filtrée à $0,2 \mu\text{m}$. Le compartiment : phosphore en solution assimilé par les algues tests, apparaît soumis à la densité cellulaire en algues phytoplanctoniques du Golfe.

Il est généralement établi que l'azote limite la croissance du phytoplancton en mer et le phosphore dans les eaux douces (PAASCHE *et al.*, 1988). Cependant BERLAND *et al.* (1973), procédant à des bioessais avec algues tests par enrichissements sélectifs en substances nutritives sur de l'eau de la méditerranée filtrée stérilement, met en évidence une limitation importante de leur croissance, due au phosphore. De même, PAASCHE *et al.* (1988) procédant par suivi de la croissance d'une algue épuisée en azote ou en phosphore dans de l'eau filtrée, conclut qu'une limitation du taux de croissance par la biodisponibilité du phosphore est également possible en milieu côtier.

Le dosage des quotas cellulaires en fin de croissance met en évidence l'implication du phosphore dans la limitation de la croissance des algues tests. Le rôle de l'azote ne peut alors pas être précisé : les résultats obtenus pour les quotas cellulaires ne différaient pas significativement des quotas minimaux et maximaux.

Ces techniques de bioessai ne permettent sans doute pas la quantification de la véritable biodisponibilité du phosphore, le cas de la station B lors de la dernière campagne étant l'exception qui confirme la règle. En effet, la filtration stérilisante sur membrane à 0,2 μm retient des particules et certains colloïdes sur lesquels sont adsorbés des éléments biodisponibles pour les algues et notamment le phosphate ferrique (BERLAND *et al.*, 1973). Ainsi, une faible concentration en phosphore en solution assimilée, par les algues tests, ne signifie pas que cet élément soit limitant.

Les résultats, combinant les analyses physico-chimiques et les bioessais, obtenus au cours de ces campagnes permettent de considérer l'azote et le phosphore comme deux ressources jouant un rôle fondamental dans le contrôle de la croissance du peuplement algal du Golfe du Morbihan.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée avec la participation du Conseil Général du Morbihan, dans le cadre de l'Observatoire des Ressources Vivantes du Golfe du Morbihan. La station de Biologie Marine de Bailleron (Golfe du Morbihan), grâce à l'aimable autorisation de son directeur : le Professeur DAGUZAN, a permis la réalisation de cette recherche dans les meilleures conditions. F. VERGER LAGADEC et Y. GUEUNÉ, du Laboratoire d'Evolution des Systèmes Naturels et Modifiés, ont déterminé et isolé l'algue *Fragilaria elliptica*, au Vivier S/mer, de part et d'autre des portes à flot.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERLAND B.R., BONIN D.J., MAESTRINI S.Y., POINTIER J.P., 1972. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. I. Comparaison des méthodes d'estimation. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, **57** (6), 933-944.
- BERLAND B.R., BONIN D.J., MAESTRINI S.Y., POINTIER J.P., 1973. Etude de la fertilité des eaux marines au moyen de tests biologiques effectués avec des cultures d'algues. IV. Etude d'eaux côtières méditerranéennes. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, **58** (4), 473-500.
- CHIAUDANI G., VIGHI M., 1976. Comparison of different techniques for detecting limiting or surplus nitrogen in batch cultures of *Selenastrum capricornutum*. *Wat. Res.*, **10**, 725-729.

- DAUTA A., 1982. Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. II. Rôle des nutriments : assimilation et stockage intracellulaire. *Annls Limnol.*, 18 (3), 263-292.
- ELRIFI I.R., TURPIN D.H., 1985. Steady-state luxury consumption and the concept of optimum nutrient ratios : a study with phosphate and nitrate limited *Selenastrum minutum* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, 21, 592-602.
- HOBRO R., WILLEN E., 1977. Phytoplankton countings. Intercalibration results and recommendation for routine work. *Int. Revues ges. Hydrobiol.*, 62 (6), 805-811.
- KOTAI J., KROGH T., SKULBERG O.M., 1978. The fertility of some Norwegian inland waters assayed by algal cultures. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.*, 21 : 413-436.
- MAESTRINI S.Y., BONIN D.J., DROOP M.R., 1984. 4-Phytoplankton as indicators of sea water : bioassay approaches and protocols. *Algae as ecological indicators*, Academic Press Inc. London Ltd., 71-132.
- NYHOLM N., LYNGBY J.E., 1988. Algal bioassays in eutrophication research. A discussion in the framework of a mathematical analysis. *Wat. Res.*, 22 (10), 1293-1300.
- PAASCHE E., ERGA S.R., 1988. Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton in the inner Oslofjord (Norway). *Sarsia*, 73, 229-243.
- STRICKLAND J.H., PARSON T.R., 1968. *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa.
- STANDARD METHODS, 1980. For the Examination of Water and Wastewater. 15 th Edition. APHA-AWWA-WPCF. Mary Ann H. Franson Editor. 1133 pp.
- TILMAN D., 1982. *Resource competition and community structure*. Monograph in population biology 17, Princeton University Press, Princeton, 296 pp.
- VENRICK E.L., 1978. How many cells to count ? *Phytoplankton manual*, A. Sournia ed., 167-180.