

Programme d'intervention du CEVA
en faveur de l'action régionale et interdépartementale
pour la maîtrise des phénomènes de marées vertes

CIMAV 2016

RAPPORT SUR LE PROJET 3
COMPLEMENT D'ETUDE SUR LES PROCESSUS BIOLOGIQUES,
HYDROLOGIQUES ET SEDIMENTOLOGIQUES IMPLIQUES DANS LES
BLOOMS MACROALGAUX



ANNEE 2016 – Rapport final

SOMMAIRE

1	Contexte et objectifs.....	6
2	Expérience <i>in situ</i>	7
2.1	Site d'étude.....	7
2.2	Matériel et méthode.....	8
2.2.1	Dispositif expérimental	9
2.2.2	Protocole d'échantillonnage <i>in situ</i>	11
a.	Tests préliminaires.....	11
b.	Protocole <i>in situ</i>	11
c.	Expression des résultats	12
2.3	Résultats	13
2.3.1	Phase de tests préliminaires	13
2.3.2	Evènements remarquables durant la période d'expérimentation	16
2.3.3	Suivi de la biomasse algale	17
2.3.4	Quotas azotés et phosphorés des algues.....	20
a.	Evolution mensuelle des quotas azotés et phosphorés des lots d'algues	20
b.	Analyse détaillée des quotas azotés et phosphorés des algues	22
2.4	Discussion.....	36
3	Expériences en laboratoire	38
3.1	Matériel et méthodes.....	38
3.1.1	Le dispositif expérimental	38
3.1.2	Méthodologie	39
a.	Mise au point méthodologique.....	39
b.	Protocole en conditions contrôlées	39
3.2	Résultats	41
3.2.1	Phase de tests préliminaires	41
3.2.2	Evolution de la biomasse	42
3.2.3	Analyses des algues, de l'eau et de la vase.....	44
a.	Quotas azotés et phosphorés des algues.....	44
b.	Dosage de l'eau de mer filtrée et non filtrée.....	50
c.	Dosage de la vase.....	55
3.3	Discussion.....	57
4	Conclusion	60
5	Bibliographie.....	106

FIGURES

Figure 1 : Illustration de la vasière du LEDANO (estuaire du Trieux, Côtes d'Armor) et localisation de la station d'expérimentation (cercle blanc)	7
Figure 2 : Carte représentant le trajet pédestre entre le parking et le dispositif expérimental	8
Figure 3: cycle de l'azote et du phosphore à l'interface eau-sédiment (Chapelle et al. 1994, p. 611)	9
Figure 4 : Photo du dispositif expérimental sur le site d'étude.....	10
Figure 5 : Photo d'une cage munie de son ouverture sur la face avant.....	10
Figure 6 : Photos des algues à l'intérieur des cages 1H et 2H et de l'extérieur de la cage 1H.....	13
Figure 8 : Quotas azotés et phosphorés des lots d'algues, le 7 juillet 2016 et rappel des biomasses obtenues au bout de 17 et 21 jours. Aucun gain de biomasse n'est évalué pour les algues du milieu (algues « libres »).	15
Figure 9 : Photos de terrain illustrant des problèmes rencontrés lors de l'expérience <i>in situ</i>	16
Figure 10 : Biomasse estimée des lots d'ulves obtenue après 15 jours d'expérience	18
Figure 11 : Evolution mensuelle des couvertures algales sur la vasière du Lédano (estimation visuelle)	19
Figure 12 : Evolution saisonnière des quotas azotés des ulves du milieu et des lots H et B	21
Figure 13 : Evolution saisonnière des quotas phosphorés des ulves du milieu et des lots H et B.	22
Figure 14 : Quotas azotés des lots d'algues pour la période de fin juillet	23
Figure 15 : Quotas phosphorés des lots d'algues pour la période de fin juillet.....	23
Figure 16 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de fin juillet.	25
Figure 17: Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de début août.	27
Figure 18 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de mi-août.	29
Figure 19 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de fin août.	31
Figure 20: Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de mi-septembre.....	33
Figure 21 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de fin septembre à fin octobre.	35
Figure 22 : Photo du dispositif expérimental réalisé au CEVA.....	38
Figure 23: Biomasse des lots d'ulves obtenue après 5, 10 et 15 jours d'expérience	43
Figure 24 : Photos illustrant lors de l'expérimentation des 15 jours, la différence de comportement des algues avec agitation (1) et sans agitation (2) et le blanchiment du lot d'algues AVSA3 présent dans le bac (3) et dans la bassine de tri (4).	43
Figure 25 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues après 5 et 10 jours d'expérience (du 25 août au 9 septembre 2016)	46
Figure 26 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues après 15 jours d'expérience (du 15 au 30 septembre 2016).....	49

Figure 27 : Dosage des échantillons d'eau de mer non filtrée prélevés en début d'expérimentation (avant l'ajout des algues) dans un bac contenant de la vase , dans un bac sans vase et directement en sortie de robinet « eau de mer »	50
Figure 28 : Dosage des échantillons d'eau de mer non filtrée prélevés au bout de 5 et 10 jours d'expérimentation dans les bacs EVA (vase et agitation), les bacs EVSA (vase sans agitation) et les bacs ESV (sans sédiment).....	52
Figure 29 : Dosage des échantillons d'eau de mer filtrée prélevés avant l'expérience de 15 jours (avant l'ajout des algues et 6 jours après l'ajout d'eau) dans un bac avec la modalité « vase et agitation », un bac avec la modalité « vase sans agitation » et un bac sans vase. L'eau analysée a été prélevée avant la mise en œuvre des expérimentations. Le bac « vase et agitation » n'avait donc pas encore subi d'agitation au moment du prélèvement d'eau.....	53
Figure 30 : Dosage des échantillons d'eau de mer filtrée prélevés au bout de 15 jours d'expérimentation dans les bacs EF15VA (vase et agitation), les bacs EF15VSA (vase sans agitation) et les bacs EF15SV (sans sédiment).....	54
Figure 31 : Moyenne des contenus azotés et phosphorés des échantillons de vase prélevés en début et fin d'expérimentation	56
Figure 32: Granulométrie d'un échantillon de vase prélevé sur la vasière du LEDANO en début d'expérimentation labo	104
Figure 33: Granulométrie d'un échantillon de vase prélevé dans les bacs en fin d'expérimentation labo	105

TABLEAUX

Tableau 1 : Calendrier des manipulations sur le terrain et au CEVA	12
Tableau 2 : Estimation des biomasses algales obtenues des lots 1H et 1B au bout de 7 et 15 jours	14
Tableau 3 : Liste avec justification des lots exclus de l'analyse des résultats	20
Tableau 4 : Résumé du nombre d'échantillons et de leur nature pour les expériences en laboratoire.....	40
Tableau 5 : Dosages de l'ammonium (NH_4^+), des orthophosphates (PO_4^{3-}) et des nitrates (NO_3^-) dans l'eau de mer relevés à Roscoff (données fournies par « Service d'Observation en Milieu Littoral, INSU-CNRS, Station Roscoff) et à Pleubian à la période fin août-début septembre.	57

1 Contexte et objectifs

Les actions proposées dans ce programme sont destinées à la **consolidation, par méthode expérimentale, des connaissances sur le fonctionnement écologique des blooms macroalgaux**, la crédibilité des acquis scientifiques sur l'origine, les conditions de développement et les moyens de limitation des marées vertes, étant encore régulièrement remise en cause, notamment par certains acteurs agricoles. Les données acquises précédemment dans le cadre de ce projet ont notamment permis d'améliorer l'opérationnalisation du modèle écologique Mars-ulves, outil qui a permis de fixer les objectifs de réduction des concentrations azotés pour les cours d'eau alimentant les baies dans lesquelles se développent les algues vertes (Perrot et al. 2014).

En Bretagne, plusieurs masses d'eau côtières sont déclassées en raison de proliférations d'algues vertes sur vasières. La Disposition 10A-2 du SDAGE Loire-Bretagne 2016-2021 prévoit l'initiation d'études d'identification de l'origine des apports d'azote, et notamment la part issue du relargage sédimentaire, sur les sites de vasières contribuant au déclassement des masses d'eau au titre des marées vertes. Sont concernés par la disposition 10A-2 en priorité les sites de vasières des masses d'eau de transition suivantes :

- FRGT02 : Bassin maritime de la Rance
- FRGT03 : Le Trieux
- FRGT06 : Rivière de Morlaix
- FRGT07 : La Penzé
- FRGT08 : L'Aber Wrac'h
- FRGT14 : Rivière de Pont l'Abbé
- FRGT20 : Le Blavet
- FRGT21 : Rivière d'Etel
- FRGT24 : Rivière de Vannes
- FRGC39 : Golfe du Morbihan

De façon à répondre aux différentes problématiques et à appuyer les SAGEs dans la mise en œuvre d'études d'identification de l'origine des apports d'azote et notamment de la part issue du relargage, le CEVA a participé en 2016 à deux axes de travail :

- **Axe 1** : La mise en place d'un groupe de travail scientifique regroupant les experts dans le domaine de l'estimation des flux sédimentaires. L'Agence de l'eau Loire-Bretagne a sollicité le CRESEB pour animer ce groupe de travail dont l'objectif était de produire en 2017 des documents au service des SAGEs sur l'état des connaissances scientifiques quant à l'étude des flux de nutriments conduisant aux proliférations locales sur vasières, y compris la part issue du sédiment. Ce groupe de travail a également été saisi pour évaluer la pertinence des expérimentations menées par le CEVA dans le cadre de ce projet.
- **Axe 2** : utilisation des ulves dans le milieu naturel et en laboratoire pour estimer le flux sédimentaire.

D'après la synthèse bibliographique réalisée par le CEVA, aucune méthode actuelle ne permet de déterminer l'intégralité des flux sédimentaires en jeu. Les flux émis par le sédiment peuvent être fugaces, très variables à l'échelle de l'heure, de la journée, de la saison, orientés alternativement vers la colonne d'eau ou vers le sédiment et donc plus ou moins utilisables pour la croissance des algues..... Ainsi, du fait de la complexité de la mesure directe des différents flux sédimentaires, le CEVA a proposé dans le cadre de cette étude, d'utiliser les ulves afin d'évaluer la contribution sédimentaire à la biomasse créée. Pour cela, une expérimentation *in situ* (vasière du Lédano, estuaire

du Trieux, Côtes d'Armor) et une expérimentation en conditions contrôlées, ont été réalisées par le CEVA sur la période de juillet à octobre 2016. Ces deux expériences mettent en œuvre une approche commune à savoir la mesure de la croissance et des contenus internes en azote et en phosphore d'algues en contact ou non avec la vase.

2 Expérience *in situ*

2.1 Site d'étude

Afin d'évaluer la contribution du sédiment au développement des algues vertes *in situ*, le CEVA a choisi comme site d'étude la vasière du LEDANO (estuaire du Trieux, Côtes d'Armor). Cette vasière présente le double avantage d'être située dans une masse d'eau prioritaire dans le SDAGE 2016-2021 sur la problématique de la prolifération des algues vertes sur vasière et se trouve à proximité du CEVA, ce qui a permis une optimisation des coûts. Le site d'étude et la station d'expérimentation sont présentés Figure 1.



Figure 1: Illustration de la vasière du LEDANO (estuaire du Trieux, Côtes d'Armor) et localisation de la station d'expérimentation (cercle blanc)

Le chemin d'accès à la station d'expérimentation (Figure 2) est facilement praticable sur 250 m en passant par les zones caillouteuses mais plus difficile au niveau du dispositif situé sur une zone vaseuse. Pour faciliter les déplacements et notamment autour de la station d'expérimentation, les opérateurs ont utilisé deux tapis en polyester avec un maillage spécifique permettant une meilleure stabilité sur la vase.

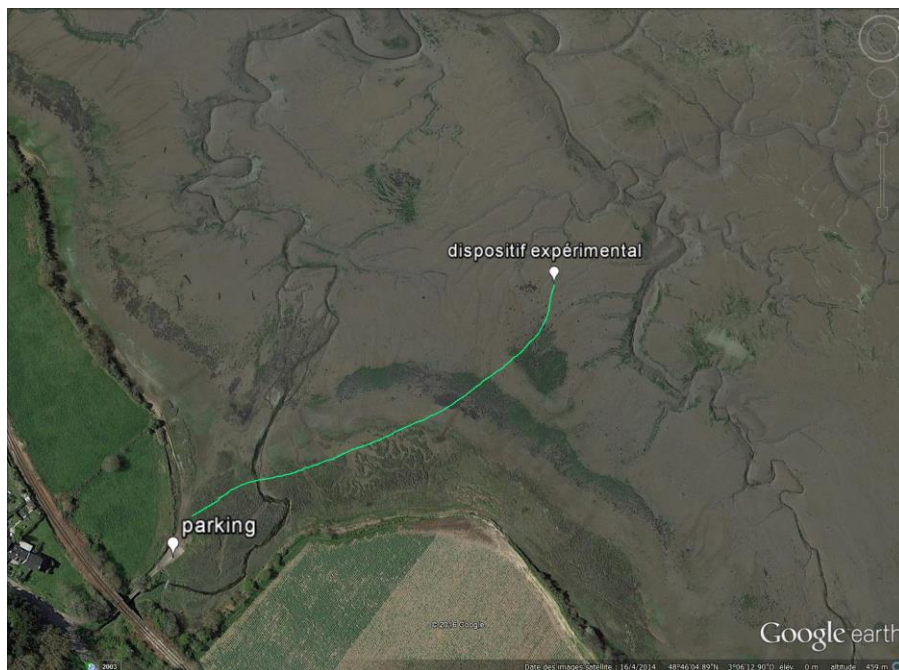


Figure 2 : Carte représentant le trajet pédestre entre le parking et le dispositif expérimental

2.2 Matériel et méthode

Il est reconnu que les échanges entre le sédiment et la colonne d'eau sont un des paramètres clés des écosystèmes côtiers dans les cycles de l'azote et du phosphore (CEVA 2015). Les processus de minéralisation sédimentaire de la matière organique particulaire résultant de la production pélagique, benthique et des apports terrigènes génèrent de l'azote et du phosphore inorganiques dissous qui peuvent ensuite être transférés vers la colonne d'eau (Figure 3).

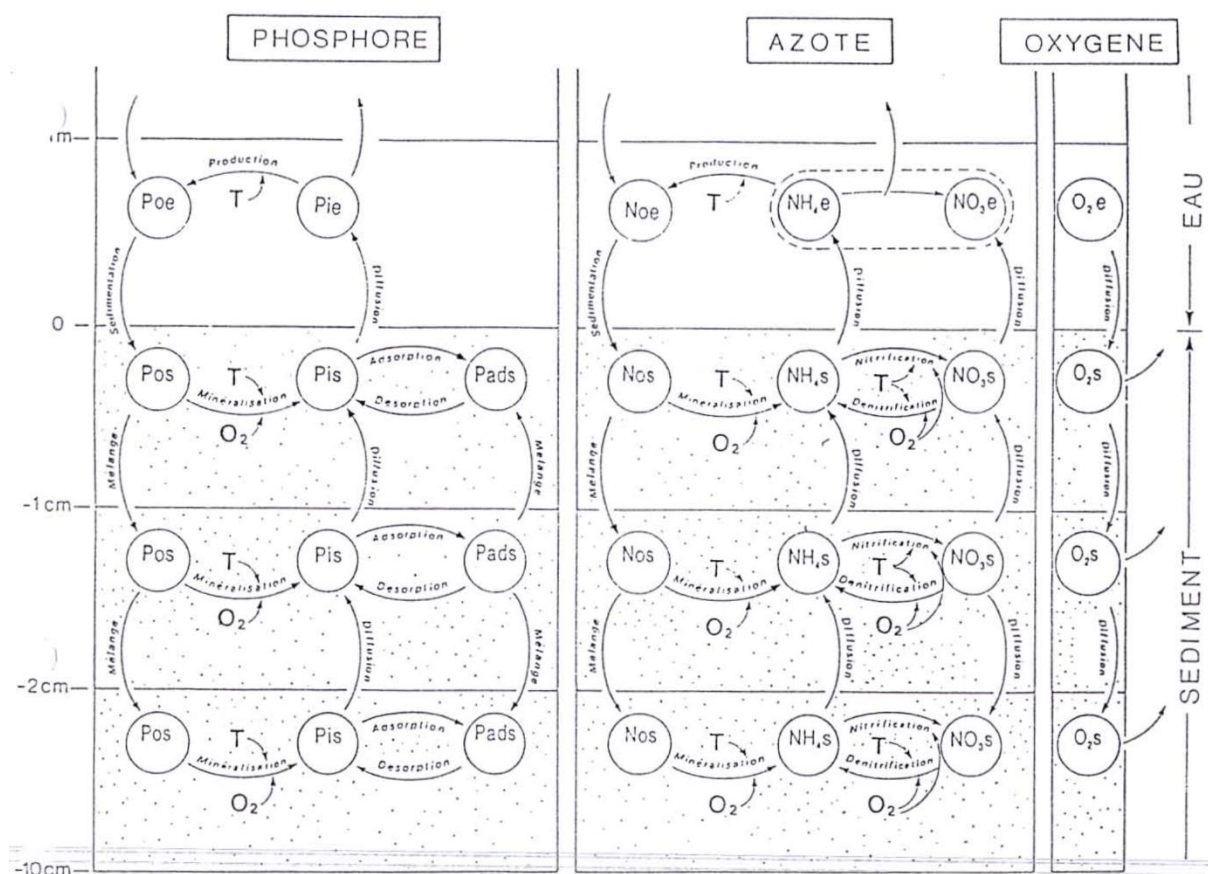


Figure 2

Schéma conceptuel du modèle.

Poe: Phosphore organique dans l'eau
 Pis: Phosphates dissous dans l'eau interstitielle
 Noe: Azote organique dans l'eau
 Nos: Azote organique dans le sédiment
 O₂s: Oxygène dans le sédiment

Pie: Phosphore inorganique dans l'eau
 Pads: Phosphore adsorbé
 NH₄e: Ammonium dans l'eau
 NH₄s: Ammonium dans l'eau interstitielle
 O₂e: Oxygène dans l'eau

Pos: Phosphore organique dans le sédiment
 NO₃e: Nitrates et nitrites dans l'eau
 NO₃s: Nitrates et nitrites dans l'eau interstitielle

Figure 3: cycle de l'azote et du phosphore à l'interface eau-sédiment (Chapelle et al. 1994, p. 611)

Plusieurs études réalisées dans les estuaires ont mis en évidence que les nutriments assimilés par les macroalgues provenaient en partie du flux sédimentaire (Kamer et al. 2004). Par ailleurs, les macroalgues peuvent être utilisées comme intégrateurs des concentrations en nutriments dans l'environnement dans lequel elles évoluent (Barr 2007).

Dans ce présent travail, il est proposé d'utiliser cette capacité des ulves à refléter le niveau nutritionnel du milieu dans lequel elles se trouvent afin de déterminer l'importance des apports sédimentaires pour la croissance des ulves en vasière.

2.2.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental était composé de 6 « cages », recouvertes de toile à mailles fines (d'un 1 mm de côté) permettant de retenir les algues et limiter l'intrusion d'organismes, notamment de brouteurs, placées sur le site d'étude suivant les modalités suivantes (Figure 4):

- 3 cages disposées à même la vase pour que les algues soient en contact avec le sédiment.
- 3 cages disposées en hauteur (environ 20 cm au-dessus du sédiment) pour que les algues ne soient pas en contact avec le sédiment.

Les cages ont été installées alternativement et ont été codées de 1 à 3 avec la lettre H pour Haut et B pour Bas.



Figure 4 : Photo du dispositif expérimental sur le site d'étude.

Une ouverture a été créée sur chaque cage de manière à pouvoir introduire et prélever les algues. Chaque ouverture était fermée à l'aide de 2 fils de pêche reliés à un crochet par un élastique (Figure 5).



Figure 5 : Photo d'une cage munie de son ouverture sur la face avant

Les cages posées sur le sédiment n'avaient pas de toile au fond pour que les algues soient directement en contact avec le sédiment. Les cages en hauteur étaient munies d'un fond en toile à maille fine doublé, par le dessous d'une toile étanche (« alèse ») de manière à limiter la dessiccation des algues lors des marées basses.

2.2.2 Protocole d'échantillonnage *in situ*

a. Tests préliminaires

L'approche novatrice de cette étude a nécessité plusieurs tests préliminaires de façon à valider préalablement le dispositif expérimental et la méthodologie. Cette phase préliminaire s'est déroulée du 16 juin au 7 juillet 2016, les ulves étant trop peu présentes dans le milieu avant cette date (prolifération 2016 particulièrement tardive).

Pour cette phase de tests, seules 3 cages ont été installées sur le site d'étude correspondant aux cages 1H, 1B et 2H (Figure 4). A la différence de la cage 2H qui n'avait que son fond en toile « grillagée », une alèse a été installée au fond de la cage 1H dans le but de limiter la dessiccation des algues à marée basse. Cette phase préliminaire comportait les tests suivants:

- **Test 1** : 100 g d'algues pressées introduites dans les 3 cages 9 h avant la marée haute.

A la suite de cette première mise en place des algues, l'évolution de la biomasse algale a été suivie.

- **Test 2** : Mesure de la croissance des algues des cages 1H et 1B

Ce test consistait à suivre la croissance des lots d'algues en fonction des modalités en contact ou non avec le sédiment. A noter que les deux lots d'algues n'ont pas été mis au même moment dans les cages mais ont été prélevés en même temps à deux reprises au bout de 9 et 17 jours pour la cage 1H et au bout de 13 et 21 jours pour la cage 1B. Au premier prélèvement, les lots d'algues ont été pesés et remis dans les cages. Au deuxième prélèvement, en plus de la mesure de biomasse, les lots d'algues ont été préparés pour l'analyse de leurs quotas internes en azote et phosphore.

b. Protocole *in situ*

Pour débiter chaque série d'expérience de 15 jours, deux sorties terrain sur le site d'étude étaient planifiées le même jour pendant les heures de basse-mer.

La première sortie terrain consistait à prélever des ulves à proximité du site d'étude et à récupérer les lots d'ulves présents dans chaque cage (hormis lors de l'initiation de l'expérimentation où aucun lot d'ulves n'était encore présent dans les cages).

Les algues prélevées dans le milieu étaient triées, nettoyées, pressées à la main et pesées au laboratoire du CEVA de manière à obtenir 6 lots de 100 g (poids frais) d'ulves qui, lors de la **deuxième sortie terrain**, étaient disposés dans les cages pour renouveler (ou initier) l'expérience. Un lot supplémentaire de 100 g d'ulves était aussi préparé au laboratoire du CEVA pour :

- analyser les contenus internes en azote et en phosphore (appelés aussi quotas) des algues utilisées pour l'expérimentation.
- vérifier que les algues disposées dans les cages au contact du sédiment avaient une évolution similaire aux algues *in situ* (et qu'il n'y avait donc pas d'effet « cage »).

Les 6 lots d'ulves prélevés dans les cages à l'issue des 15 jours d'expérience étaient nettoyés, pressés à la main, pesés, lyophilisés et envoyés dans un laboratoire agréé pour la mesure des quotas internes en azote et en phosphore. Ce cycle de prélèvement/renouvellement des lots a été maintenu toutes les 2 semaines du 7 juillet au 27 octobre 2016 pour un total de 8 campagnes (Tableau 1).

Tableau 1 : Calendrier des manipulations sur le terrain et au CEVA

	<u>1^{ère} sortie terrain :</u> Prélèvement ulves		<u>Au CEVA :</u> Préparation ulves		<u>2^{ème} sortie terrain :</u> Renouvellement ulves	
Date	dans milieu	dans cages	pour cages	pour analyse	dans cages	Nombre d'échantillons
Jeudi 7 juillet	X	X ⁽¹⁾	X		X	
Vendredi 8 juillet				X ⁽¹⁾		3 ⁽¹⁾
Jeudi 21 juillet	X	X	X		X	
Vendredi 22 juillet				X		7
Mercredi 3 août	X	X	X		X	
Jeudi 4 août				X		7
Jeudi 18 août	X	X	X		X	
Vendredi 19 août				X		7
Mercredi 31 août	X	X	X		X	
Jeudi 1 sept.				X		7
Jeudi 15 sept.	X	X	X		X	
Vendredi 16 sept.				X		7
Mercredi 28 sept.	X	X	X		X	
Jeudi 29 sept.				X		7
vendredi 14 oct.	X	X	X		X	
Lundi 17 oct.				X		7
Jeudi 27 oct.		X		X		6

⁽¹⁾: 2 lots d'ulves issus de la phase test étaient présents dans les cages 1H et 1B avant le début de l'expérimentation et ont été prélevés pour l'analyse des quotas en laboratoire. Un échantillon d'ulves dans le milieu a aussi été prélevé pour l'analyse.

Entre chaque date de prélèvement, une mission de terrain sur le site d'étude était aussi effectuée. Lors de chaque sortie terrain, l'état du dispositif (colmatage, élastique cassé, fouling,...) était contrôlé et des photos de l'ensemble du dispositif et de chaque cage en vue extérieure et intérieure étaient prises.

Un protocole plus détaillé (Annexe 1) a été rédigé en début d'expérimentation afin de respecter les mêmes consignes de manipulation sur le terrain et au laboratoire.

c. Expression des résultats

Trois types de résultats ont été obtenus à l'issue des expérimentations *in situ* :

- Evolution de la biomasse algale obtenue par pesées régulières au cours de l'expérimentation
- Evolution des contenus internes en azote et en phosphore obtenus par l'analyse des algues prélevées à chaque début et fin d'expérience
- Quantité d'azote et de phosphore effectivement fixée par les algues. Cette donnée est obtenue en calculant la quantité de nutriments contenu dans X grammes d'algues en fin d'expérience à laquelle est soustraite la quantité de nutriments présente dans les algues au début de l'expérience. Un résultat positif indique une absorption des nutriments, un résultat négatif, une perte. Ce calcul permet de comparer des lots d'algues en s'affranchissant des

évolutions différentes de croissance et de contenus internes en nutriments pour ne se baser que sur le bilan nutritionnel.

2.3 Résultats

2.3.1 Phase de tests préliminaires

- **Test 1** : 100 g d'algues pressées introduites dans les 3 cages 9 h avant la marée haute.

Au bout de 24 h, les algues situées dans les cages en hauteur avaient blanchies de façon similaire dans les deux modalités, avec ou sans alèse. Ces deux lots d'algues ont vraisemblablement subi un stress hydrique important en début de test avec une émergence de 9 h avant la marée haute et avec une alèse peu efficace pour maintenir une humidité à marée basse car celle-ci n'était pas en contact avec les algues étant écartée du fond de la cage par le poids de l'eau (Figure 6). A noter que les algues pressées pour les pesées n'avaient pas été réhydratées avant leur introduction dans les cages. On note aussi que des algues environnantes se sont accumulées sur les tiges de balisage des cages, qui semblaient trop hautes.

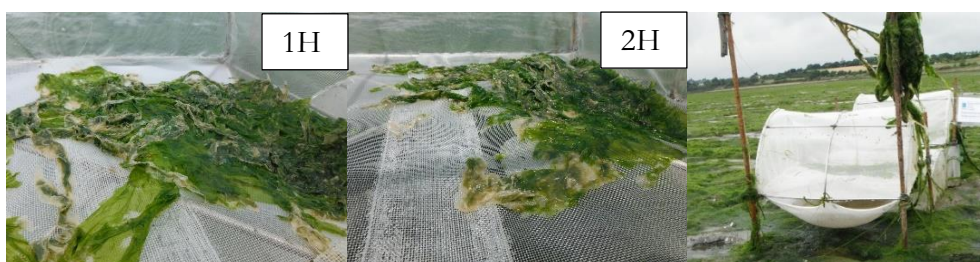


Figure 6 : Photos des algues à l'intérieur des cages 1H et 2H et de l'extérieur de la cage 1H

Ces observations ont permis d'effectuer les modifications suivantes avant de renouveler ce test :

- Installation au fond de la cage 1H, d'une nouvelle alèse placée entre 2 toiles à mailles fines pour éviter l'effet de « cuvette »
- Raccourcissement des tiges de balisage des cages
- Introduction des algues dans les cages 1H et 2H, au plus une heure avant l'immersion et réhydratation de celles-ci avant de les placer dans les cages.

Au bout d'une semaine, les algues situées dans les cages en hauteur n'avaient pas blanchies mais les algues de la cage 2H (sans alèse) semblaient plus sèches que celles de la cage 1H (avec alèse) après 6 h d'émergence.

Suite à ces résultats, le concept de placer une alèse au fond des cages en hauteur a été conservé pour se rapprocher au maximum des conditions que peuvent avoir les algues à marée basse en contact du sédiment (mais sans son influence nutritionnelle). De plus, il a été précisé dans le protocole d'introduire les algues dans les cages maximum 1 heure avant la marée montante et la réhydratation de celles-ci.

- **Test 2** : Mesure de la croissance des algues des cages 1H et 1B

A partir des résultats de biomasse des deux lots d'algues, deux courbes de tendances ont pu être calculées (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les équations de chaque courbe ont été

appliquées pour les lots 1H et 1B de manière à estimer la biomasse obtenue et le taux de croissance de ces lots d'algues au bout de 7 et 15 jours (Tableau 2).

Tableau 2 : Estimation des biomasses algales obtenues des lots 1H et 1B au bout de 7 et 15 jours

Cage	Biomasse totale estimée (g)		Taux de croissance (%)		
	7 jours	15 jours	0-7 jours	0-15 jours	7-15 jours
1B	163,37	230,88	7,01	5,58	4,32
1H	152,30	215,33	6,01	5,11	4,33

Le Tableau 2 montre que les algues situées en contact avec le sédiment ont une croissance plus importante que les algues placées en hauteur. Par ailleurs, il semble que la croissance des algues en contact du sédiment ralentit davantage en fin d'expérience par rapport à la croissance des algues situées en hauteur.

A la fin de cette phase de test, une mesure des quotas internes en azote et phosphore des algues des lots 1H, 1B et du milieu (1M) a été effectuée par le laboratoire Invivo Labs. Les résultats d'analyse sont illustrés dans la Figure 7.

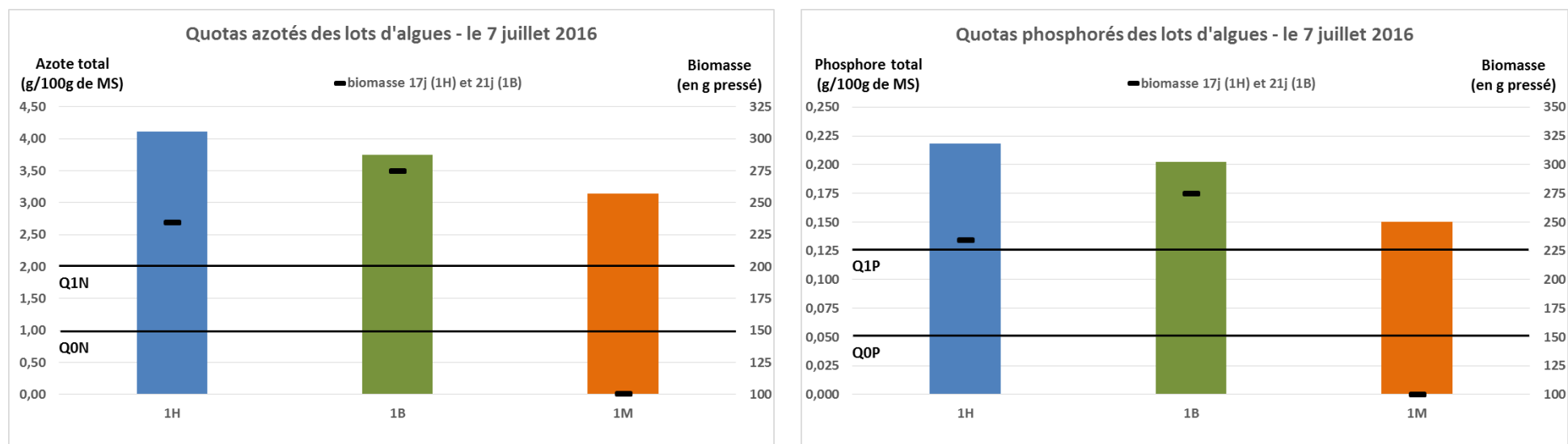


Figure 7 : Quotas azotés et phosphorés des lots d'algues, le 7 juillet 2016 et rappel des biomasses obtenues au bout de 17 et 21 jours. Aucun gain de biomasse n'est évalué pour les algues du milieu (algues « libres »).

Les résultats indiquent que les teneurs internes en azote et phosphore des algues en contact avec le sédiment (lot 1B) étaient inférieures à celles des algues en hauteur (lot 1H) et supérieures à celles des algues prélevées dans le milieu (1M) en fin d'expérience. Ces quotas plus faibles pour les lots 1B pourrait s'expliquer par le fait que les algues en contact avec le sédiment ont eu une meilleure croissance que celles en hauteur (contact avec le sédiment et durée d'expérimentation plus longue) et ont donc utilisé davantage de nutriments présents dans leurs tissus pour leur développement. Il est probable que la croissance dans les cages ait été toutefois moins importante que dans le milieu (effet d'auto-ombrage et algues qui sont « fixées » en un lieu par les cages plutôt que mobiles), ce qui expliquerait les quotas inférieurs pour les algues prélevées dans le milieu. Une durée de 21 jours semble donc trop longue et induirait un effet « cage ».

2.3.2 Evènements remarquables durant la période d'expérimentation

L'emplacement du dispositif sur la station d'expérimentation a été choisi pour son accès facile et un recouvrement du milieu important par les ulves laissant supposer une croissance sur place. Toutes les missions de terrain ont été effectuées (contrôle de l'état du dispositif, prises de photos des cages, prélèvements,...). Durant l'expérience, toutes les cages ont résisté, mise à part les élastiques permettant la fermeture des ouvertures qui ont cassés au fur et à mesure de l'expérience et qui ont été changés par du fil armé (Figure 8).

A partir de mi-août, des algues blanchies ont commencé à apparaître surtout dans les cages en hauteur et à partir de fin août, 2 lots d'ulves (1 lot en hauteur et 1 lot en contact avec la vase) étaient décomposés au bout de 15 jours. Sur le terrain, beaucoup de zones blanchies (signe de putréfaction) étaient présentes et une forte odeur de putréfaction d'algues (H_2S) était perceptible au cours de ce mois d'août (Figure 8). A partir de septembre et jusqu'à fin octobre, les algues des cages et du milieu étaient en bon état. Toutefois, du fouling est apparu sur les cages à partir de mi-septembre et s'est accentué, malgré un brossage régulier jusqu'à fin octobre (Figure 8).



Figure 8 : Photos de terrain illustrant des problèmes rencontrés lors de l'expérience *in situ*.

2.3.3 Suivi de la biomasse algale

Le temps d'expérience pour chaque série de 6 lots d'ulves était initialement prévu à 15 jours. Toutefois, en fonction des horaires de marée basse et des jours ouvrables, le temps d'expérience a varié de 13 à 17 jours. Pour pallier aux biais que peuvent introduire ces durées variables d'expérience, chaque résultat de biomasse d'ulves a été recalculé sur une base de 15 jours d'expérience. La Figure 9 présente les biomasses d'ulves de chaque lot obtenues lors des 8 campagnes.

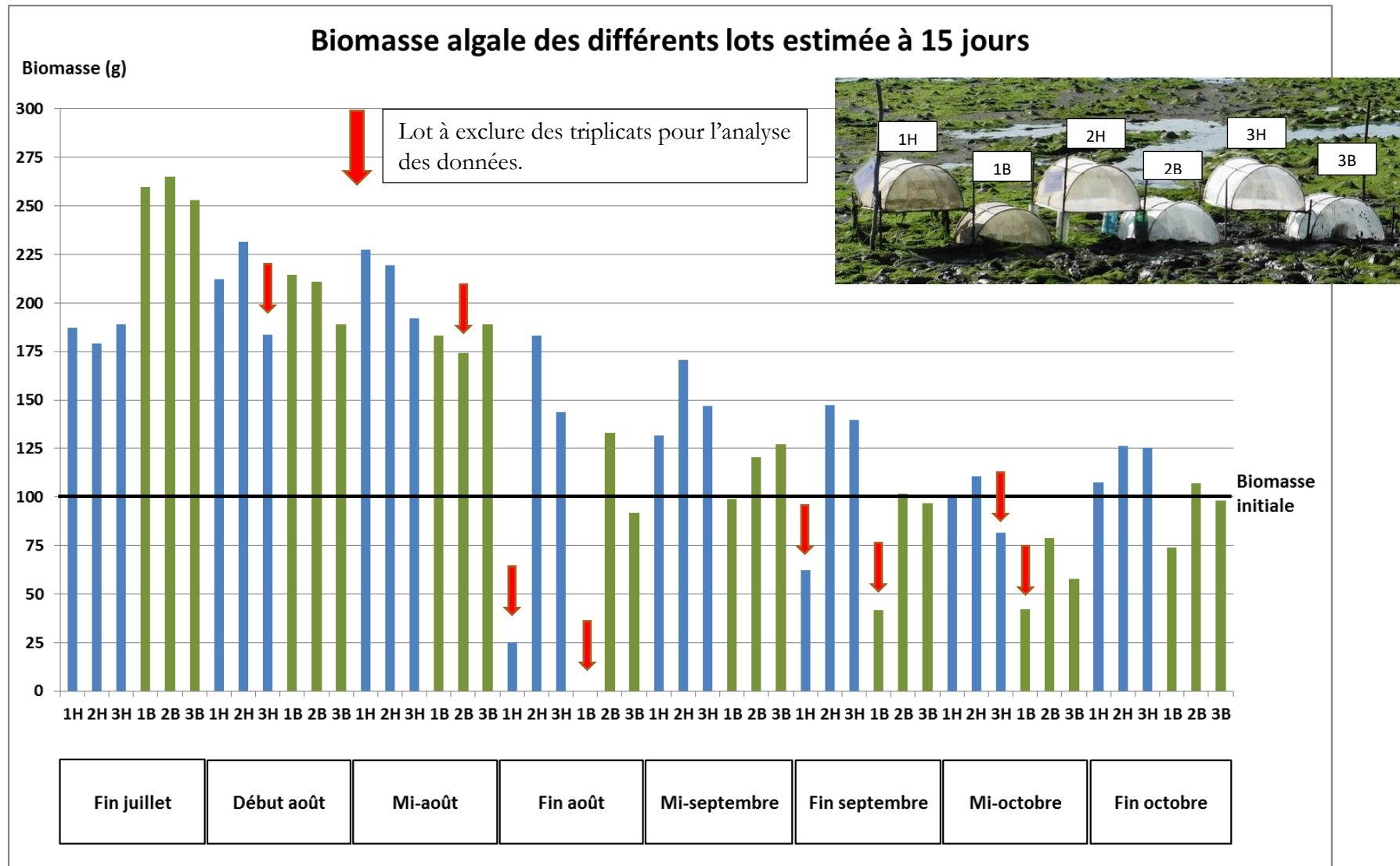


Figure 9 : Biomasse estimée des lots d'ulves obtenue après 15 jours d'expérience

Les résultats présentés dans la Figure 9, indiquent deux tendances générales en fonction de la saison :

- De fin juillet à mi-août, tous les lots d'ulves présentaient de la croissance et la biomasse obtenue après 15 jours d'expérience était parfois doublée, parfois même presque triplée, par rapport à la biomasse initiale.
- De fin août à fin octobre, tous les lots d'ulves présentaient une croissance plus faible voire une dégradation pour certains lots (1H et 1B).

L'évolution saisonnière des biomasses algales dans les cages semble cohérente avec l'évolution mensuelle des couvertures algales estimées par interprétation des photos aériennes de la vasière du Lédano (Figure 10) acquises dans la cadre des programmes CIMAV P4 et RCS Loire-Bretagne.

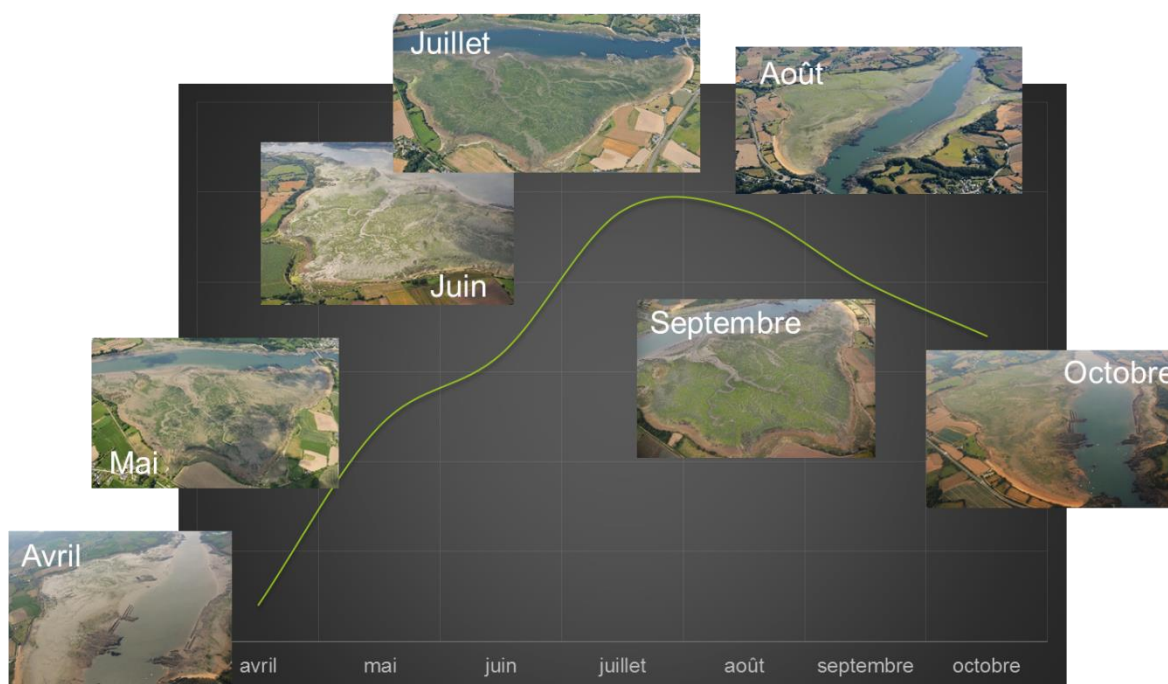


Figure 10 : Evolution mensuelle des couvertures algales sur la vasière du Lédano (estimation visuelle)

Même si ce signal saisonnier est retrouvé pour les deux modalités, les biomasses algales des lots H et B peuvent différer en fonction de la saison (Figure 9) :

- Fin juillet, les lots d'ulves présents dans les cages en contact avec le sédiment (lots B) ont eu une croissance plus importante que les lots d'ulves présents dans les cages en hauteur (lots H).
- Début août, les deux triplicats d'ulves ont eu une croissance comparable.
- A partir de mi-août jusqu'à fin octobre, les lots d'ulves présents dans les cages en hauteur ont eu une croissance plus importante que les lots d'ulves présents dans les cages en contact avec le sédiment.

Les teneurs internes en azote et phosphore moyennes de chaque triplicat d'algues peuvent permettre d'expliquer les tendances de résultats décrites ci-dessus, sauf si un évènement biaisant l'évolution de la biomasse algale s'est produit lors de l'expérience sur l'un des lots. Ainsi, tout lot présentant un écart de biomasse important avec la moyenne du triplicat a fait l'objet d'une analyse, notamment à partir des photos de terrain (Annexe 4). Dans le cas d'un constat de modification du dispositif expérimental pouvant avoir une influence sur la biomasse algale, le résultat a été exclu des analyses postérieures. Tous les lots potentiellement concernés par un résultat biaisé sont

indiqués par une flèche rouge dans la Figure 9 et les différentes causes suspectées sont détaillées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Liste avec justification des lots exclus de l'analyse des résultats

Cage	Date	Causes de perte de biomasse
3H	Début août	Elastique cassé
2B	Mi-août	Elastique cassé
1H	Fin août	Dégradation des algues et du milieu
1B	Fin août	Dégradation des algues et du milieu
1H	Fin septembre	Entrebâillement de l'ouverture de la cage
1B	Fin septembre	Elastique cassé
3H	Mi-octobre	Entrebâillement de l'ouverture de la cage
1B	Mi-octobre	Recouvrement partiel de la cage par des ulves du milieu extérieur

2.3.4 Quotas azotés et phosphorés des algues

a. Evolution mensuelle des quotas azotés et phosphorés des lots d'algues

L'évolution saisonnière des **quotas azotés** (Figure 11) a montré que :

- Les quotas azotés des algues, élevés en début de saison, diminuaient au cours de l'été avec des plus faibles valeurs à la mi-août et augmentaient en fin de saison jusqu'à atteindre des valeurs similaires au début de saison.
- Durant toute la saison, tous les lots d'algues présentaient des quotas azotés au-dessus du seuil du quota critique (Q1N), ce qui signifie que **durant toute l'expérience, l'azote ne semblait pas être un élément nutritif limitant pour la croissance des algues.**
- De juillet à mi-septembre, les quotas azotés des lots H et B ont dans l'ensemble suivi la même évolution que les quotas des algues prélevées dans le milieu. De plus, les lots B présentaient des quotas plus proches de ceux des algues du milieu que les ulves des lots H. Ces résultats sur cette période montrent que le dispositif expérimental n'a pas apporté de biais à l'expérience et que **les algues présentes dans les cages en contact avec le sédiment semblent avoir eu une évolution similaire à celles situées dans la vasière.**
- A partir de fin-septembre, les lots H et B ont évolué différemment du lot du milieu avec des contenus azotés supérieurs à ceux des algues du milieu. Cette différence avec les algues du milieu n'avait pas été observée en début de saison pour le lot B. Ces différences plus nettes en fin de saison avec les algues du milieu et ces valeurs de quotas plus élevées pour les lots H et B, indiquent que les algues présentes dans les cages étaient dans des conditions différentes du milieu et vraisemblablement moins favorables pour se développer. L'apparition du fouling sur les cages à cette période, induisant une limitation de la croissance, peut expliquer ces résultats (Annexe 3). Ainsi, pour la période de fin-septembre à fin octobre, le biais lié au dispositif expérimental a été pris en considération dans l'analyse des données.

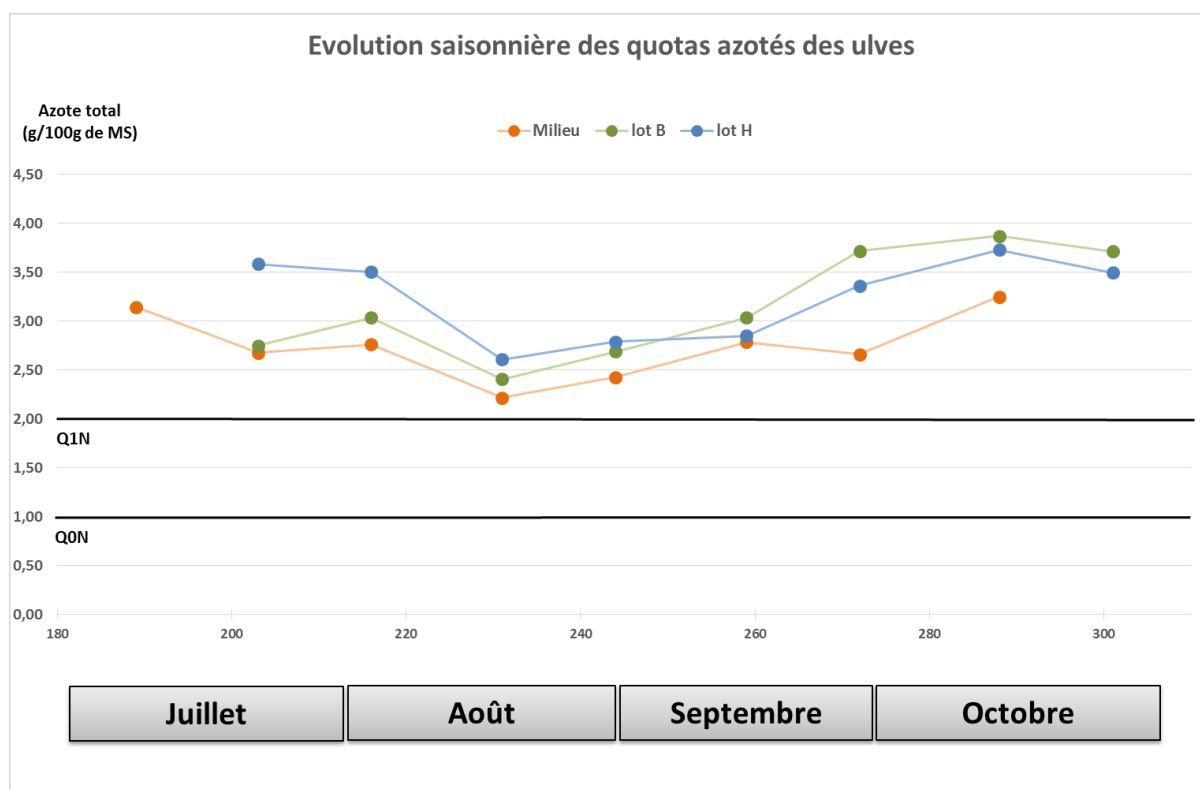


Figure 11 : Evolution saisonnière des quotas azotés des ulves du milieu et des lots H et B

L'évolution saisonnière des quotas phosphorés (Figure 12) a montré que :

- Les teneurs en phosphore de tous les lots d'algues étaient au-dessus du seuil du quota critique (Q1P) excepté fin juillet où les quotas des lots B ont été à la limite de ce seuil et les lots H en dessous. **Le phosphore a donc été ponctuellement limitant en juillet pour les cages situées en hauteur.**
- Les quotas phosphorés de tous les lots d'algues ont augmenté progressivement au cours de la saison.
- Les quotas phosphorés des algues des lots B étaient plus proches de ceux des algues du milieu excepté de fin septembre à fin octobre, les quotas des algues présentes dans les cages augmentant, quelle que soit la modalité considérée. Comme pour l'analyse des quotas azotés, l'apparition du fouling sur les cages à cette période a probablement causé cette différence, par limitation de la croissance des ulves.
- Les quotas phosphorés des lots B étaient globalement supérieurs à ceux des lots H au cours de la saison notamment à partir de mi-août, période à laquelle les lots B ont connu une croissance plus faible que les lots H (Figure 9). Du fait de cette croissance faible, les algues des lots B ont probablement moins utilisé leur stock interne en nutriment pour leur développement.

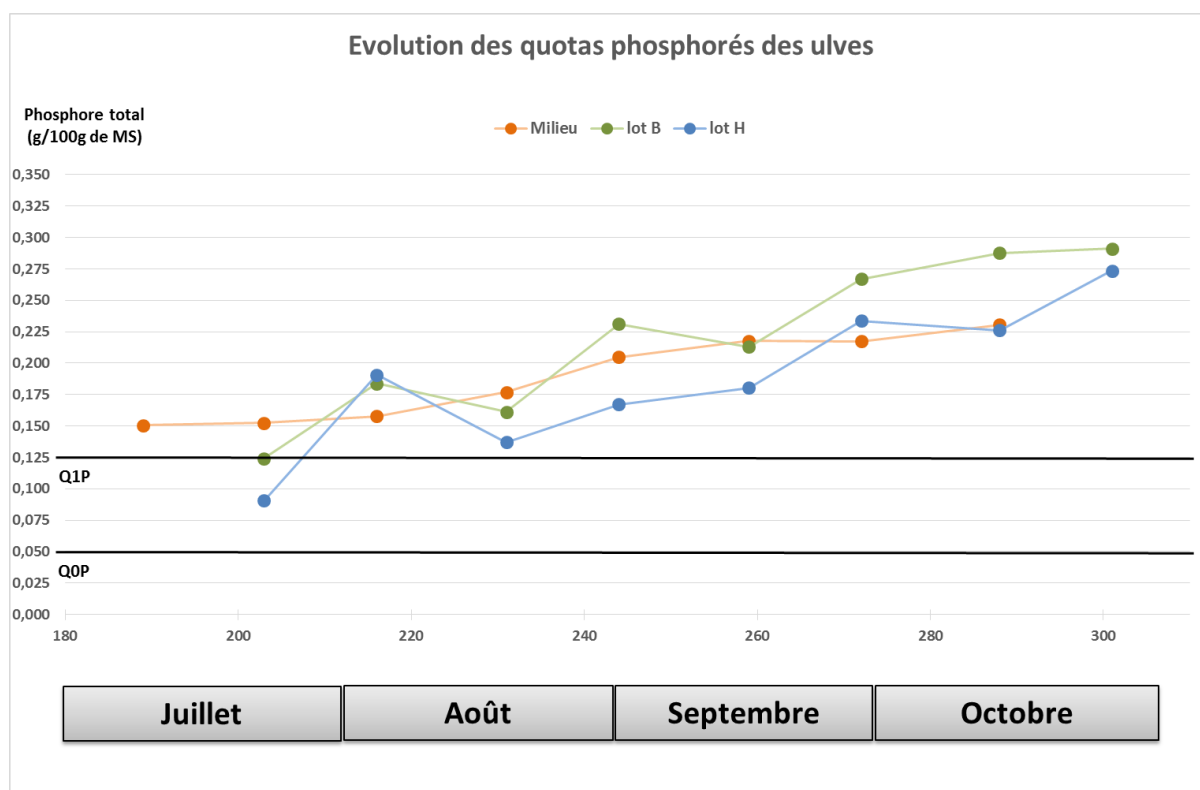


Figure 12 : Evolution saisonnière des quotas phosphorés des ulves du milieu et des lots H et B

L'analyse des biomasses et des évolutions des quotas azotés et phosphorés des lots d'algues a permis d'identifier 6 périodes pour lesquelles des interprétations différentes seront exposées. Des photos de chaque cage en vue extérieure et intérieure prises à chaque date de contrôle et en fin de campagne ont été utiles à l'interprétation des résultats. L'ensemble de ces photos est disponible en Annexe 4.

b. Analyse détaillée des quotas azotés et phosphorés des algues

A titre d'exemple, toutes les étapes de l'analyse des résultats de la campagne de fin juillet ont été détaillées ci-dessous. La démarche suivie étant la même pour les résultats des campagnes suivantes, seules les données compilées sont présentées ensuite. Les données brutes de chaque expérience sont toutefois disponibles en Annexe 5

➤ Campagne de fin juillet

L'analyse des résultats montrent que les contenus azotés, phosphorés et les biomasses sont comparables au sein de chaque triplicat (Figure 13 et Figure 14) ce qui permet de les moyenner pour en faciliter l'interprétation.

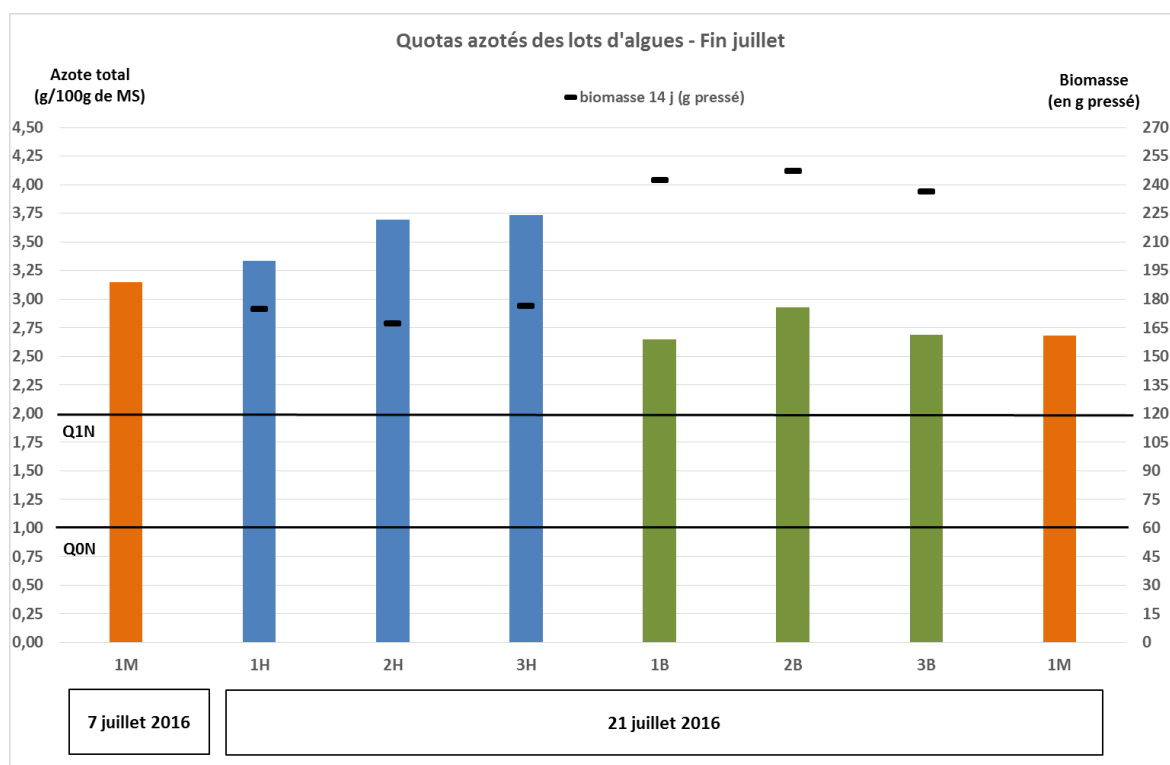


Figure 13 : Quotas azotés des lots d'algues pour la période de fin juillet

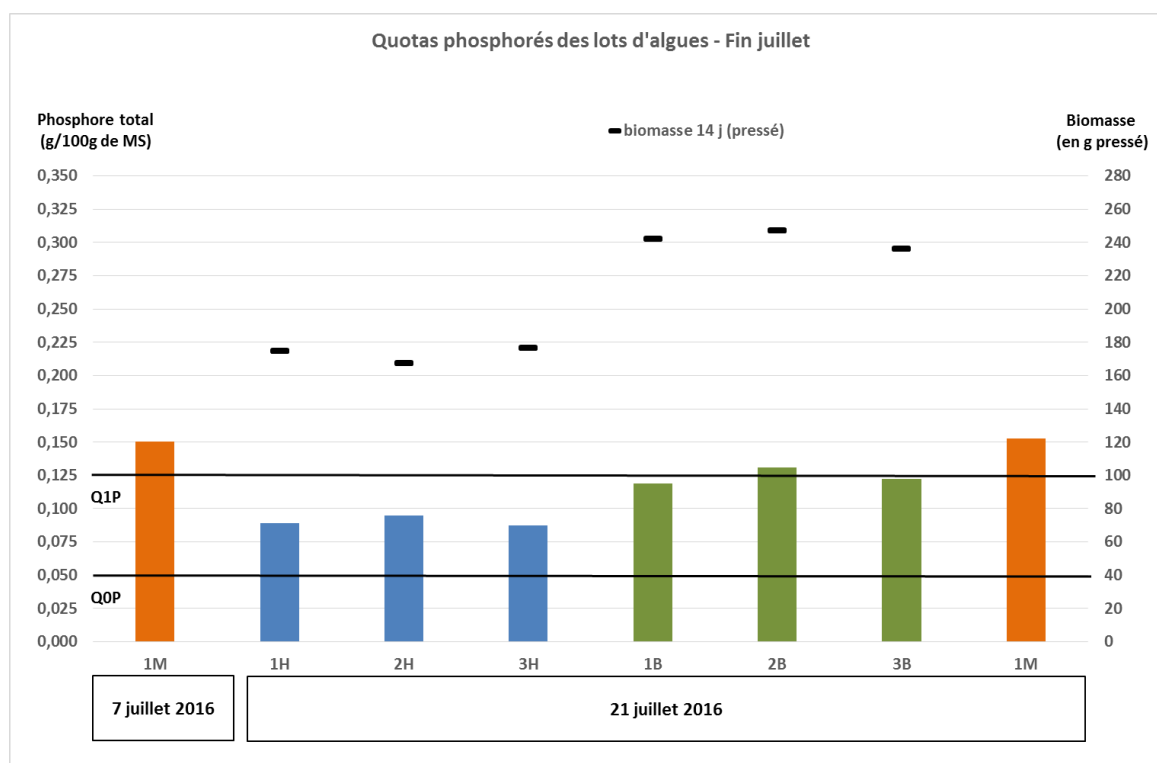


Figure 14 : Quotas phosphorés des lots d'algues pour la période de fin juillet

Les résultats suivants présentés Figure 15, sont issus de la moyenne des quotas et des biomasses de chaque triplicat d'ulves lors de la campagne de fin juillet. Les écarts types montrent bien une faible variabilité entre les lots, ce qui justifie le fait d'interpréter la moyenne des résultats.

A ces résultats, ont été ajoutées les quantités d'azote et de phosphore fixées par les algues. Le calcul de cette donnée permet de comparer les lots d'algues en tenant compte à la fois de leur contenu interne en nutriments et de leur croissance et d'appréhender les quantités en nutriment fixées par les ulves.

Pour la campagne de fin juillet, les quotas azotés des lots d'algues situés en hauteur (lot H), étaient plus importants que les quotas azotés des lots d'algues en contact avec le sédiment (lot B). Les lots H ont toutefois présenté une croissance plus faible et un blanchiment des algues en fin d'expérience (Annexe 4). En outre, l'analyse des quotas phosphorés montre que les algues du lot H étaient limitées par cet élément dont les teneurs étaient inférieures au quota critique. La croissance plus faible de ce lot peut donc s'expliquer par cette limitation par le phosphore et expliquer les teneurs internes en azote plus élevées.

L'analyse de la quantité de nutriments fixés par les algues montre qu'il n'y a pas de différence significative concernant l'azote mais que le phosphore est en quantité plus importante dans les algues en contact avec le sédiment. Il semble donc qu'à cette période de l'année, l'apport sédimentaire en phosphore soit un paramètre important pour la croissance des ulves sur vasière alors que la source d'azote sédimentaire ne semble pas prépondérante, certainement du fait de concentrations en nitrates suffisantes dans la masse d'eau.

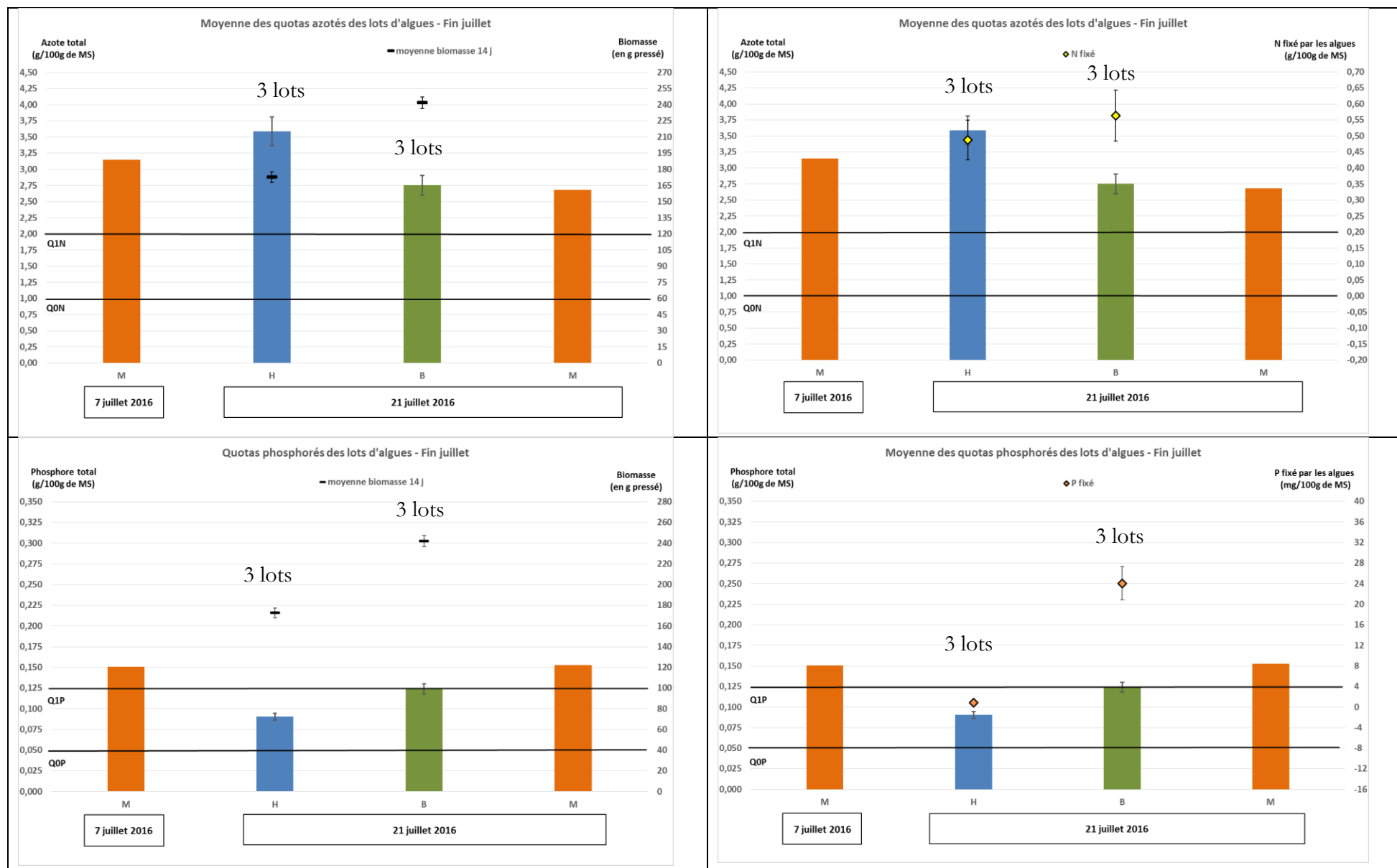


Figure 15 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de fin juillet.

➤ Campagne de début août

Pour la campagne de début août (Figure 16), les quotas azotés des lots H étaient supérieurs à ceux des lots B qui, étant en contact du sédiment, présentaient des teneurs plus proches des algues du milieu prélevées en début et fin de campagne.

Les deux modalités présentent des résultats comparables en termes de biomasses et de contenus interne en phosphore. La différence s'établit uniquement sur le contenu interne en azote, les algues du lot H présentant des teneurs supérieures à celles du lot B. L'analyse de la fixation d'azote par les algues des deux lots (croissance et quotas) indique que les algues du lot H ont fixé davantage d'azote que le lot B.

Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

1/ les algues du lot H, en hauteur et donc en pleine eau, pourraient avoir un accès facilité à l'azote de la colonne d'eau.

2/ les algues du lot B, en contact avec le sédiment, peuvent faire l'objet d'une pression de broutage. Le gain de biomasse peut donc être sous-estimé (croissance minorée par le broutage) ce qui induit une sous-estimation des quantités de nutriments fixés par les algues en contact avec le sédiment.

Contrairement à la précédente expérimentation, l'apport des nutriments, en particulier du phosphore, par le sédiment, n'est pas mis en évidence ici, compte tenu des quotas internes en azote plus élevés pour le lot H (sans contact avec le sédiment) et des quotas internes en phosphore comparables pour les deux modalités. Cela n'indique pas pour autant que le sédiment ne contribue pas à ces apports. Il est en effet possible que l'activité de reminéralisation soit telle qu'elle est suffisante pour enrichir, en nutriment, toute la lame d'eau recouvrant les cages des deux modalités à marée haute.

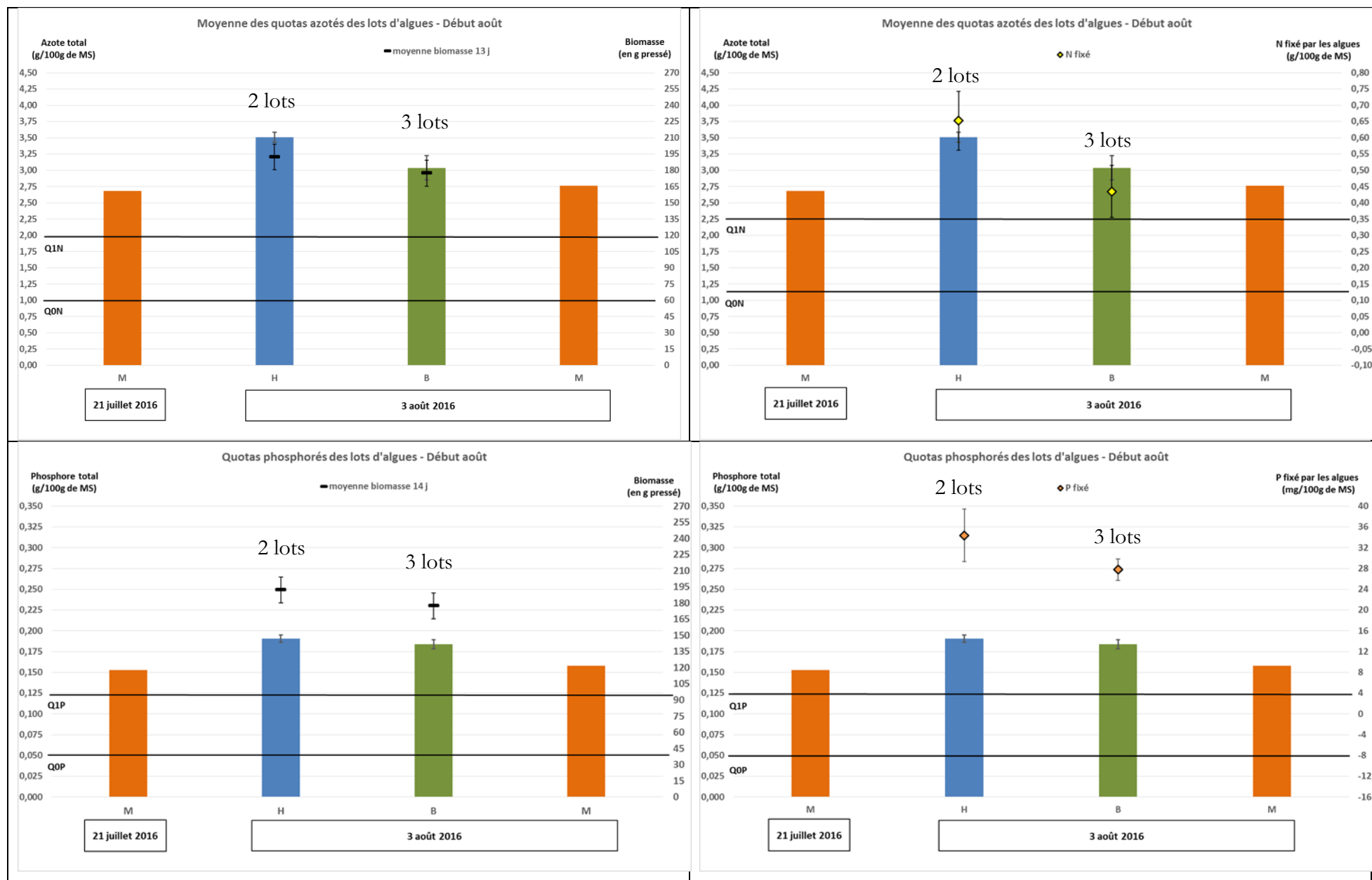


Figure 16: Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de début août.

➤ Campagne de mi-août

Pour la campagne de mi-août (Figure 17), les quotas azotés des lots H et B variant autour de 2,5 %, ont diminué par rapport à la campagne précédente de début août (valeurs de quotas entre 3 et 3.5 %). Les algues du milieu ont suivi la même tendance. Ces quotas sont restés supérieurs au seuil critique indiquant l'absence de limitation de la croissance par l'azote. Les quotas azotés et la croissance des lots H étaient légèrement supérieurs aux lots B.

Comme pour l'azote, les quotas phosphorés des lots H et B variant autour de 0.15 % à cette période, ont diminué par rapport à la campagne précédente de début août (valeurs de quotas autour de 0.175 %). Les algues du milieu ont suivi la tendance inverse, les quotas phosphorés augmentant entre le début et la fin de l'expérience.

La quantité d'azote fixée par les algues a été supérieure pour le lot H alors qu'aucune différence significative n'a été mesurée concernant la quantité de phosphore fixée. Ce résultat est le même que celui obtenu avec l'expérience de début août.

Les deux hypothèses explicatives évoquées précédemment peuvent être à nouveau proposées à savoir :

1/les algues du lot H, en hauteur et donc en pleine eau, pourraient avoir un accès facilité à l'azote de la colonne d'eau.

2/les algues du lot B, en contact avec le sédiment, peuvent faire l'objet d'une pression de broutage. Le gain de biomasse peut donc être sous-estimé ce qui induit une sous-estimation des quantités de nutriments fixés par les algues en contact avec le sédiment.

Comme pour les résultats de début août, il semble que le signal de l'apport sédimentaire en nutriment ne soit pas facilement détectable en cette période.

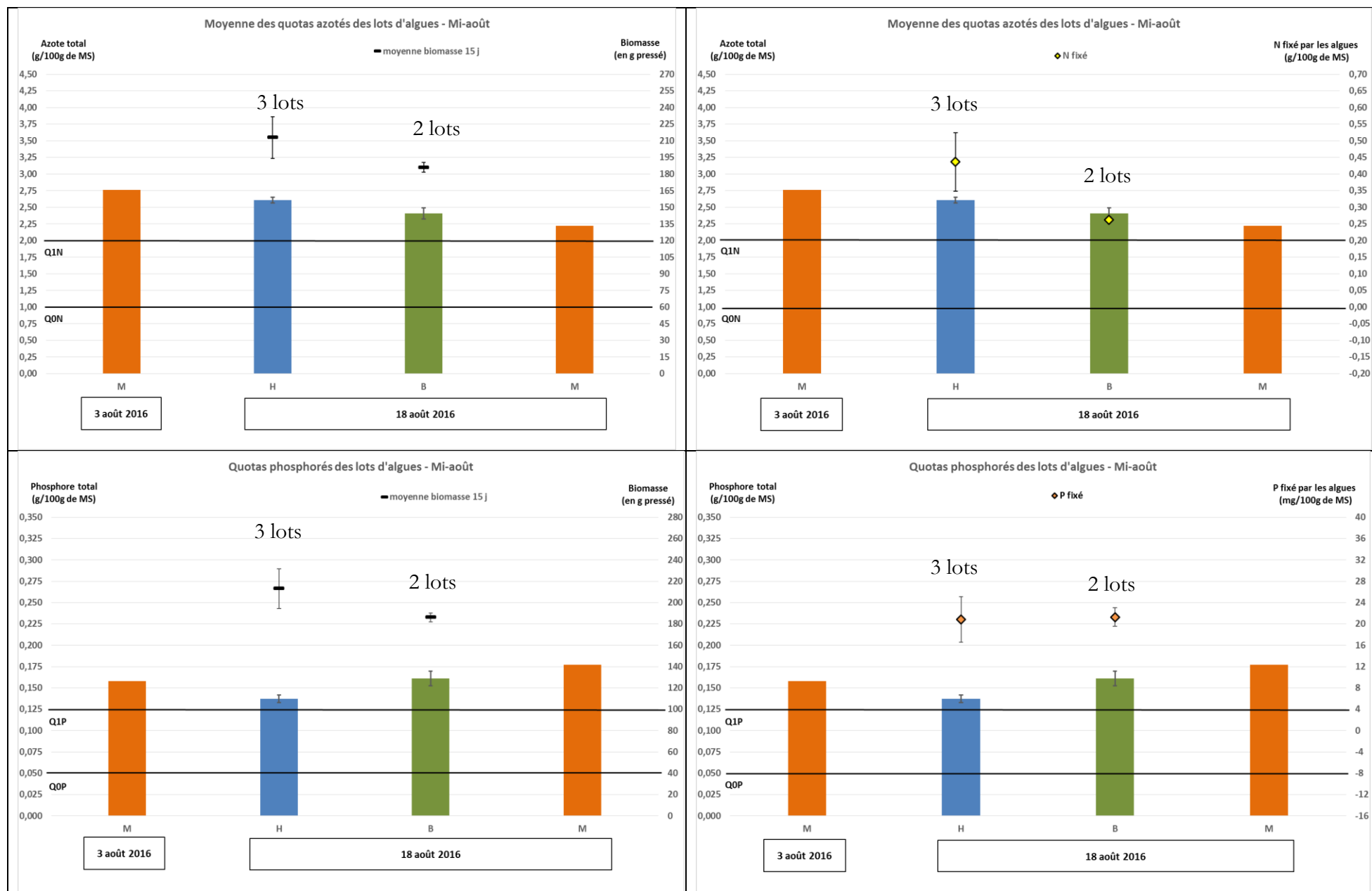


Figure 17 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de mi-août.

➤ Campagne de fin août

Lors de cette campagne, un phénomène de dégradation était perceptible sur le terrain où des zones de putréfaction (plaques de sédiment + algues blanchies) et une forte odeur de décomposition ont été repérées (Figure 8). Dans les cages, la croissance a été nulle pour le lot B (en accord avec le phénomène de dégradation observé sur le terrain), et faible pour le lot H (Figure 18).

Les quotas azotés ont été comparables entre les deux modalités. Du fait d'une croissance supérieure du lot H, la quantité d'azote fixée par ces algues est supérieure à celle du lot B.

Les quotas phosphorés sont, au contraire, plus élevés pour le lot B. Toutefois, la quantité calculées de phosphore fixée par les ulves est la même quelle que soit la modalité considérée.

Comme vu précédemment, la différence entre les deux modalités apparaît sur l'azote qui semble être davantage assimilée par les algues qui ne sont pas en contact avec le sédiment. Compte tenu de l'important phénomène de dégradation de la matière algale observée sur le terrain, il est probable que les algues au contact du sédiment aient subi le même phénomène, expliquant l'absence de croissance. Par ailleurs, la reminéralisation de la matière organique a pu induire le relargage d'importantes concentrations en nutriments, ce qui pourrait expliquer que les algues n'étant pas au contact du sédiment aient tout de même pu profiter d'un environnement nutritionnel favorable.

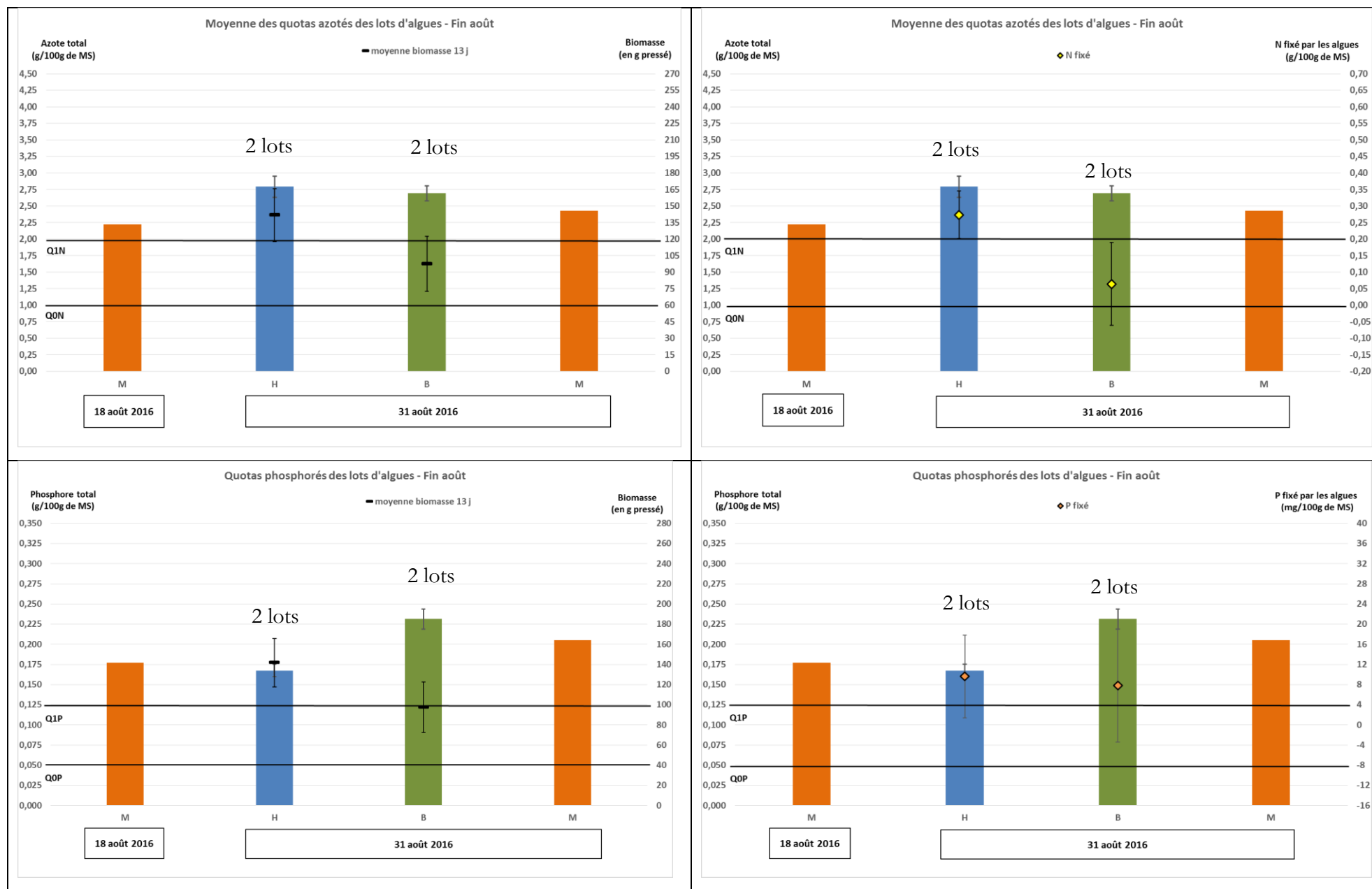


Figure 18 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de fin août.

➤ Campagne de mi-septembre

Pour la campagne de mi-septembre (Figure 19), les quotas azotés et phosphorés du lot B étaient supérieurs à ceux du lot H. Les quantités d'azote et de phosphore fixées par les algues étaient toutefois comparables entre les modalités. Ni l'azote, ni le phosphore n'ont limité la croissance des algues en cette période, quelle que soit la modalité considérée.

La biomasse des lots H était légèrement supérieure à celle des lots B. La croissance de ces deux lots est toutefois restée faible avec en moyenne 20 g de biomasse obtenue au bout de 15 jours pour le lot B et 50 g pour le lot H.

Le contact avec le sédiment semble être défavorable aux algues au regard de leur croissance. Une pression de broutage importante pourrait expliquer cette croissance faible apparente.

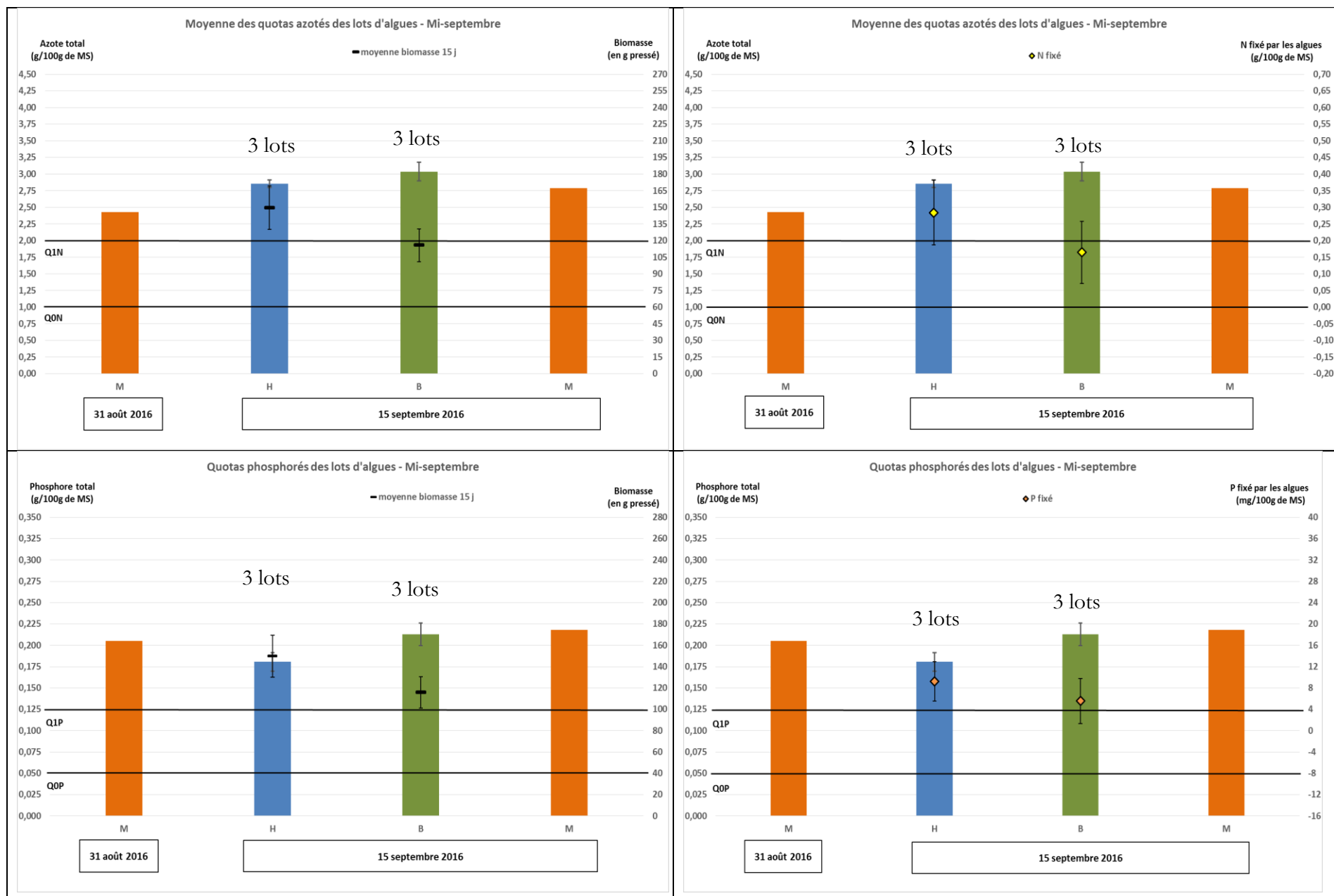


Figure 19: Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de mi-septembre.

➤ Campagnes de fin septembre à fin octobre

De fin septembre à fin octobre (Figure 20), les biomasses des lots H ont toujours été supérieures à celles des lots B. La croissance est toutefois restée faible, ce qui est probablement dû au fouling important sur toutes les cages, réduisant la quantité de lumière disponible pour les algues (Annexe 3). Les quotas montrent que les nutriments n'étaient pas limitant pour la croissance.

La biomasse plus importante des algues des lots H pourrait être due soit à l'absence de broutage (ou moindre broutage) dans cette modalité, soit au fait que sur cette période, la plupart des algues des lots B était plus ou moins enfouie avec la vase entraînant la perte possible d'une fraction de l'échantillon lors du ramassage en fin de campagne (Annexe 4)

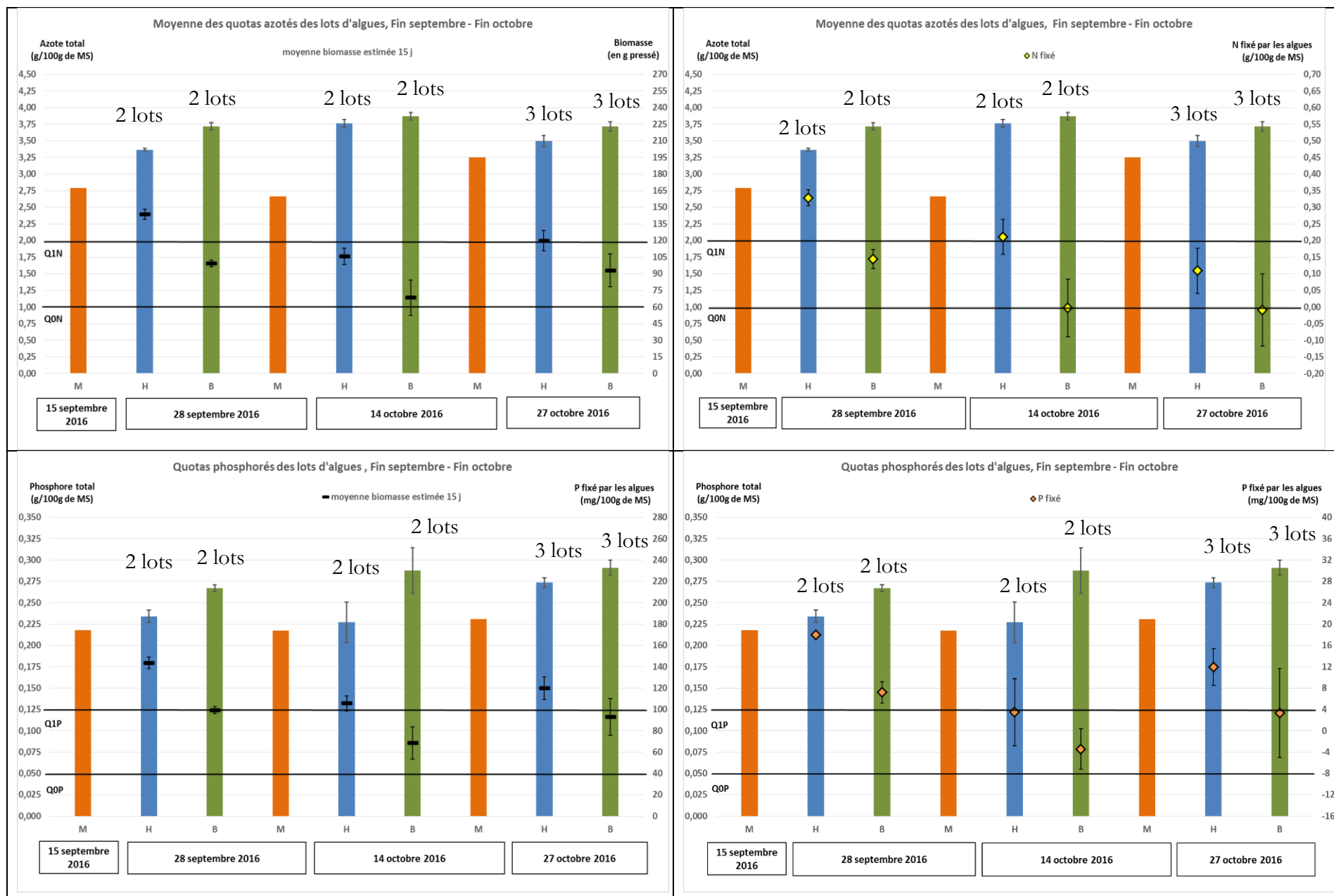


Figure 20 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues pour la période de fin septembre à fin octobre.

2.4 Discussion

L'analyse de l'évolution saisonnière des quotas de chaque triplicat et des algues du milieu a permis de mettre en évidence un profil type de variation saisonnière des quotas, observé sur la vasière du Lédano :

- **Pour l'azote**, les quotas étaient tous élevés au mois de juillet (plus de 3 % de la M.S.). Les quotas azotés ont ensuite diminué jusqu'à atteindre un minimum à la mi-août (autour de 2,5 % de la matière sèche (M.S.) pour tous les lots d'algues) : Cette diminution généralisée des quotas internes est normale et attendue en période estivale car elle correspond à l'augmentation naturelle des besoins de la croissance des algues (photopériode, température) dans un contexte de raréfaction de la ressource nutritive (baisse saisonnière des flux d'azote provenant des rivières). En effet, les stocks intracellulaires en nitrate sont utilisés par les algues en période d'appauvrissement d'azote (Barr 2007). A partir de la fin août, tous les quotas azotés ont augmenté rapidement pour atteindre à la mi-octobre, des valeurs proches de celles observées en début d'expérimentation (autour de 3,5 % de la M.S.), en relation essentiellement avec la diminution normale des besoins en sels nutritifs des algues (baisse progressive de la croissance en relation avec celles de la lumière et de la température).
- **Pour le phosphore**, une tendance à l'évolution croissante des quotas a été observée. Le phosphore utilisé par les ulves serait majoritairement d'origine sédimentaire et la progression des températures estivales va d'une manière générale favoriser son flux de relargage. En effet, dans les régions tempérées, les flux de phosphates entre le sédiment et la colonne d'eau augmentent avec la température (Asmus, Sprung et Asmus 2000). L'augmentation des quotas phosphorés des ulves de début août jusqu'en fin de saison estivale (de 0,15 % à 0,23 % de la M.S. pour les algues du milieu et de 0,18 % à 0,29 % pour les lots B) est donc expliquée par le fait que les ulves absorbent le phosphore issu de la reminéralisation sédimentaire tout en ne bénéficiant plus des conditions optimales de croissance (lumière et température), notamment en fin de saison estivale. Dans la présente étude, les conditions de lumière dans les cages ont été particulièrement défavorables du fait d'un important biofouling sur les cages.

En comparant l'évolution des quotas azotés et phosphorés des lots d'algues présentes dans les cages avec l'évolution des quotas des algues du milieu, deux périodes ont été distinguées :

- **De juillet à mi-septembre**, les quotas azotés et phosphorés des algues présentes dans les cages et notamment celles en contact avec le sédiment ont suivi les mêmes tendances que les algues du milieu. **Le dispositif semble donc ne pas introduire de biais dans le développement des algues sur cette période.**
- **A partir de fin septembre et jusqu'à fin octobre**, l'évolution des quotas azotés et phosphorés des algues présentes dans les cages était très différente par rapport aux algues du milieu. **L'observation du fouling sur les cages à partir de cette période semblerait être la cause de ces divergences et entraînerait par conséquent un biais dans les résultats.**

Le principe d'utiliser les algues comme indicateur des flux de nutriments repose sur la relation entre les quotas azotés et phosphorés des algues et leur croissance à une période donnée. Les graphiques effectués par campagne mettant en évidence ces deux paramètres pour chaque lot, ont montré que, mis à part quelques lots écartés (perte de biomasse due à un problème lié à la cage), très peu de variabilité existait entre les lots d'algues de chaque modalité. Comme aucune différence évidente n'a été relevée entre les cages, il était donc justifié de réaliser des moyennes sur les résultats de biomasse et de quotas pour chaque modalité.

Suite à l'analyse saisonnière des biomasses et des quotas, six périodes ont été identifiées : campagnes de juillet, début août, mi-août, fin août, mi-septembre et période de fin septembre à fin octobre. L'analyse de ces périodes a permis de mettre en évidence les interprétations suivantes :

- **L'azote n'était pas un élément limitant pour la croissance des algues qu'elles soient ou non au contact du sédiment.** Par ailleurs, les algues en hauteur fixaient généralement plus d'azote que celles au contact du sédiment. Cela pourrait être dû au fait qu'en pleine eau, les algues peuvent assimiler plus efficacement les nutriments, leur surface de contact avec le milieu environnant pouvant être plus importante. Ce résultat est toutefois à nuancer avec les biais possibles liés à la potentielle perte de biomasse par broutage dans les cages au contact du sédiment, pression de broutage à laquelle échappent, au moins partiellement, les algues dans les cages en hauteur.
- **Le phosphore a été ponctuellement limitant lors de la campagne de juillet** pour la croissance des algues présentes dans les cages en hauteur.
Cette différence semble indiquer que le sédiment joue un rôle important dans la fourniture de cet élément. Toutefois, ce résultat ne se retrouve pas dans la suite des expériences. Il est possible que les biomasses algales se dégradant au cours de la saison, une forte activité de reminéralisation ait eu lieu, induisant l'enrichissement de l'ensemble de la colonne d'eau en phosphore. La température de l'eau plus élevée en cours de saison et l'anoxie créée par la présence plus massives d'algues vertes peut aussi expliquer un relargage augmenté au cours de la saison. La proximité du sédiment n'était donc plus une condition nécessaire pour l'accès à cette ressource.

Rappelons que la croissance des lots B pourrait avoir été sous-estimée, notamment à partir de la campagne de mi-août. L'effet du broutage des algues par les hydrobies, l'effet d'une dégradation générale du milieu et l'effet de l'enfouissement partiel des algues à la vase pourraient être les causes possibles d'une perte de biomasse qui, par conséquent, aurait induit une sous-estimation des quantités de nutriments fixées par les algues en contact du sédiment.

Afin d'obtenir des résultats plus clairs de cette expérience réalisée *in situ*, des améliorations expérimentales pourraient être apportées :

- Réaliser des campagnes plus courtes d'une semaine au lieu de deux semaines pour limiter l'effet du broutage et du fouling. L'année 2016 a permis de montrer que les taux de croissance étaient suffisants pour que la diminution de la durée des expériences n'engendre pas de problème d'incertitude sur les gains de biomasses mesurés.
- Les cages devraient être régulièrement retirées du terrain, d'une part pour être nettoyées et d'autre part pour permettre au sédiment du site d'étude de retrouver son état initial non modifié par la présence des cages.
- Equiper le fond des cages en contact avec le sédiment d'une toile à mailage fin pour, d'une part lutter contre le passage des hydrobies et d'autre part pour éviter le mélange des algues avec la vase et faciliter le prélèvement des algues à la fin de chaque campagne.
- Améliorer le système de fermeture des cages de manière à éviter un entrebâillement de la fenêtre et ainsi limiter la perte directe de biomasse par cette ouverture et surtout indirecte liée à l'entrée possible des brouteurs.
- Surélever davantage les cages au-dessus du sédiment pour mettre en évidence l'effet sédiment de façon plus prononcée.
- Commencer les expérimentations plus tôt dans la saison pour maximiser les processus de synthèse algale et limiter la période de dégradation des algues et de reminéralisation de la matière organique.

3 Expériences en laboratoire

3.1 Matériel et méthodes

Afin d'estimer la contribution du sédiment dans la fourniture de nutriments, une expérience a été conduite au CEVA en complément de celle réalisée *in situ*. Ces expérimentations en laboratoire permettent de contrôler certaines variables (température, lumière...) et de mieux cerner le processus biogéochimique recherché.

Pour cette expérience, le sédiment et les algues utilisés ont été prélevés à proximité de la station d'expérimentation de la vasière du Lédano, l'objectif étant de mieux appréhender les résultats obtenus *in situ*.

3.1.1 Le dispositif expérimental

Le dispositif expérimental (Figure 21) est composé de 9 bacs préparés selon les modalités suivantes :

- A gauche : 3 bacs contenant de l'eau de mer, du sédiment et des algues avec une agitation mécanique aléatoire (5 allers-retours à l'aide d'une planchette : 2 fois pour la période de 5 jours, 3 fois pour la période de 10 jours et 6 fois pour la période des 15 jours)
- Au milieu : 3 bacs contenant de l'eau de mer, du sédiment et des algues sans agitation mécanique
- A droite : 3 bacs contenant de l'eau de mer et des algues mais sans sédiment.

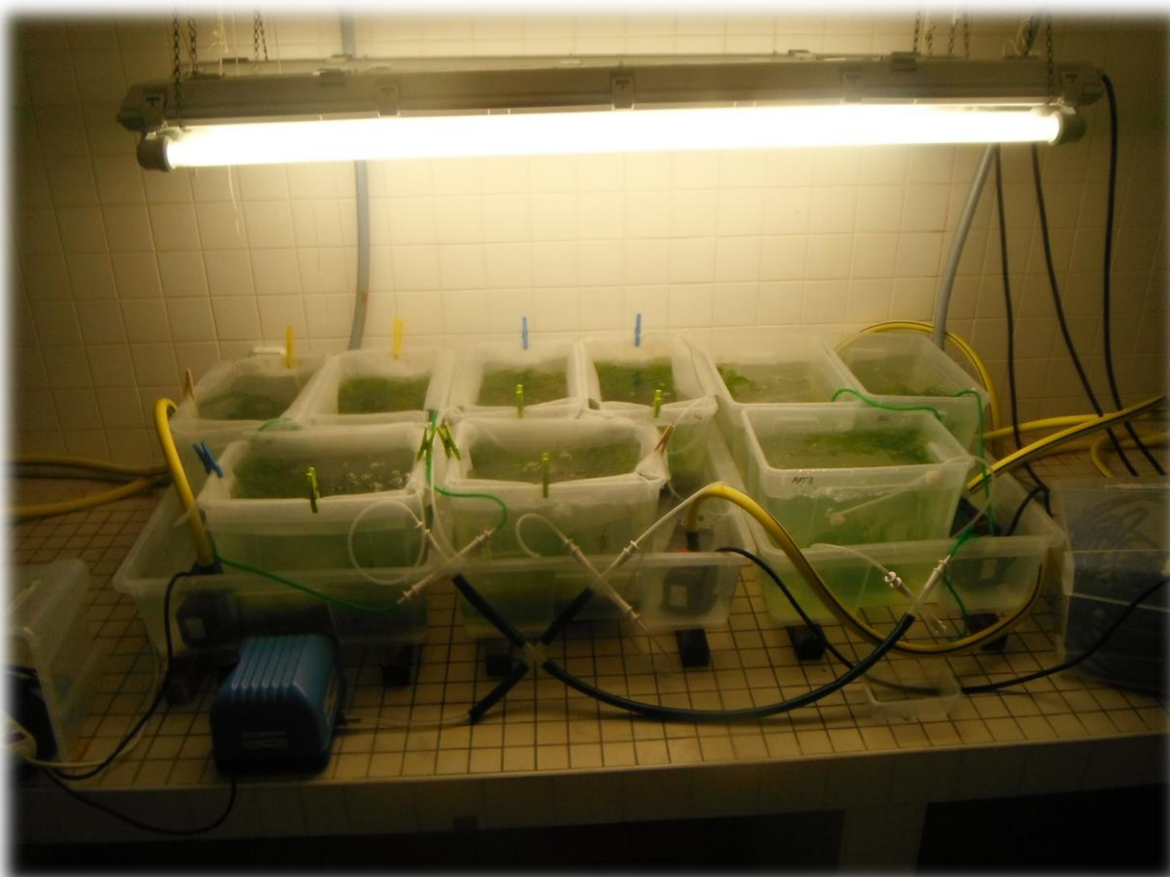


Figure 21 : Photo du dispositif expérimental réalisé au CEVA

Les 6 bacs de gauche contiennent une couche de vase d'une épaisseur d'environ 5 cm.

Un bullage minimum est prévu dans chaque bac de manière à maintenir les algues en suspension et permettre les échanges gazeux.

Pour éviter le broutage des algues par les hydrobiees présentes dans la vase, une barrière en toile à mailles fines (1 mm de côté) a été fabriquée et installée entre la couche de vase et les algues.

Chaque triplicat est placé dans un grand bac contenant de l'eau dont la température est maintenue à 19°C grâce à un groupe froid.

Trois néons (Philips Master TLD 58W/840 suspendus sont reliés à un programmeur permettant d'assurer un cycle jour/nuit, la phase lumineuse ayant lieu de 6h00 à 22h00. Ces néons assure une intensité lumineuse de l'ordre de 3000 lux.

3.1.2 Méthodologie

a. Mise au point méthodologique

Le principe de cette expérimentation est proche de l'expérience *in situ* dans la mesure où les modalités (avec ou sans sédiment) sont aussi testées en utilisant les ulves comme intégrateur des flux de nutriments. Cette expérimentation au laboratoire permet d'identifier plus précisément l'importance de la fourniture sédimentaire en nutriments en contrôlant certains paramètres (température, lumière, oxygène, agitation, enrichissement de la colonne d'eau en nutriments...) qui dans le milieu naturel sont plus variables.

De manière à évaluer le dispositif expérimental et la méthodologie avant de commencer l'expérience, plusieurs tests préliminaires ont été réalisés au laboratoire :

- **Test 1** : bac 1 avec 8 cm de vase, 50 g d'ulves pressées, 6 l d'eau de mer non filtrée et du bullage ; bac 2 sans sédiment, 50 g d'ulves pressées, 12 l d'eau de mer non filtrée et du bullage.
- **Test 2** : bac 1 avec 5 cm de vase, 9 g d'ulves pressées, 9 l d'eau de mer non filtrée et du bullage ; bac 2 sans sédiment, 10 g d'ulves, 10 l d'eau et du bullage.
- **Test 3** : bac 1 et 2 avec 5 cm de vase et bac 3 sans sédiment. Dans les bacs 1 et 2 sont introduits 16 g d'ulves pour 12 l d'eau de mer non filtrée et dans le bac 3, 16 g d'ulves pour 16 l d'eau de mer non filtrée. Un bullage est appliqué en continu.
- **Test 4** : Renouvellement du test 3 mais avec l'ajout d'une toile à mailles fines dans les bacs 1 et 2.

Cette phase préliminaire s'est déroulée du 13 juillet au 25 août 2016.

b. Protocole en conditions contrôlées

Ce dispositif expérimental a été utilisé pour trois expériences d'une durée de 5, 10 et 15 jours. Le sédiment, prélevé près du site d'étude *in situ*, est conservé dans les 6 bacs pendant les 30 jours d'expérience. Un prélèvement de vase a été effectué de manière à caractériser le sédiment en début d'expérimentation (granulométrie, teneur en azote et phosphore, matière organique). L'échantillonnage a été réalisé sur les 5 premiers cm du sédiment de manière à analyser la même épaisseur de sédiment que celle utilisée dans l'expérimentation. Dans le programme DIETE d'Ifremer

de 2016, cette épaisseur était également choisie dans leur méthode d'échantillonnage (comm. pers. P. Souchu). Des prélèvements de vase contenue dans les 6 bacs en fin d'expérience ont été réalisés pour caractériser l'évolution du sédiment.

Dans les 3 bacs à gauche de la Figure 21, une agitation mécanique à l'aide d'une planchette (5 allers-retours) a été réalisée aléatoirement pour chacune des expériences de manière à remettre en suspension les particules de vase (simulation d'effet d'épisode d'agitation du milieu par des coups de vent, du ressac lors de l'arrivée de la marée, ..).

Les algues, prélevées près du site d'étude *in situ*, ont été nettoyées, pressées à la main et pesées afin d'obtenir en début de chaque expérience, 16 g d'ulves en poids frais dans chaque bac. La densité d'1 g d'algues par litre d'eau a été choisie pour permettre une croissance optimale des algues. Toutefois, de manière à obtenir le même niveau d'eau de mer dans tous les bacs, les bacs avec du sédiment ne contenaient que 12 l d'eau de mer au lieu de 16 l comme pour les bacs sans sédiment. Des échantillons d'algues ont été prélevés au début des trois séries d'expérience pour l'analyse des teneurs en azote et phosphore à T0. Au bout de 5, 10 et 15 jours d'expérience, l'intégralité des algues a été prélevée dans chaque bac pour la mesure des biomasses et des contenus internes en azote et en phosphore.

Des prélèvements d'eau (pour le dosage des nitrates, de l'ammonium et des orthophosphates dissous) ont été effectués en début d'expérience et à la fin de chaque série d'expérience de 5, 10 et 15 jours. Pour la période d'expérience de 5 jours et de 10 jours, de l'eau mer non filtrée a été utilisée. Pour éviter lors de la dernière série d'expérience de 15 jours, le développement de phytoplancton qui pourrait biaiser les résultats, de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm a été utilisée. Afin d'identifier un éventuel flux de diffusion passive des nutriments du sédiment vers la colonne d'eau, l'expérience de 15 jours n'a débuté qu'au bout de 6 jours et les prélèvements d'eau ont été réalisés juste avant l'introduction des algues dans les bacs. Tous ces prélèvements d'eau ont été filtrés à 0,22 µm avant analyse de manière à ne doser que les nutriments dissous.

L'ensemble des prélèvements destinés aux analyses est résumé dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Résumé du nombre d'échantillons et de leur nature pour les expériences en laboratoire

	Expérience de 5 jours		Expérience de 10 jours		Expérience de 15 jours		
Type de prélèvement	T0	T5	T0*¹	T10	T0*²	T15	Nb d'échantillons analysés
Prélèvement sédiment pour analyse	9*					6	15
Prélèvement algues pour analyse	1	9	1	9	1	9	30
Prélèvement eau pour analyse	3	9	3	9	3	9	46

* : analyse pour seulement pour un échantillon de sédiment, la granulométrie a été effectuée par un laboratoire extérieur en plus des teneurs en azote et phosphore et en matière organique.

*¹ : Avant de relancer l'expérience pour 10 jours, de l'eau de mer non filtrée a été rajoutée pour compléter le volume des bacs à 16 l. Les prélèvements d'eau de mer pour l'analyse ont été faits avant cet ajout.

*² : Avant de relancer l'expérience pour 15 jours, l'eau de mer contenue dans les 6 bacs est pompée et remplacée par de l'eau de mer filtrée.

Tous ces échantillons ont été préparés pour être envoyés à un laboratoire extérieur agréé. Un protocole plus détaillé (Annexe 2) a été rédigé pour respecter les consignes de prélèvement et de préparation des échantillons à analyser.

3.2 Résultats

3.2.1 Phase de tests préliminaires

Tous les tests préliminaires ont été réalisés avec les mêmes types de bacs en plastiques utilisés pour l'expérience et avec le même matériel biologique (ulves et vase) provenant de la vasière du Lédano.

- **Test 1 :** bac 1 avec 8 cm de vase, 50 g d'ulves pressées, 6 l d'eau de mer non filtrée et du bullage ; bac 2 sans sédiment, 50 g d'ulves pressées, 12 l d'eau de mer non filtrée et du bullage.

Au bout de 5 jours, les ulves dans le bac 1 avaient blanchi tandis que dans le bac 2, les ulves étaient visuellement en bon état. Un taux d'oxygène de 55 % et un pH de 7,89 relevés dans le bac 1, indiquent en effet des conditions de dégradation des algues (activité bactérienne réduisant le taux d'oxygène). Ce même constat a été observé par Gao et al. (2013) lors d'expériences réalisées sur *Chaetomorpha* sp, la dégradation de cette algue entraînant une augmentation de CO₂, responsable de la baisse du pH. Dans le bac 2, les algues étaient dans de bonnes conditions de croissance avec la mesure d'un taux d'oxygène de 90 % et un pH de 9,44. Ces observations ont permis d'effectuer les modifications suivantes avant de renouveler ce test :

- Réduire l'épaisseur de la vase de 8 cm à 5 cm.
- Diminuer la quantité d'algues en se basant sur une densité d'1 g d'ulves par litre d'eau de mer
- **Test 2 :** bac 1 avec 5 cm de vase, 9 g d'ulves pressées, 9 l d'eau de mer non filtrée et du bullage ; bac 2 sans sédiment, 10 g d'ulves, 10 l d'eau et du bullage.

Au bout de 6 jours, les mesures d'oxygène dans l'eau des bacs ont montré des résultats acceptables de l'ordre de 77 % pour le bac 1 et de 80 % dans le bac 2. Trois jours après, la biomasse des ulves présentes dans les bacs a été mesurée indiquant une croissance plus importante pour le bac 1 avec une biomasse atteinte de 14,7 g (0, 6g/jour) contre 11,8 g de biomasse atteinte pour le bac 2 (0,2 g/jour). Les résultats du deuxième test ont montré qu'une épaisseur de vase à 5 cm et qu'une densité d'1 g d'ulves par litre d'eau de mer en gardant la même puissance de bullage étaient les conditions d'expérimentation les plus satisfaisantes.

Pour le test suivant, afin de se mettre dans des conditions expérimentales proches de celles envisagées, les 3 bacs ont été disposés dans des grands bacs d'eau dont la température était maintenue à 19°C et un cycle jour/nuit était imposé (16 h de lumière et 8 h d'obscurité).

- **Test 3 :** bac 1 et 2 avec 5 cm de vase et bac 3 sans sédiment. Dans les bacs 1 et 2 sont introduits 16 g d'ulves pour 12 l d'eau de mer non filtrée et dans le bac 3, 16 g d'ulves pour 16 l d'eau de mer non filtrée. Un bullage est appliqué en continu.

Après 5 jours, de manière générale, aucune croissance voire de la dégradation a été relevée dans le bac 1 (biomasse finale : 10 g), le bac 2 (16 g) et le bac 3 (15,3 g). Ces résultats peuvent s'expliquer en partie par le fait que de nombreuses hydrobies aient été observées dans les bacs contenant de la vase et notamment dans le bac 1 et que les algues du bac 3 sans sédiment avaient blanchies à hauteur de 20 %.

Pour lutter contre le broutage des algues par les hydrobie, une toile à mailles fines a été ajoutée dans les bacs contenant du sédiment afin de créer une barrière entre la vase et les algues.

- **Test 4** : Renouvellement du test 3 mais avec l'ajout d'une toile à mailles fines dans les bacs 1 et 2.

Après 5 jours, les algues présentes dans le bac 1 et 2 avaient visiblement conservé un meilleur état. Ainsi, il a été choisi de garder l'emploi de cette toile pour la mise en œuvre de l'expérience en laboratoire.

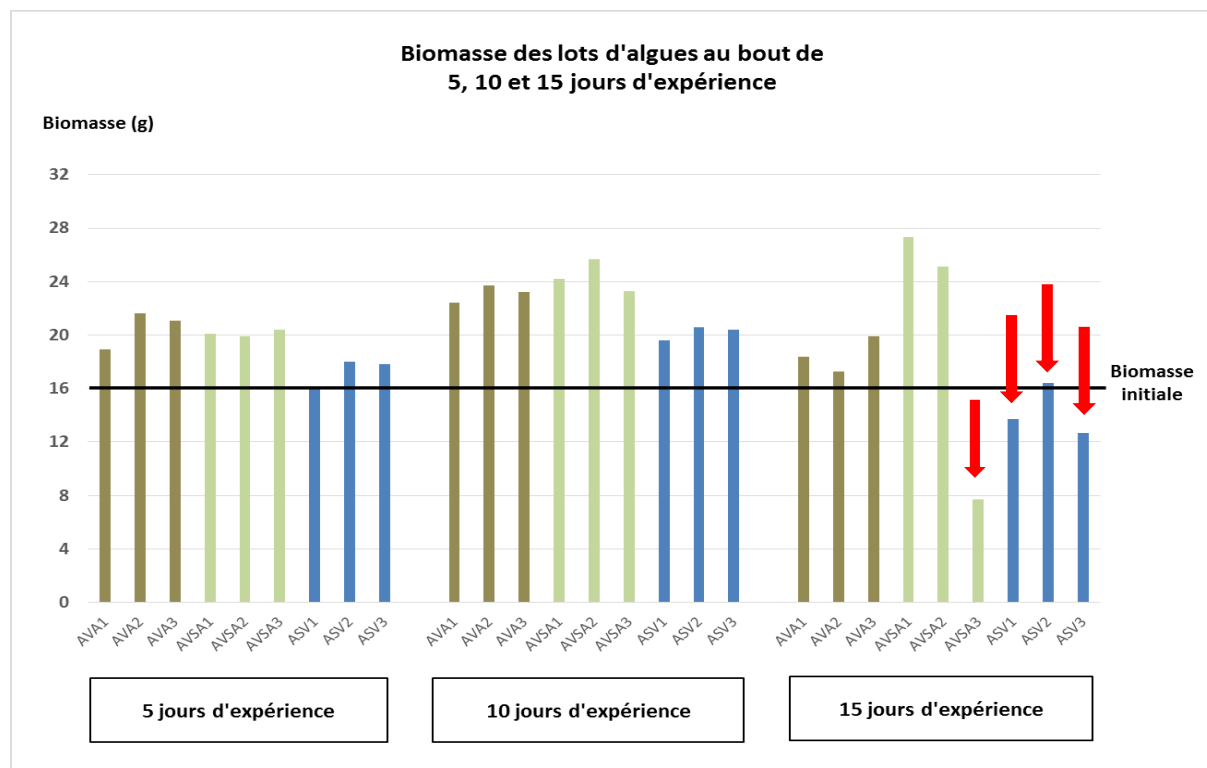
3.2.2 Evolution de la biomasse

A chaque début d'expérience de 5, 10 et 15 jours, 16 g d'ulves ont été introduits dans les 9 bacs. La Figure 22 présente les résultats de biomasse obtenue pour chaque lot d'ulves à la fin des trois expériences.

Les lots d'ulves présents dans les 3 bacs contenant du sédiment avec une agitation mécanique aléatoire sont codés AVA1, AVA2 et AVA3. Les lots d'ulves présents dans les 3 bacs contenant du sédiment sans agitation mécanique sont codés AVSA1, AVSA2 et AVSA3. Les lots d'ulves présents dans les 3 bacs sans sédiment sont codés ASV1, ASV2 et ASV3.

L'analyse de la Figure 22 montre que :

- Pour les 3 séries d'expériences, les lots d'ulves présents dans les bacs contenant du sédiment ont eu une croissance plus importante que les lots d'ulves présents dans les bacs sans sédiment. **La présence de sédiment semble donc favoriser la croissance des ulves.**
- Pour les deux premières séries d'expérience, il n'y a pas eu de différence nette de croissance entre les lots AVA1, AVA2, AVA3 et les lots AVSA1, AVSA2, AVSA3 qui n'ont pas subi d'agitation. **La remise en suspension de particules sédimentaires ne semble pas avoir d'effet sur la croissance algale**
- Pour la dernière série de 15 jours :
 - les lots AVA1, AVA2 et AVA3 ont eu une croissance ralentie par rapport aux deux autres séries d'expérience. Il est possible que cette baisse de croissance soit due à l'agitation dans ces bacs qui, d'une part induit de la turbidité (et donc une diminution de la lumière disponible pour les algues) et d'autre part provoque le dépôt de particule de vase à la surface des algues qui ont tendance à rester ensuite au fond des bacs (Figure 23) ce qui diminue également l'accès à la lumière par les algues.
 - les lots AVSA1 et AVSA2 ont eu une croissance normale par rapport au nombre de jours d'expérience, ce qui n'est pas le cas des algues du lot AVSA3 qui se sont totalement dégradées après 10 jours d'expérience (Figure 23). La reproduction des ulves par sporulation pourrait être à l'origine de ce phénomène.
 - les lots d'ulves présents dans les bacs **sans sédiment se sont généralement dégradés ce qui serait dû probablement à un manque de nutriments, l'eau étant initialement filtrée et non renouvelée au cours de l'expérience.**



↓
Algues plus ou moins blanchies

Figure 22: Biomasse des lots d'ulves obtenue après 5, 10 et 15 jours d'expérience



Figure 23 : Photos illustrant lors de l'expérimentation des 15 jours, la différence de comportement des algues avec agitation (1) et sans agitation (2) et le blanchiment du lot d'algues AVSA3 présent dans le bac (3) et dans la bassin de tri (4).

3.2.3 Analyses des algues, de l'eau et de la vase

a. Quotas azotés et phosphorés des algues

➤ Expérience de 5 et 10 jours

Les données de quotas et de biomasse obtenues pour chaque lot d'algues à la fin de l'expérimentation de 5 et 10 jours, sont disponibles en Annexe 6. L'homogénéité des données permet de ne présenter ci-dessous que les résultats des triplicats moyennés.

L'analyse de la Figure 24 montre que :

- **Pour l'azote**, seuls les lots d'algues initiaux (AM5 et AM10) et les lots d'algues AVA5 (Vase + Agitation de l'exp 5 jours), présentaient des quotas au-dessus du seuil critique (Q_N). Donc mis à part les lots AVA5, **l'azote semblerait dans ces conditions expérimentales, être un facteur limitant pour la croissance des ulves au bout de 5 et 10 jours**. A noter que les quotas azotés initiaux des lots d'ulves (AM5 et AM10) n'étaient pas élevés au début de chaque série d'expérience (autour de 2,25 % de MS), en accord avec les quotas azotés des algues prélevées sur la vasière du Lédano à cette période de l'été (Figure 11). Ainsi, les différents lots d'algues ont puisé dans leur stock interne les quantités d'azote nécessaires à leur développement une fois l'azote du milieu épuisé.
- Au bout de 5 et 10 jours d'expérience, les quotas azotés des lots AVA étaient significativement plus élevés que ceux des lots AVSA. Etant donné que la croissance de ces deux lots était similaire, **on peut déduire que l'agitation a permis d'accentuer le relargage sédimentaire libérant ainsi de l'azote dans l'eau de mer**.
- Enfin, les quotas azotés et la croissance des algues en présence du sédiment étaient supérieurs aux algues présentes dans les bacs sans vase et d'autant plus après 10 jours d'expérience. **Le sédiment aurait donc vraisemblablement un rôle dans l'approvisionnement de l'azote, au moins dans les conditions d'appauvrissement de la colonne d'eau**.
- **Pour le phosphore**, tous les lots d'algues présentaient des quotas au-dessus du seuil critique (Q_P) au bout de 5 et 10 jours d'expériences. **Le phosphore n'était donc pas un élément limitant pour la croissance de ces algues**. Toutefois, les quotas phosphorés des algues du milieu utilisées pour cette expérience étaient initialement très élevés (0,275 % de MS) par rapport aux quotas des algues du milieu prélevées à la même période pour l'expérience *in situ* (de l'ordre de 0,2 % de MS (Figure 12)). Ces niveaux de stocks élevés en début d'expérience, y compris pour les lots d'algues ASV (sans sédiment) et la croissance limitée des algues du fait du manque d'azote en particulier dans la modalité « sans sédiment » explique probablement que cet élément n'a pas manqué à la croissance des algues et est resté au-dessus des seuils de limitation..
- les quotas phosphorés et la croissance des algues en présence du sédiment étaient supérieurs aux quotas des algues présentes dans les bacs sans vase et d'autant plus après 10 jours d'expérience. **Le sédiment aurait donc vraisemblablement un rôle dans l'approvisionnement du phosphore**.
- Contrairement à l'azote, aucune différence significative existe entre les modalités avec ou sans agitation. **La remise en suspension des particules de vase créée par l'agitation, n'aurait**

donc pas d'effet sur la biodisponibilité du phosphore, dans les conditions de l'expérimentation.

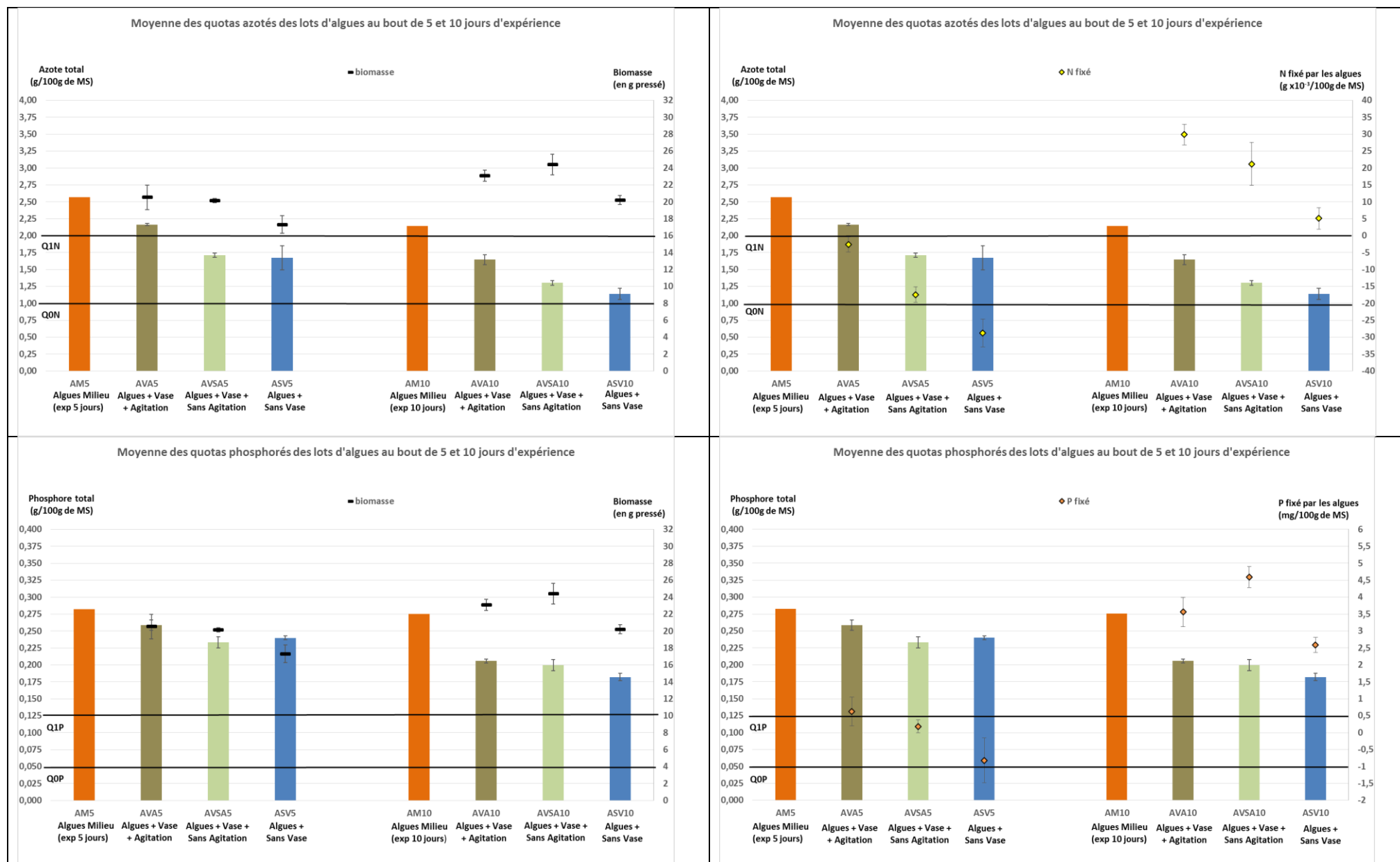


Figure 24 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues après 5 et 10 jours d'expérience (du 25 août au 9 septembre 2016)

D'après les deux graphiques de la Figure 24, les quantités d'azote ou de phosphore fixées par les lots d'algues en présence du sédiment étaient significativement supérieures à celles fixées par les lots d'algues qui n'étaient pas en contact avec la vase. **La source première des nutriments serait donc probablement sédimentaire dans ces conditions expérimentales.**

L'agitation semble dans un premier temps (expérience de 5 jours) augmenter la disponibilité des nutriments notamment pour l'azote où la différence entre les deux modalités (avec ou sans agitation) était significative. Par contre, cet effet semble dans un second temps (expérience de 10 jours), être inversé notamment pour le phosphore dont la quantité fixée par les lots d'algues AVA (avec agitation) était significativement plus faible par rapport aux lots d'algues sans aucune agitation. Il a été observé durant l'expérience de 10 jours que l'agitation mécanique appliquée aléatoirement dans les bacs (AVA) apportait de la turbidité dans l'eau et la sédimentation des particules de vase entraînait les algues sur le fond (Figure 23). A l'inverse, les lots d'algues AVSA10 (sans agitation) étaient, le plus souvent, bloqués en surface par les bulles d'air créées par le système d'oxygénation (Figure 23). Donc cette différence de quantité de phosphore fixée au bout de 10 jours d'expérience serait probablement due à la différence de biomasse entre les lots AVSA et les lots d'algues AVA qui, au fond des bacs, ont reçu moins de lumière limitant ainsi leur croissance. **Ainsi, à la différence de l'azote, le phosphore pourrait être diffusé dans la colonne d'eau de manière passive sans nécessité l'action d'une mise en suspension de particules.**

➤ **Expérience de 15 jours**

Comme pour les expériences de 5 et 10 jours, les moyennes de biomasse et des quotas azotés et phosphorés des lots d'algues ont été calculées et choisies en priorité pour interpréter les résultats au vu des données assez homogènes à l'intérieur de chaque triplicat (Annexe 6). Il faut aussi rappeler que pour cette expérience, de l'eau de mer filtrée a été utilisée de manière à créer un milieu aquatique biologiquement appauvri.

L'analyse de la Figure 25 permet de mettre en évidence les interprétations suivantes :

- Mis à part les quotas des algues du milieu (AM15), tous les quotas azotés et phosphorés des lots d'algues se situaient entre les niveaux de quotas critiques (Q_1N et Q_1P) et les niveaux de quotas de subsistance (Q_0N et Q_0P). **Ces deux éléments nutritifs semblent donc limitants pour la croissance de ces algues au bout de 15 jours d'expérience.** En effet, les algues des lots ASV15 (sans vase) dont les valeurs de quotas étaient les plus proches du seuil de subsistance (Q_0N et Q_0P), ne se sont pas développées au bout de 15 jours et se sont plutôt dégradées montrant des blanchiments plus ou moins importants (Figure 23).
- Les quotas azotés et phosphorés et la biomasse des lots d'algues en présence du sédiment étaient significativement supérieurs aux lots d'algues sans présence de vase. **Etant donné que l'eau de mer filtrée était biologiquement appauvrie, les éléments nutritifs dissous présents dans cette eau ne suffiraient pas aux algues. Ainsi, le sédiment semble être la seule source nutritive pour les algues en contact de la vase.**

Comme pour l'expérience de 10 jours, les indices de fixation de l'azote par les lots d'algues en présence du sédiment étaient proches tandis que pour le phosphore, ce seraient les algues ne subissant pas d'agitation qui en fixeraient davantage. De plus, les quantités moyennes d'azote et de phosphore fixées étaient négatives pour les lots d'algues AVA15 (avec agitation). **Le relargage sédimentaire du phosphore paraît plus efficace par diffusion passive que par remise en**

suspension des particules de vase provoquée par l'agitation, dans les modalités de nos expériences.

Enfin, il est normal d'observer des quantités d'azote et de phosphore « fixées négatives » (donc moins de fixation que de dégradation) pour les algues sans présence de sédiment, les algues ayant à la fois des quotas très bas et des biomasses qui diminuent sur 15 jours. **Ce résultat confirme que le sédiment jouerait bien un rôle dans l'apport de ces nutriments dans nos conditions expérimentales.**

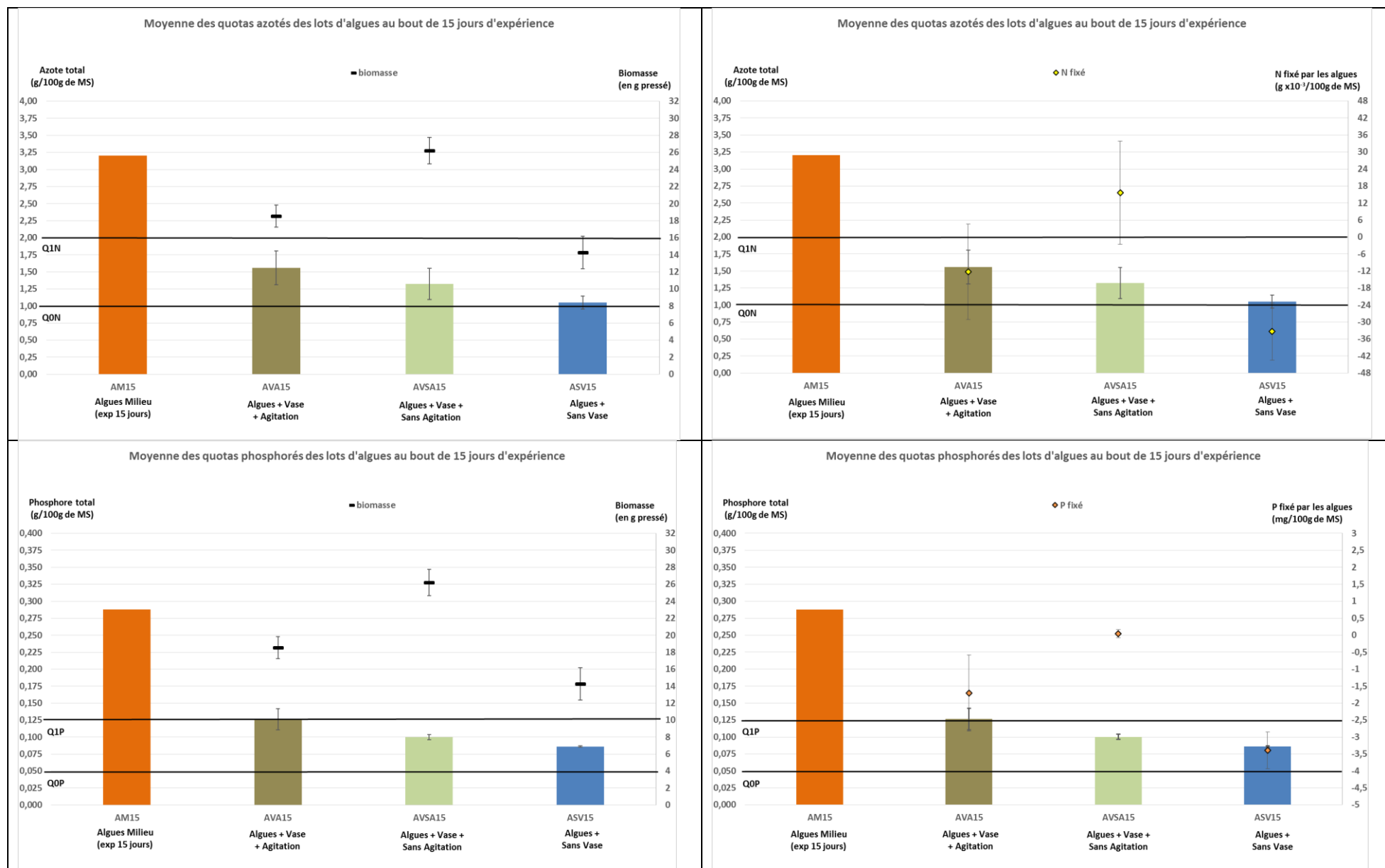


Figure 25 : Moyenne des quotas azotés (haut) et phosphorés (bas) des lots d'ulves, moyenne des biomasses algales et quantité d'azote (haut) et de phosphore (bas) fixée par les algues après 15 jours d'expérience (du 15 au 30 septembre 2016)

b. Dosage de l'eau de mer filtrée et non filtrée

➤ Expérience de 5 et 10 jours

Les teneurs en ammonium (NH_4^+), orthophosphates (PO_4^{3-}) et nitrates (NO_3^-) dans les échantillons d'eau de mer prélevés en sortie du robinet et dans un des bacs sans vase étaient comparables (Figure 26). Des concentrations en ammonium 20 à 30 fois supérieures à l'eau de mer initiale ont été mesurées dans l'eau de mer ayant été en contact avec le sédiment durant 24 h. La concentration des orthophosphates était également 2 fois supérieure aux concentrations initiales. **La présence de sédiment induit donc l'enrichissement de l'eau en ammonium et en orthophosphates. La concentration en nitrates de l'eau du bac avec sédiment étant comparable à celle au bac sans vase, cet élément ne semble pas dépendant du sédiment sur une très courte durée.**

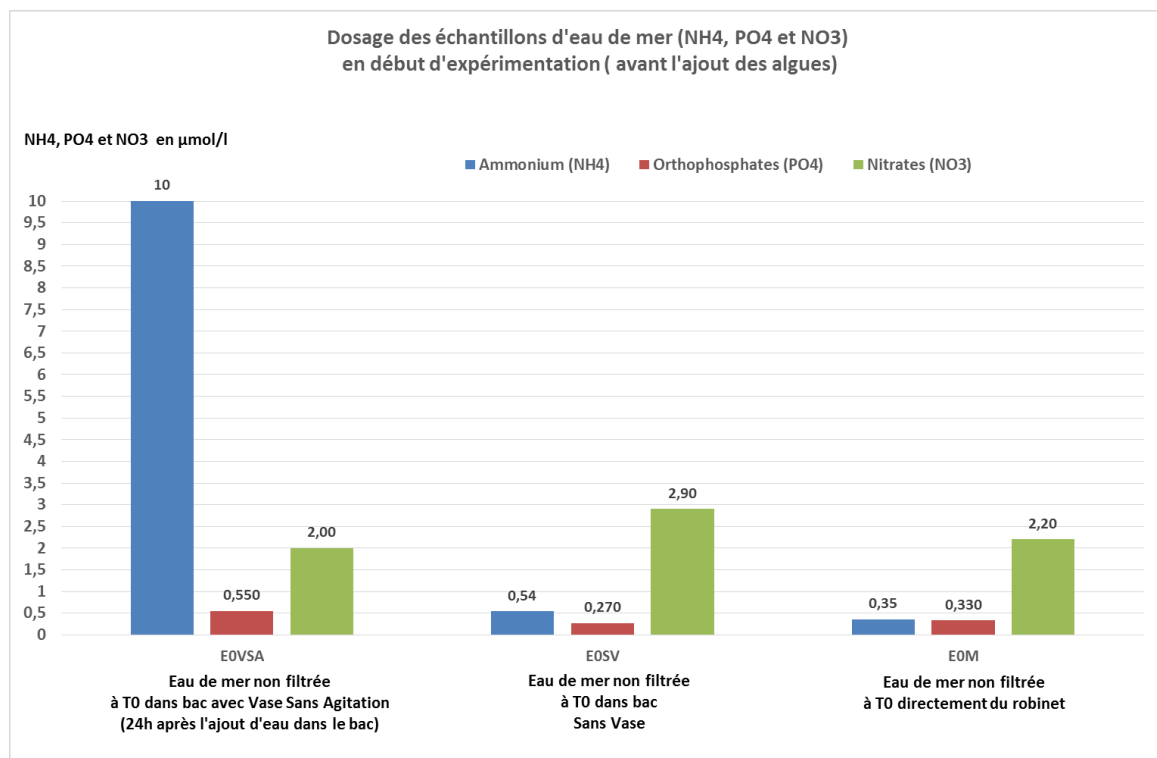


Figure 26 : Dosage des échantillons d'eau de mer non filtrée prélevés en début d'expérimentation (avant l'ajout des algues) dans un bac contenant de la vase, dans un bac sans vase et directement en sortie de robinet « eau de mer »

Pour l'analyse des dosages des échantillons d'eau de mer prélevés à la fin des expérimentations de 5, 10 et 15 jours, les résultats n'ont pas été moyennés du fait de l'importante variabilité entre les triplicats.

Etant donné l'utilisation de l'eau de mer non filtrée pour les expériences de 5 et 10 jours et de l'eau de mer filtrée pour l'expérience de 15 jours, les résultats de dosage des deux premières expériences et de la dernière seront traités séparément et ne feront pas l'objet d'une comparaison.

L'analyse des deux graphiques de la Figure 27 montre que :

- **L'ammonium (NH_4)** a été l'élément chimique variant le plus au sein de chaque triplicat et entre les triplicats. Les concentrations les plus élevées ont été mesurées dans les bacs EVA (Eau avec Vase et Agitation). **L'agitation pourrait permettre de libérer plus facilement cet élément chimique présent dans le sédiment.**

Les concentrations en ammonium étaient toutefois aussi élevées dans les bacs ne contenant pas de vase que pour les autres modalités (avec vase). Les concentrations en ammonium ont par ailleurs évolué dans le bac sans vase entre l'expérience de 5 jours et l'expérience de 10 jours. **L'eau de mer utilisée n'ayant pas été filtrée, une activité microbiologique pourrait être à l'origine de cette évolution des concentrations.**

- Pour toutes les modalités, **les nitrates et les orthophosphates** avaient majoritairement des concentrations indétectables que ce soit pour l'expérience de 5 jours ou pour celle de 10 jours, probablement dues à la consommation de ces éléments par les algues.

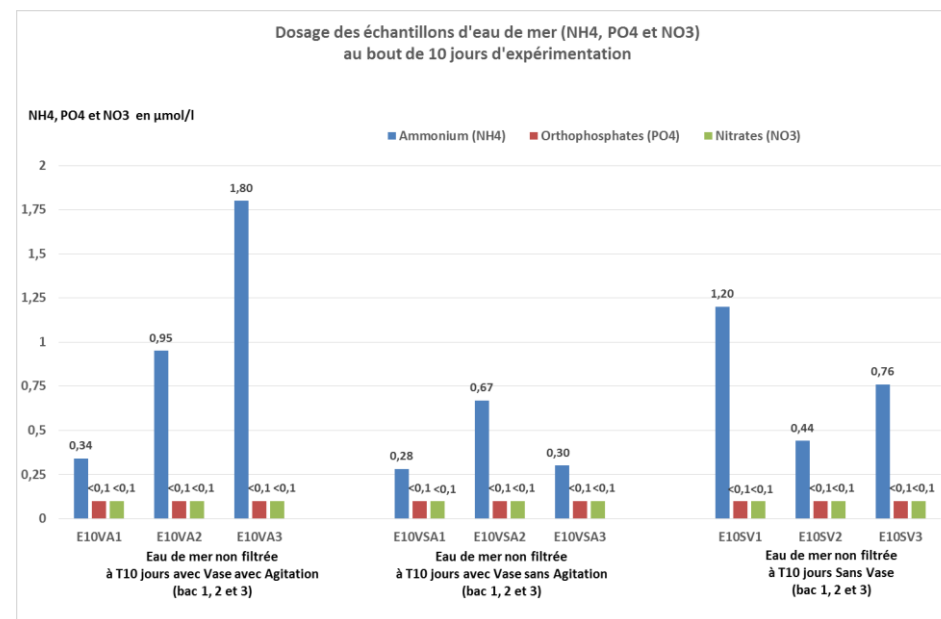
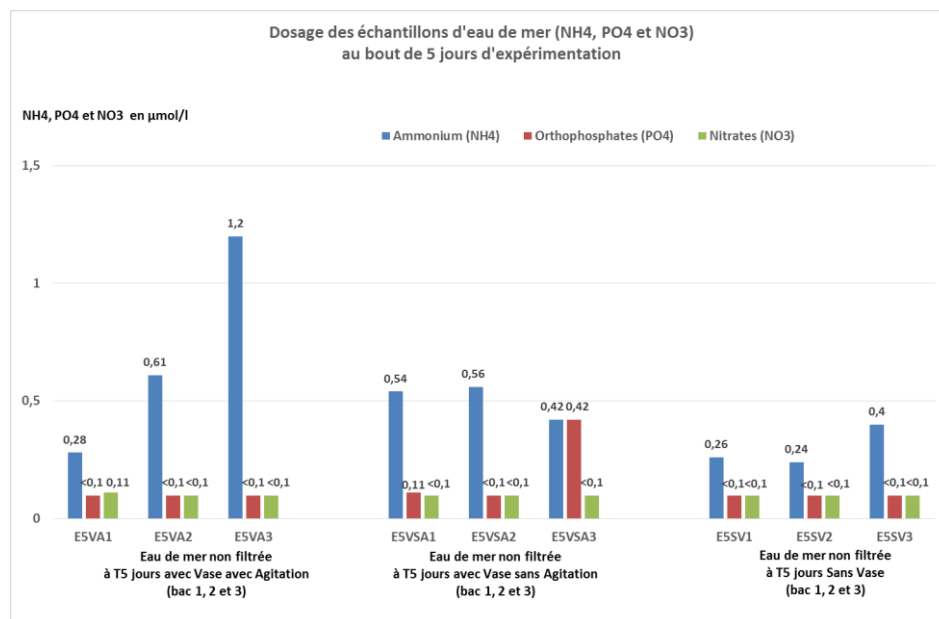


Figure 27 : Dosage des échantillons d'eau de mer non filtrée prélevés au bout de 5 et 10 jours d'expérimentation dans les bacs EVA (vase et agitation), les bacs EVSA (vase sans agitation) et les bacs ESV (sans sédiment)

➤ Expérience de 15 jours

Pour cette expérience de l'eau de mer filtrée a été utilisée. Ainsi l'eau de mer non filtrée présente dans les bacs lors des deux expériences précédentes a d'abord été siphonnée de manière à conserver le même sédiment durant les trois séries d'expérience. Des échantillons d'eau de mer ont été prélevés dans chaque modalité avant l'ajout des algues et 6 jours après l'ajout de l'eau de mer filtrée de manière à détecter une éventuelle diffusion de ces éléments chimiques provenant du sédiment. Les résultats de dosage de ces échantillons sont illustrés dans la Figure 28.

L'analyse de la Figure 28 montre que :

- Les concentrations des trois éléments chimiques (NH_4^+ , PO_4^{3-} et NO_3^-) étaient faibles dans le bac ne contenant pas de vase. En effet, l'activité biologique d'une eau de mer filtrée étant très limitée, aucun processus de reminéralisation ne s'est produit, ce qui explique ces faibles concentrations en NH_4^+ et PO_4^{3-} notamment.
- Comme pour les échantillons d'eau de mer prélevés au début des trois séries d'expérience (Figure 26), les concentrations en NH_4^+ étaient plus élevées dans les bacs contenant de la vase. **Cela tend à confirmer le rôle du sédiment dans l'apport d'ammonium, notamment via les processus de reminéralisation.**
- Les différences de concentrations en nutriments observées entre les deux modalités contenant de la vase pourraient s'expliquer par une variabilité des processus biologiques en lien avec le sédiment au sein de chacun des bacs. Pour rappel, ce n'est pas l'agitation qui induit cette différence dans la mesure où l'eau analysée a été prélevée avant l'expérience.

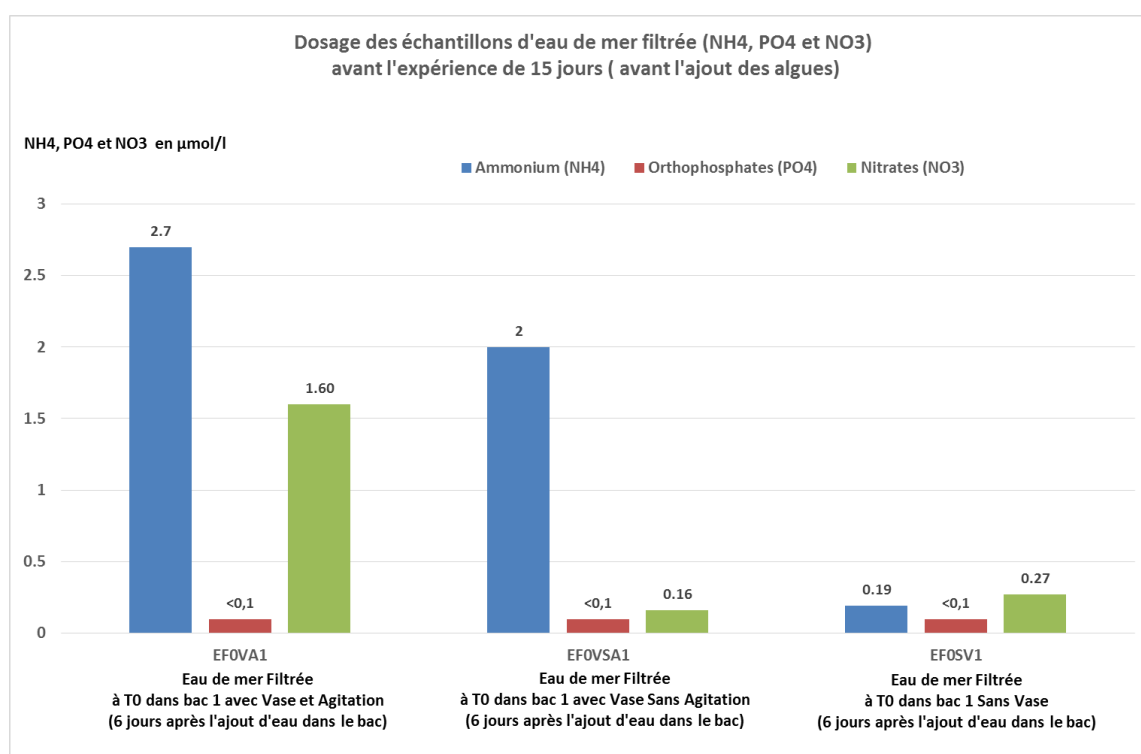


Figure 28 : Dosage des échantillons d'eau de mer filtrée prélevés avant l'expérience de 15 jours (avant l'ajout des algues et 6 jours après l'ajout d'eau) dans un bac avec la modalité « vase et agitation », un bac avec la modalité « vase sans agitation » et un bac sans vase. L'eau analysée a été prélevée avant la mise en œuvre des expérimentations. Le bac « vase et agitation » n'avait donc pas encore subi d'agitation au moment du prélèvement d'eau.

A l'issue de l'expérimentation de 15 jours, l'eau de mer a été à nouveau analysée. Les résultats présentés Figure 29 montrent que :

- **L'ammonium** a été l'élément chimique variant le plus au sein de chaque triplicat et qui présentait les concentrations les plus élevées notamment dans les bacs ne contenant pas de sédiment avec un pic à 8,3 $\mu\text{mol/l}$ pour l'échantillon EF15SV2 et dans les bacs contenant de la vase sans agitation avec une valeur maximale atteinte à 1,8 $\mu\text{mol/l}$ pour l'échantillon EF15VSA3. Etant donné que ces pics de concentration de NH_4 ont eu lieu dans les bacs dans lesquels un blanchiment des algues a été constaté (Figure 22), **il est probable que la présence d'ammonium soit liée au processus de dégradation en cours dans ces bacs.**
- Les concentrations en **nitrates** étaient de manière générale plus élevées au sein des bacs ne contenant pas de sédiment. **Les algues dans ces bacs étant en dégradation du fait probablement d'une limitation en phosphore (quotas en phosphore inférieurs au seuil de quota critique (Figure 25), cela aurait pour conséquence un relargage de nitrates.**
- Mis à part l'échantillon EF15VSA1 (vase sans agitation, bac 1), les concentrations d'orthophosphates (PO_4^{3-}) étaient très faibles quelle que soit la modalité. **Cet élément chimique étant peu présent dans l'eau, cela confirme que la source de phosphore serait plutôt dans le sédiment.** L'analyse des quotas montre d'ailleurs des quotas internes plus importants en phosphore dans les algues des bacs avec sédiment (Figure 25).

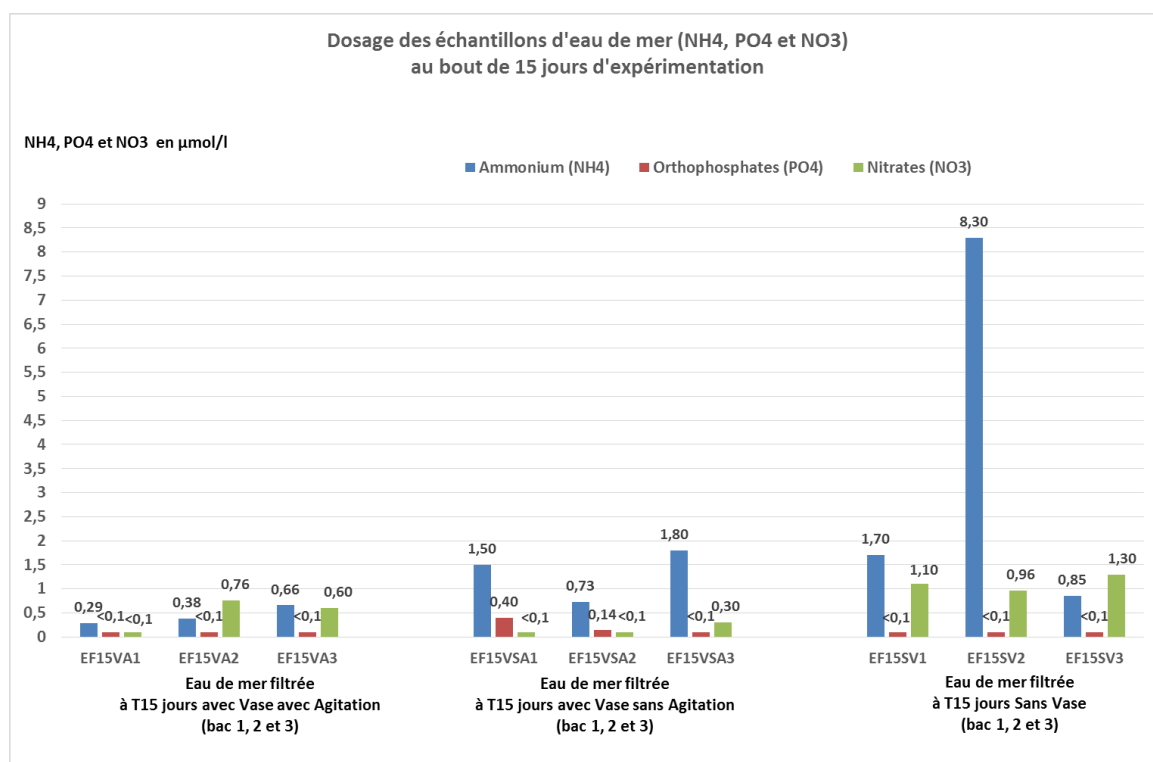


Figure 29 : Dosage des échantillons d'eau de mer filtrée prélevés au bout de 15 jours d'expérimentation dans les bacs EF15VA (vase et agitation), les bacs EF15VSA (vase sans agitation) et les bacs EF15SV (sans sédiment)

c. Dosage de la vase

Des échantillons de vase ont été prélevés de manière à caractériser le sédiment en début et fin d'expérimentation. Dans le but d'identifier des différences de concentrations d'azote ou de phosphore selon la profondeur dans la vase, des sous échantillons de vase (3) ont été prélevés selon ce critère. Les résultats de dosage de la vase en début et fin d'expérimentation sont illustrés dans la Figure 30. Toutes les données brutes (granulométrie, dosage azote et phosphore, matière organique) sont disponibles en Annexe 7.

L'analyse des deux graphiques de la Figure 30 permet de mettre en évidence les interprétations suivantes :

- Les contenus azotés et phosphorés des échantillons de vase ont suivi les mêmes tendances entre le début et la fin d'expérimentation, quelle que soit la modalité.
- Il n'y a pas eu de différence significative de concentration d'azote ou de phosphore entre la couche inférieure et supérieure de vase. **Sur 5 cm d'épaisseur de vase, aucun gradient de concentration d'azote ou de phosphore n'apparaît.** Ainsi, pour la caractérisation du sédiment en fin d'expérimentation, seuls des échantillons prélevés sur toute l'épaisseur de vase ont été retenus pour l'analyse au laboratoire.
- En fin d'expérimentation, les contenus azotés et phosphorés dans la vase étaient encore proches des niveaux relevés en début d'expérimentation. **La durée d'un mois semble être largement insuffisante pour épuiser le sédiment en nutriments, dans les modalités de cette expérience.**

Il n'y a pas eu de différence significative de concentration d'azote ou de phosphore selon la modalité avec ou sans agitation. **La remise en suspension de particules de vase ne serait pas non plus suffisante pour accélérer l'épuisement du sédiment en nutriments.**

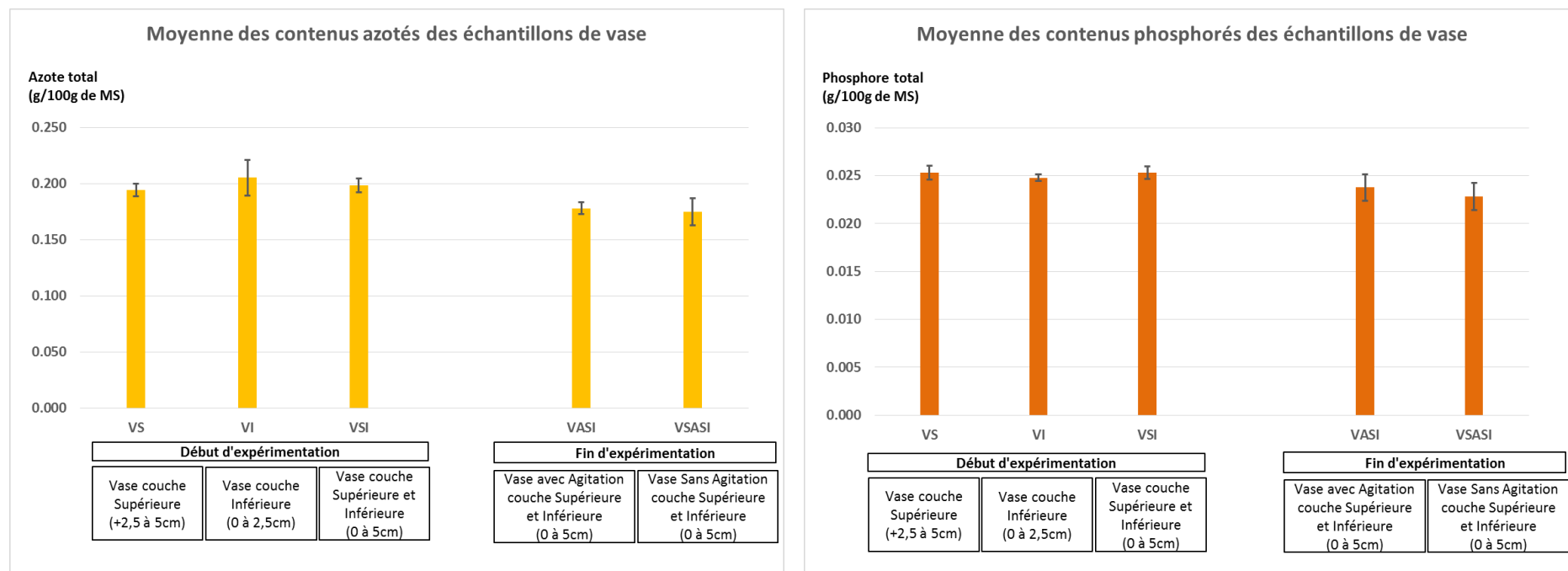


Figure 30 : Moyenne des contenus azotés et phosphorés des échantillons de vase prélevés en début et fin d'expérimentation

3.3 Discussion

L'analyse globale des résultats obtenus lors des trois séries d'expérience (biomasses, quotas, dosage eau de mer et vase), permet de discuter sur le niveau de contribution du sédiment dans la croissance des algues en fonction de l'élément nutritif ciblé (azote ou phosphore). Ainsi, dans un premier temps, la discussion porte sur les différences observées entre les modalités « vase » et « sans vase » en tenant compte du type d'eau de mer utilisée (non filtrée pour les expériences de 5 et 10 jours et filtrée pour l'expérience de 15 jours). Dans un second temps, la modalité « vase et agitation » est discutée en tenant compte de l'ensemble des résultats afin de déterminer les effets potentiels de cette action sur le relargage sédimentaire notamment.

➤ Expérience de 5 à 10 jours

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus pour ces deux séries d'expérience permet de mettre en évidence des tendances quant à la contribution potentielle du sédiment vis-à-vis de la croissance des algues, en fonction de l'élément nutritif considéré :

- Azote

Pour les deux expériences, l'azote paraîtrait être l'élément limitant pour la croissance des algues dans la mesure où l'ensemble des quotas des algues (toute modalité confondue) se situait en dessous du niveau du quota critique (Q_1N). En outre, les algues qui ne sont pas en présence de vase présentaient les plus faibles valeurs de quotas azotés et de biomasse et par conséquent les plus faibles quantités d'azote fixées par rapport aux algues en contact du sédiment. **Cela signifie que le sédiment aurait vraisemblablement un rôle dans l'approvisionnement de l'azote, dans les conditions de cette expérimentation.** Les concentrations d'azote dissous dans l'eau de mer prélevée aux abords du CEVA (Pleubian, Figure 26) étaient comparables à celles des eaux de Roscoff prélevées le 9 septembre 2016 (Tableau 5).

Tableau 5 : Dosages de l'ammonium (NH_4^+), des orthophosphates (PO_4^{3-}) et des nitrates (NO_3^-) dans l'eau de mer relevés à Roscoff (données fournies par « Service d'Observation en Milieu Littoral, INSU-CNRS, Station Roscoff) et à Pleubian à la période fin août-début septembre.

Date	Lieu	Ammonium (NH_4^+ en $\mu mol/l$)	Orthophosphates (PO_4^{3-} en $\mu mol/l$)	Nitrates (NO_3^- en $\mu mol/l$)
09/09/2016	Roscoff	0,43	0,26	1,87
25/08/2016	Pleubian	0,35	0,33	2,20

Il est probable que ces concentrations marines d'azote soient inférieures à celles mesurées dans un estuaire notamment celui du Trieux où l'expérience *in situ* a été réalisée (vasière du Lédano). C'est pourquoi, à la différence des observations de terrain où la biodisponibilité de l'azote s'est avérée être plus importante dans la colonne d'eau, **ces expériences de 5 et 10 jours semblent mettre en évidence la contribution du sédiment en tant que pourvoyeur d'azote** qui n'aurait pas pu se voir avec une eau de mer plus chargée en nutriment. En effet, quand le niveau de nutriments est élevé dans la colonne d'eau, celle-ci devient la première source pour les algues, les apports nutritifs provenant du sédiment n'intervenant que dans un second temps lorsque la source nutritive dans la colonne d'eau est basse (Kamer et al. 2004). Plusieurs études ont aussi démontré que le relargage des nutriments par le sédiment contribue bien à la croissance des algues surtout quand les niveaux de nutriments dans l'eau sont bas (Boyle, Kamer et Fong 2004; Dailer, Smith et Smith 2012).

- **Phosphore**

Contrairement à l'azote, **le phosphore n'était pas limitant pour la croissance des algues (toutes modalités confondues) lors de ces deux expériences.** Compte tenu des résultats de l'expérience *in situ*, des quotas phosphorés et une croissance plus élevés étaient attendus pour les algues présentes dans les bacs avec sédiment, notamment après 10 jours d'expérience. Toutefois, les quotas phosphorés des algues dans les bacs sans vase sont restés élevés en dépit de l'absence de source sédimentaire de nutriment. Ceci s'explique par le fait que les algues n'ont pas fait beaucoup de croissance ce qui induit une faible consommation de leur contenu interne de phosphore. Ainsi, malgré des quotas phosphorés assez proches entre les deux modalités « vase » et « sans vase », les quantités de phosphore fixées par les algues de modalité « sans vase » sont significativement inférieures aux algues de modalité « vase ». **Cela confirme que le sédiment est pourvoyeur de phosphore.**

➤ **Expérience de 15 jours**

En comparaison avec les résultats de dosage de l'eau de mer non filtrée (et sans contact avec le sédiment), l'eau de mer filtrée contient moins d'éléments nutritifs pouvant être utile à la croissance des algues (Figure 26 et Figure 28). Quelle que soit la modalité d'expérimentation, les quotas azotés et phosphorés se situent en dessous du seuil de quotas critique (Q_{iN} et Q_{iP}), **indiquant une limitation de la croissance par manque de nutriments.** Ce manque de nutriments d'autant plus prononcé pour les algues de modalité « sans vase » s'est traduit par un blanchiment plus ou moins important des thalles. D'ailleurs, cette dégradation des algues au bout de 15 jours semble correspondre avec l'augmentation des concentrations en ammonium, observée dans l'eau des bacs concernés par ce phénomène (Figure 29). En effet, la dégradation d'algues vertes telles que l'ulve peut relarguer de l'ammonium rapidement dans l'eau environnante (Gao et al. 2013).

Ces résultats montrent que le sédiment est effectivement pourvoyeur de nutriment. Dans cette expérimentation, **le sédiment n'apporte toutefois pas les teneurs en nutriments nécessaires pour assurer une croissance optimale des ulves.**

L'agitation permettrait probablement dans un premier temps (expérience de 5 jours) d'augmenter la disponibilité de l'azote dans l'eau étant donné que les algues présentes dans les bacs correspondant à cette modalité, présentaient pour une croissance similaire et des quotas azotés plus élevés que ceux des algues de modalité « vase sans agitation ». Pour le phosphore, cet effet à court terme n'a pas été détecté. A long terme (expérience de 10 et 15 jours), cet effet semble s'inverser et d'autant plus pour le phosphore dans la mesure où ce nutriment était significativement moins fixé par les algues subissant une agitation. L'hypothèse explicative de ce phénomène est que la remise en suspension de particules aurait un impact sur la croissance des algues dans la mesure où la sédimentation de ces particules les entraîne sur le fond limitant ainsi le taux de luminosité nécessaire à leur croissance. D'après ces constats et **d'autant plus pour le phosphore, l'agitation n'accentuerait pas l'effet du relargage sédimentaire des nutriments.** Même si une légère baisse des teneurs en azote et phosphore a été observée dans le sédiment en fin d'expérimentation par rapport à l'état initial, la durée d'un mois ne semble pas suffire à épuiser le sédiment en nutriments et l'agitation ne semble pas non plus permettre d'accentuer cet épuisement.

Afin d'obtenir des résultats plus prononcés de cette expérimentation réalisée en conditions contrôlées, des améliorations expérimentales pourraient être apportées :

- Limiter le temps d'expérience à 10 jours maximum afin d'éviter la dégradation des algues, surtout pour les algues sans présence de sédiment.

- Utiliser de l'eau de mer filtrée plutôt que de l'eau de mer non filtrée dont la partie biologique (phytoplancton, bactéries, ...) peut apporter un biais sur le taux d'azote dissous dans l'eau (dissolution des particules biologiques, due à l'activité bactérienne).
- Supprimer, à certaines heures le bullage de sorte à créer de l'anoxie dans le milieu pour se rapprocher des conditions naturelles et pour favoriser le relargage sédimentaire notamment pour le phosphore. Par exemple, les conditions d'anoxie créées par des dégradations de blooms algaux peuvent stimuler le relargage sédimentaire du phosphore lié au fer ; Dans des conditions anaérobiques, Fe^{3+} dans le sédiment est réduit en Fe^{2+} qui, lié au phosphore, est diffusé graduellement dans l'eau (Gao et al. 2013).

4 Conclusion

L'utilisation des ulves pour déterminer l'importance de la source sédimentaire dans l'apport de nutriments est une approche prometteuse qui permet de s'affranchir des méthodes complexes de quantification des flux et présente l'avantage d'intégrer l'ensemble des flux existants. De plus, que ce soit pour l'expérience *in situ* ou en conditions contrôlées, cette méthode requiert peu de matériel et a un coût réduit. Les tests préliminaires ont permis pour les deux expériences (*in situ* et en laboratoire) de proposer des dispositifs et une méthodologie adaptés aux objectifs de cette étude.

L'analyse des résultats montre que **le sédiment constitue une source de phosphore non négligeable** pour les ulves. En effet, les résultats de l'expérience *in situ* ont montré que seules les algues en contact du sédiment disposaient de cette source nutritive en début de saison et qu'à partir du mois d'août, le relargage sédimentaire, probablement accentué par l'augmentation des températures et des biomasses algales, a permis de rendre plus disponible le phosphore pour les algues situées en hauteur. Les résultats des trois expérimentations en conditions contrôlées ont permis de vérifier que les quantités de phosphore fixées par les algues sans contact avec de la vase étaient toujours inférieures aux quantités fixées par les algues en contact du sédiment. Dans l'étude de Kamer et al. (2004), la croissance d'*Enteromorpha intestinalis* s'est avérée plus importante dans les chambres d'incubation contenant du sédiment vaseux. Les contenus internes en phosphore étaient également plus importants lorsque l'algue était en contact de la vase plutôt que du sable.

Les expérimentations en laboratoire ont aussi montré que le relargage sédimentaire du phosphore peut se réaliser par simple diffusion passive sans forcément nécessiter une remise en suspension des particules de vase provoquée par une agitation.

En ce qui concerne l'**azote**, les résultats de l'expérience *in situ* ont d'abord montré que cet élément pouvait être en majeure partie **fourni par la colonne d'eau**. En effet, l'azote ne semblait pas être un élément limitant pour la croissance des algues qu'elles soient présentes en hauteur ou en contact du sédiment.

Toutefois, d'après les résultats de l'expérience en laboratoire, **le sédiment serait aussi un pourvoyeur d'azote dans certaines conditions**. En effet, pour les trois séries d'expérimentations, l'azote apparaît comme l'élément limitant pour la croissance des algues étant donné que tous les quotas se situent en dessous du niveau du quota critique (Q_N). En outre, la quantité d'azote fixée par les algues de modalité « sans vase » est très nettement inférieure à celle des algues de modalité « avec vase », ce qui signifie que le sédiment a bien un rôle dans l'approvisionnement d'azote. Ce phénomène est probablement invisible dans le milieu naturel avec des eaux plus riches en éléments azotés tel que dans l'estuaire du Trieux où l'expérience *in situ* a été réalisée. Il a été également remarqué lors de ces expérimentations que l'agitation avait un effet à court terme sur le relargage d'azote dans l'eau étant donné que les quotas des algues de modalité « vase et agitation » étaient pour une croissance similaire, plus élevés par rapport aux algues de modalité « vase sans agitation ». Cet effet est moins perceptible à long terme du fait d'une baisse de croissance de ces algues qui par la sédimentation des particules de vase les entraînant sur le fond, ne disposaient probablement plus suffisamment de lumière pour se développer.

La méthodologie appliquée pour cette étude s'est avérée fiable dans la mesure où l'utilisation de triplicat a apporté une bonne représentativité du milieu. Des améliorations des dispositifs expérimentaux restent toutefois à apporter telles que:

- **Diminuer les temps d'expérimentation** à une semaine pour l'expérience *in situ* et à 10 jours maximum pour l'expérience en laboratoire.

Cette durée serait suffisante pour obtenir des résultats de croissance et permettrait de limiter les risques de perte de biomasse (hydrobies, problèmes de cage, dégradation naturelle des algues) et l'effet du fouling. Des améliorations des dispositifs en particulier celui de l'expérience *in situ*, seront donc à apporter telles que (1) retirer régulièrement du terrain les cages pour pouvoir les nettoyer et pour permettre au sédiment de retrouver son état initial sans la présence des cages, (2) appliquer au fond des cages en contact du sédiment, une toile de manière à lutter contre le passage des hydrobies et à faciliter le prélèvement des algues à la fin de chaque campagne, (3) renforcer le système d'ouverture des cages.

- **Utiliser de l'eau de mer filtrée pour toutes les expériences en laboratoire.**

L'utilisation d'eau de mer filtrée permettrait d'éliminer les effets de la consommation primaire afin de mieux maîtriser l'évolution des expérimentations.

- **Réaliser des expérimentations complémentaires.**

Afin d'évaluer la pression du broutage des hydrobies, des tests *in situ* et en laboratoire pourraient être réalisés en faisant varier leur densité. Des tests en conditions contrôlées axés sur le relargage sédimentaire pourraient permettre d'affiner l'appréciation de ce phénomène (test d'anoxie, test sur la diffusion passive,...).

A terme, cette banque de données obtenue pourrait servir comme outil à la modélisation. Le recours au modèle 0D qui a été développé et testé avec succès au titre du projet 2 en 2015 (« Amélioration de la modélisation écologique des proliférations macroalgales ») permettrait de reproduire numériquement les expérimentations en milieu contrôlé pour définir les flux sédimentaires de nutriments en relation avec le fonctionnement écophysio-logique des algues. Ces résultats pourront être par la suite intégrés à des modélisations 3D du développement des algues vertes sur des sites de vasière.

Liste des ANNEXES

Annexe 1 *Protocole in situ*

Détails du protocole

Sortie du matin

Matériel :

- Waders ou bottes avec pantalon ciré
- Sachets plastiques de congélations avec les codes cage, date et lieu à noter au préalable
- Glacière sans bloc de glace
- Sac de plongée (pour le prélèvement d'algues)
- Appareil photo (chargé)

Sur le terrain (matin)

- **Prélèvement des ulves dans le milieu**
 - Prendre des photos de la zone de prélèvement proche du dispositif.
 - Remplir d'ulves le sac de plongée jusqu'à la moitié
- **Etape 2 : Prise de photos du dispositif**
 - Une photo vue d'ensemble des 6 cages
 - De gauche à droite, prendre pour chaque cage une photo extérieure de la cage et une photo intérieure.
 - Pour les cages en hauteur, prendre aussi une photo de l'alèse en écartant le côté gauche avec ses doigts.
 - Enlever ensuite toutes algues présentes sur le dispositif. Réparer les fermetures des fenêtres si besoin.
- **Etape 3 : Prélèvement des ulves dans les cages**
 - Pour chaque cage, il faut prélever tous les lots d'ulves, les mettre dans les sacs de congélation correspondants, les fermer et les stocker dans la glacière.
 - Avant de partir, bien vérifier s'il ne reste pas des hydrobies dans les cages en hauteur à enlever et si les fenêtres des cages sont bien refermées.

Sortie du soir

Avant de partir sur le terrain (soir)

Matériel :

- Waders ou bottes avec un pantalon ciré
- Glacière contenant les 6 sacs d'ulves
- Appareil photo
- 1 bassine
- 1 bidon d'eau de mer rempli à moitié
- 1 brosse

Sur le terrain (soir)

- Tout le matériel doit être amené jusqu'au dispositif en une seule fois.
- Si les cages sont sales, passer un coup de brosse en utilisant la bassine remplie d'eau de mer.
- Mettre chaque lot d'ulves dans les cages respectives.
- Avant de partir, vérifier que les fenêtres des cages soient bien fermées.

Retour de terrain

a. Préparation des lots d'ulves pour le renouvellement de l'expérimentation

- Préparer 6 sacs de congélation en inscrivant le code cage
- Trier et nettoyer les ulves : utiliser 3 bassines remplies d'eau de mer.
- Presser les ulves à la main et peser pour obtenir un poids frais total de 600 g.
- Répartir 100 g d'ulves dans chaque sac de congélation.
- Humidifier légèrement à l'eau de mer chaque lot d'ulves.
- Fermer les sacs et les remettre dans la glacière.
- Garder le surplus d'ulves restant dans le sac de plongée et les mettre dans la chambre froide, elles serviront pour effectuer les quotas du lot d'algues prélevées dans le milieu.

b. Préparation des lots d'ulves pour l'analyse au laboratoire (à faire le lendemain)

- Préparer 7 sacs de congélation en inscrivant le site de l'étude, le code cage ou le code 1M (M pour milieu) et la date
- Trier et nettoyer les ulves : utiliser 3 bassines remplies d'eau de mer.
- Presser les ulves à la main et peser.
- Tremper dans une bassine d'eau de mer les ulves dans le filet et peser après 1 minute d'égouttage (poids « égoutté 1 min »).
- Trier et nettoyer les ulves : utiliser 2 bassines d'eau de mer et une bassine vide.
- Rincer rapidement les ulves dans une bassine d'eau distillée et presser les algues à la main avant de les mettre dans les sacs de congélation correspondants.
- Pour chaque sac, ne garder que 100 g d'ulves pour l'analyse en laboratoire.
- Fermer les sacs et les placer au congélateur (-20 °C).

Annexe 2 Protocole expérience laboratoire

Partie terrain

Prélèvement vase + algues vertes *in situ*

Le sédiment et les ulves seront prélevés à la vasière du Ledano où se trouve l'expérience *in situ*. Sur les 9 bacs prévus pour l'expérimentation en laboratoire, 6 bacs sont avec du sédiment. Les algues seront présentes en même quantité dans les différents bacs.

Matériel :

- 6 bacs en plastique
- Boîte de prélèvement de sédiment en inox
- Plaquette blanche
- Couteau
- Règle
- Sac de plongée
- Tapis et brosse
- Gants
- Appareil photo
- Waders ou bottes avec pantalon ciré

Sur le terrain

Prélèvement du sédiment

Prélever la vase dans un environnement proche du dispositif de l'expérience *in situ* et sur une zone de préférence non recouverte par les algues.



Utiliser la règle pour vérifier la profondeur de la vase qui doit être minimum à 5 cm d'épaisseur. Utiliser la plaquette blanche pour avoir la bonne dimension de la zone à prélever et marquer aussi avec le couteau une zone à côté pour pouvoir accéder avec la boîte en inox. Enlever la vase à côté de la zone à prélever et insérer la boîte pour effectuer le prélèvement jusqu'à la moitié.



Pour que le carottage de vase soit de la même épaisseur partout, couper avec le couteau la partie basse de l'échantillon et enlever le surplus pour obtenir une épaisseur de 5 cm. Il faut ensuite introduire la boîte en inox dans le bac et faire glisser la vase en la poussant à l'aide d'une plaquette.



Effectuer les mêmes étapes pour compléter le bac de l'autre moitié de vase.



Le port de gants peut être conseillé pour éviter toute coupure avec la boîte, le couteau et les coquillages présents dans la vase.

Cette manipulation est à reproduire 6 fois.

Un autre prélèvement de vase est à effectuer dans le milieu pour caractériser le sédiment en début d'expérimentation (granulométrie, teneur en azote et phosphore et matière organique).

Prélèvement des algues vertes

Prélever ensuite des ulves et remplir le sac de plongée jusqu'au quart pour obtenir suffisamment d'algues qui serviront à l'expérimentation et pour le quota initial des algues en azote et phosphore en début d'expérimentation.

Préparation des bacs avant expérience (au CEVA)

- Mettre délicatement de l'eau de mer dans les 6 bacs contenant du sédiment de manière à ne pas trop remettre en suspension les particules de vase. Remplir les 6 bacs jusqu'à 16 l d'eau.
- Laisser décanter la vase au minimum 12 h et enlever les hydrobies au fur et à mesure qu'elles remontent à la surface par manque d'oxygène.
- Placer les toiles dans les bacs de manière à créer une barrière entre la vase et les algues.
- Trier et nettoyer à l'aide de bassines remplies d'eau de mer, les algues prélevées dans le milieu et les presser pour obtenir un poids frais total de 164 g (16 g X 9 bacs et 20 g pour l'échantillon témoin à T0)

Protocole prélèvements expérience au CEVA

Protocole prélèvement EAU DE MER

Préparation des flacons avant prélèvement

- Laver les flacons à l'acide à 10 % (solution HCl) en les trempant dans une bassine.
Attention : ne jamais mettre de l'eau dans l'acide mais toujours de l'acide dans l'eau pour éviter le risque d'une réaction chimique violente.
- Rincer les flacons à l'eau distillée 3 fois.
- Annoter les flacons avant de faire les prélèvements.

Préparation des échantillons d'eau

- Rincer les flacons dans l'eau des bacs 3 fois. La manipulation des flacons doit se faire avec des gants sans poudre pour éviter toute contamination.
- Après rinçage, faire les prélèvements d'eau.
- Noter sur les flacons les codes de la manière suivante :
E0VA1 ou EF0VA1 (Eau ou Eau Filtrée à T0 Vase avec Agitation n°1)
E0VSA1 ou E0SV1 (Eau à T0 Vase Sans Agitation n°1 ou Eau à T0 Sans Vase n°1)

Filtration des échantillons d'eau

- L'unité de filtration est à nettoyer à l'acide à 10 %.
- Rincer le matériel à l'eau distillée
- Utiliser un filtre de 0,22 µm.
- Filtrer 10 ml de l'échantillon afin de rincer le filtre.
- Jeter le filtrat
- Filtrer 10 ml de l'échantillon afin de rincer l'unité de filtration (partie inférieure)
- Jeter le filtrat et renouveler cette étape deux fois
- Filtrer le reste de l'échantillon
- Utiliser une partie du filtrat obtenu pour rincer le flacon dans lequel sera stocké l'échantillon (rinçage a effectué 3 fois)
- Verser ensuite le reste du filtrat dans le flacon rigoureusement annoté.

Protocole prélèvement ALGUES

Préparer 9 sacs de congélation en inscrivant le nom du projet, le code du bac et la date.
Avant de les peser, chaque lot d'ulves doit être nettoyé à l'eau de mer de toute vase ou hydrobie.
De manière à rendre plus efficace le tri et le nettoyage des ulves, utiliser 3 bassines remplies d'eau de mer.

Une fois nettoyé, chaque lot doit être pressé à la main de manière assez forte jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gouttes (la quantité d'ulves à prendre doit pouvoir être contenue dans la paume de la main et bien presser 3 fois chaque boulette). Réaliser ensuite la pesée.

Un autre tri et nettoyage des lots d'algues est nécessaire pour les préparer pour l'analyse de laboratoire. Chaque lot d'ulves doit être rincé dans de l'eau distillée (pas plus de 15 secondes). Presser les algues avant de les mettre dans les sacs correspondants. Pour l'analyse, il faut minimum 12 g d'ulves. Fermer le sac et congeler à -20 °C.

Ces sacs seront lyophilisés avant d'être envoyés au laboratoire pour analyse. Le poids sec après lyophilisation devra être également noté.

Ce protocole est également à suivre pour les échantillons d'algues prélevées dans le milieu qui seront directement analysés pour connaître le quota initial en azote et phosphore.

Protocole prélèvement SEDIMENT

Préparation des échantillons de vase en début d'expérimentation

Afin de caractériser le sédiment en début d'expérimentation, un septième prélèvement de vase du milieu a été mis dans un bac supplémentaire.

Sur ce prélèvement de vase, 9 échantillons sont à réaliser de la manière suivante :

- 3 prélèvements sur toute la colonne du sédiment (un seul échantillon sera utilisé pour l'analyse granulométrique) : VSI1, VSI2, VSI3 (Vase Supérieure Inférieure)
- 3 prélèvements sur 2-3 cm de la couche supérieure : VS1, VS2, VS3 (Vase couche Supérieure)
- 3 prélèvements sur 2-3 cm de la couche inférieure : VI1, VI2, VI3 (Vase couche Inférieure)

Pour réaliser les 6 derniers échantillons, il faut prélever de la vase sur toute la hauteur et séparer ensuite à l'aide d'un couteau les deux couches (supérieure et inférieure).

Pour chaque échantillon de vase, le poids frais minimum doit être de 265 g pour obtenir un poids sec minimum de 120 g (poids demandé par le laboratoire d'analyses).

Placer les 9 échantillons sur des barquettes en alu et mettre à l'étuve plus de 24 h à 50°C.

Après séchage, conserver chaque échantillon dans un flacon nettoyé au préalable dans une solution acide à 10 % et rincé à l'eau distillée.

Préparation des échantillons de vase en fin d'expérimentation

Avant d'effectuer les prélèvements de vase, pomper l'eau des 6 bacs contenant le sédiment.

Par bac, 3 échantillons de vase sont à réaliser de la manière suivante :

- Un prélèvement sur toute la colonne de sédiment
- Un prélèvement sur 2-3 cm de la couche supérieure
- Un prélèvement sur 2-3 cm de la couche inférieure

Placer les 18 échantillons sur des barquettes en alu et mettre à l'étuve plus de 24 h à 50°C.

Après séchage, conserver chaque échantillon dans un flacon nettoyé au préalable dans une solution acide à 10 % et rincé à l'eau distillée.

Annexe 3 Evolution saisonnière de l'état du dispositif expérimental *in situ*

Date et observations	Photo du dispositif <i>in situ</i>
7 juillet 2016 Fin de l'expérience pour 1H et 1B et début d'expérience pour les 6 cages.	
21 juillet 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages.	
26 juillet 2016 Suivi de l'expérience et enlèvement des algues recouvrant les cages.	
3 août 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages. Enlèvement des algues recouvrant les cages.	
10 août 2016 Suivi de l'expérience.	
18 août 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages. Enlèvement des algues recouvrant les cages.	

24 août 2016 Suivi de l'expérience et enlèvement des algues recouvrant les cages.	
31 août 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages. Enlèvement des algues recouvrant les cages.	
8 septembre 2016 Suivi de l'expérience.	
15 septembre 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages. Début de fouling sur les cages.	
22 septembre 2016 Suivi de l'expérience. Nettoyage difficile de la paroi extérieure des cages subissant du fouling.	
28 septembre 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages. Fouling présent sur les cages.	

7 octobre 2016 Suivi de l'expérience. Fouling de plus en plus important sur les cages entraînant plus d'obscurité dans les cages.	
14 octobre 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages. Enlèvement des algues recouvrant les cages. Fouling très important.	
20 octobre 2016 Suivi de l'expérience. Fouling très important.	
27 octobre 2016 Fin et début d'expérience pour les 6 cages. Fouling très important entraînant de l'obscurité à l'intérieur de toutes les cages.	

Annexe 4 Evolution saisonnière de l'état des algues et des cages











		10 Août 2016		18 Août 2016	
1 B					
					
2 B					
					







8 Septembre 2016

15 Septembre 2016

1 B



2 B



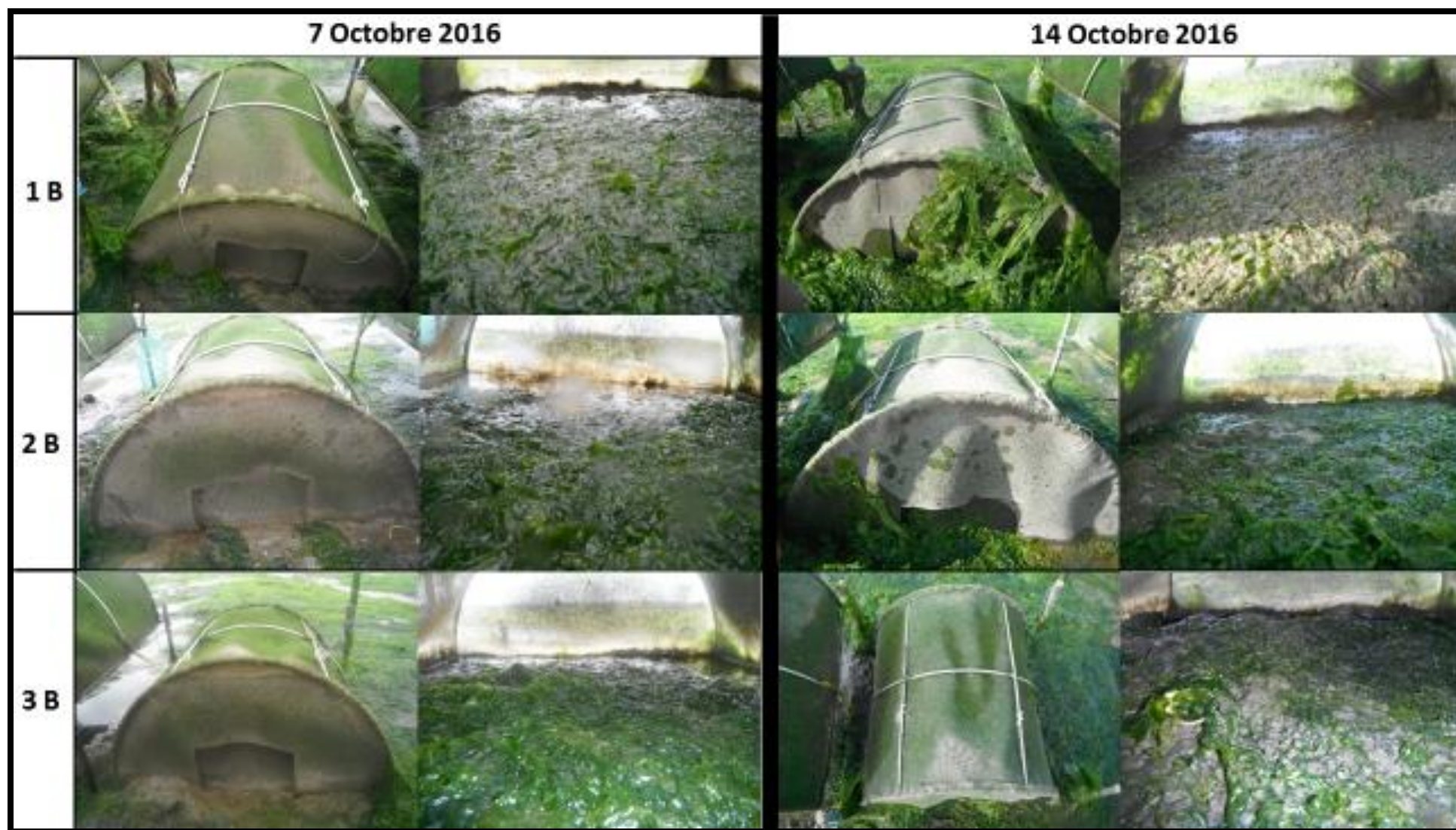
3 B

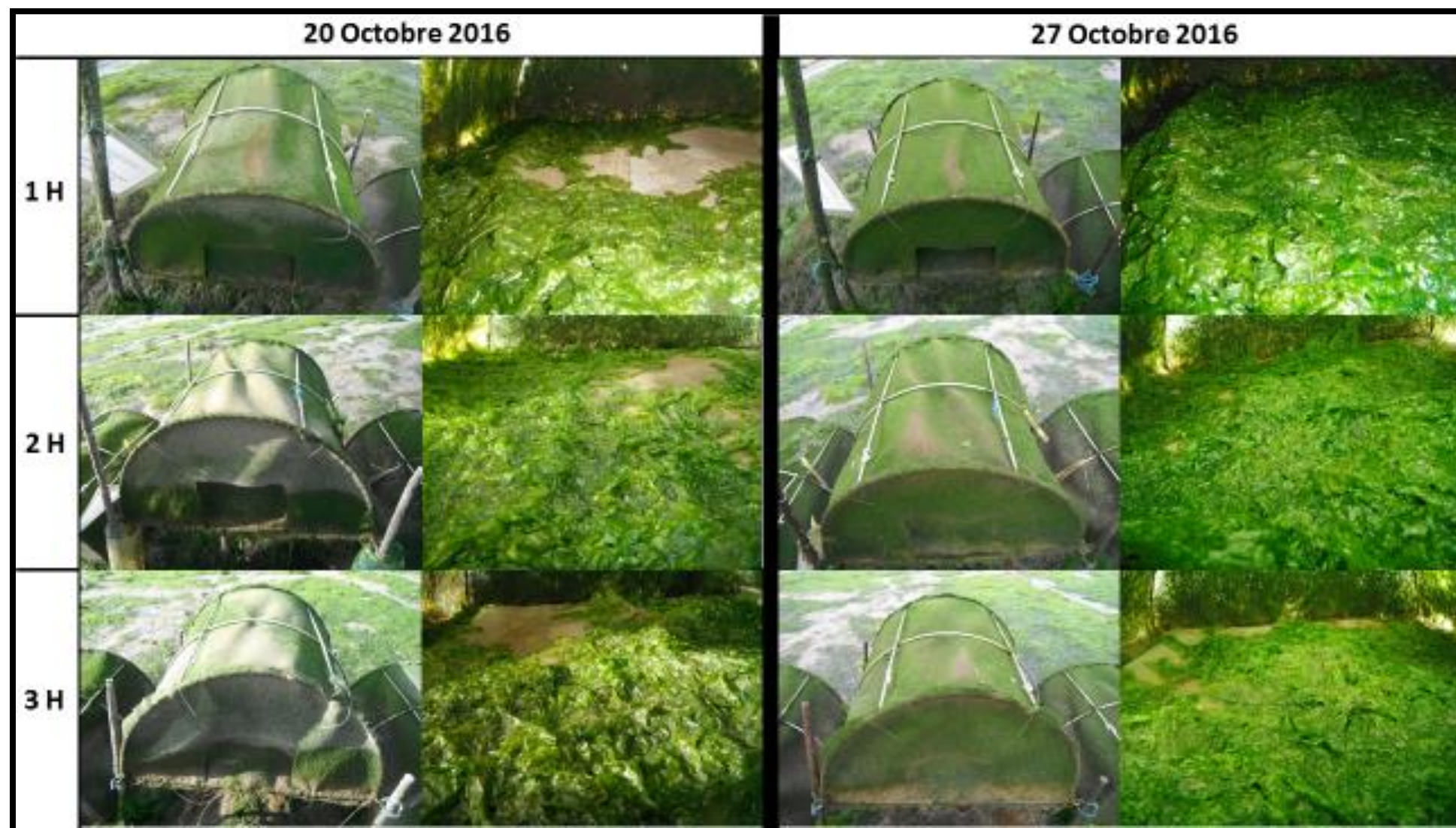






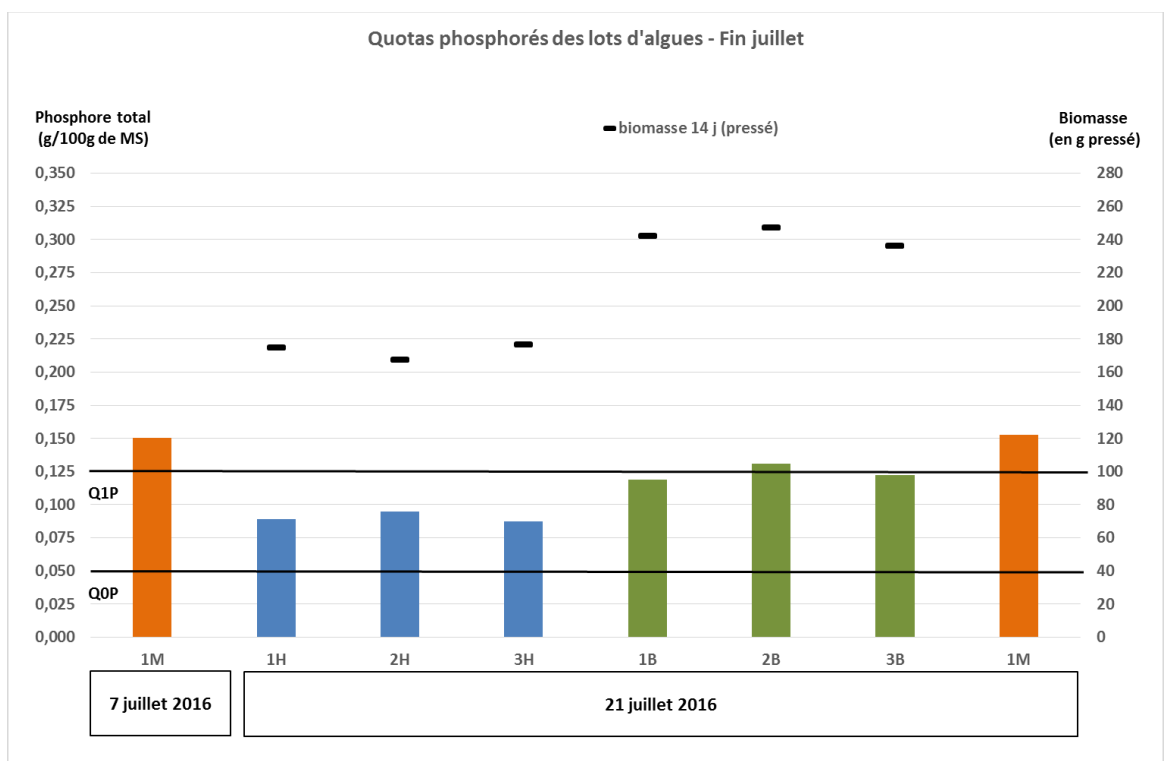
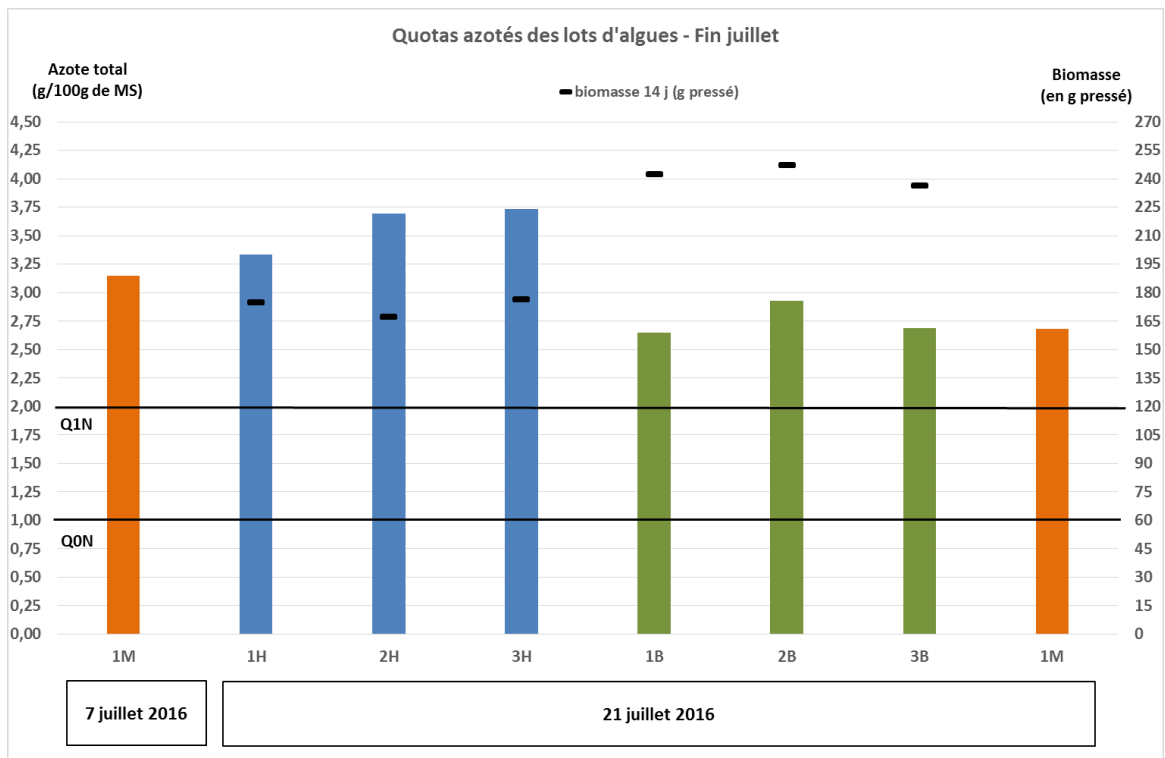


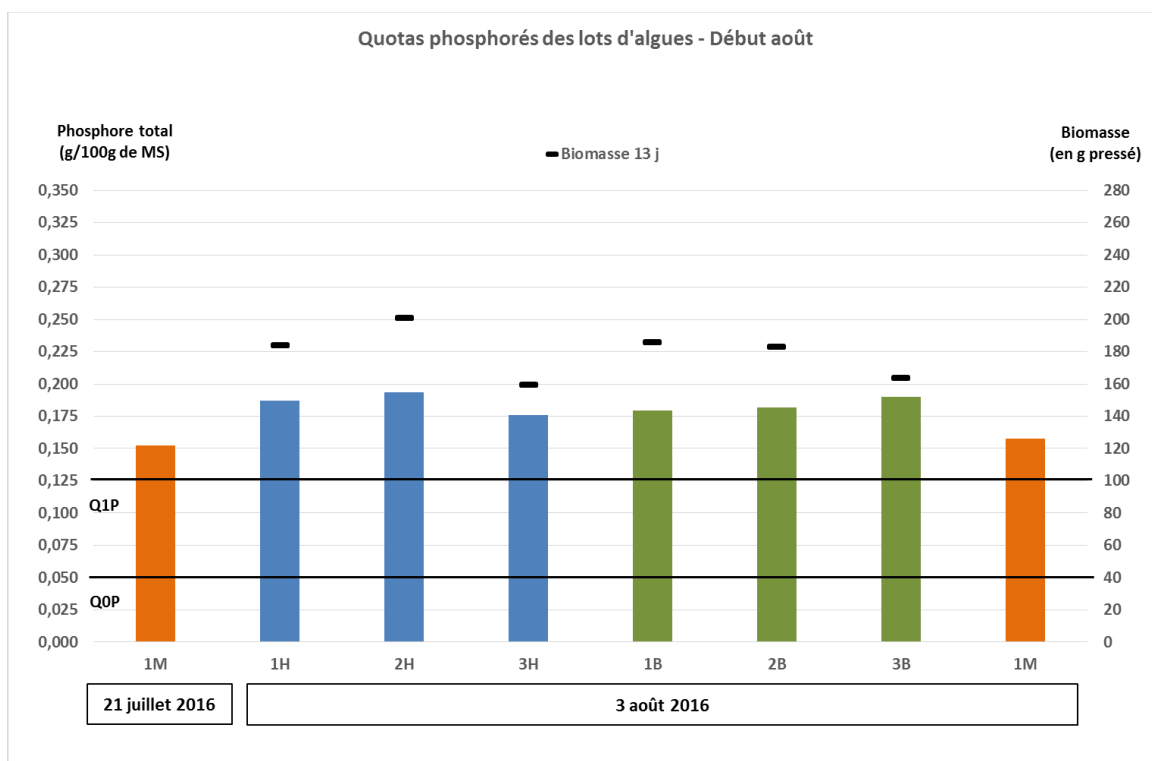
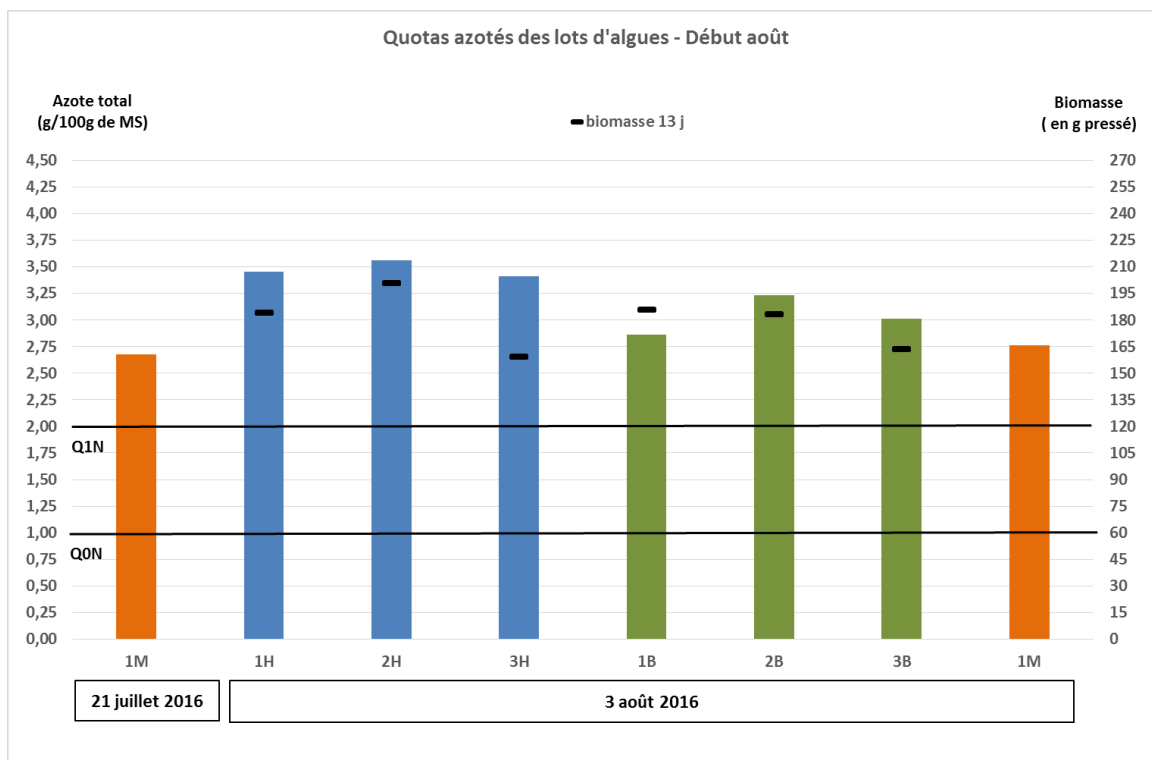


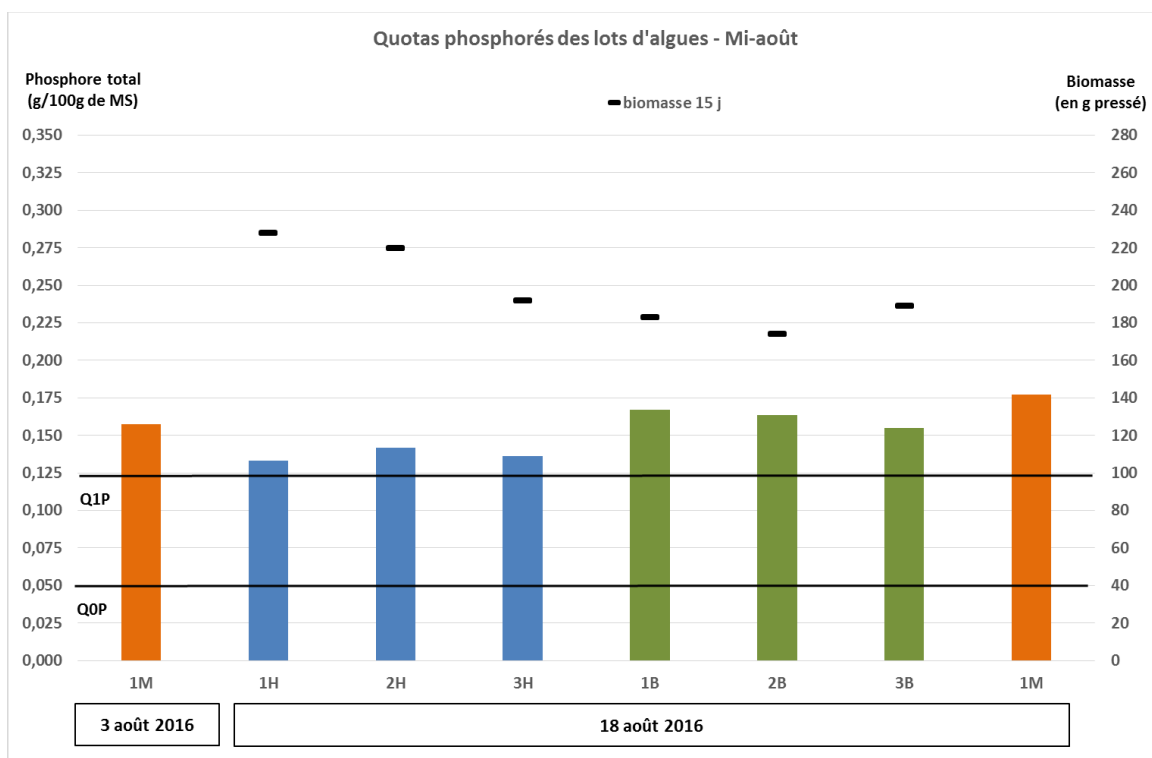
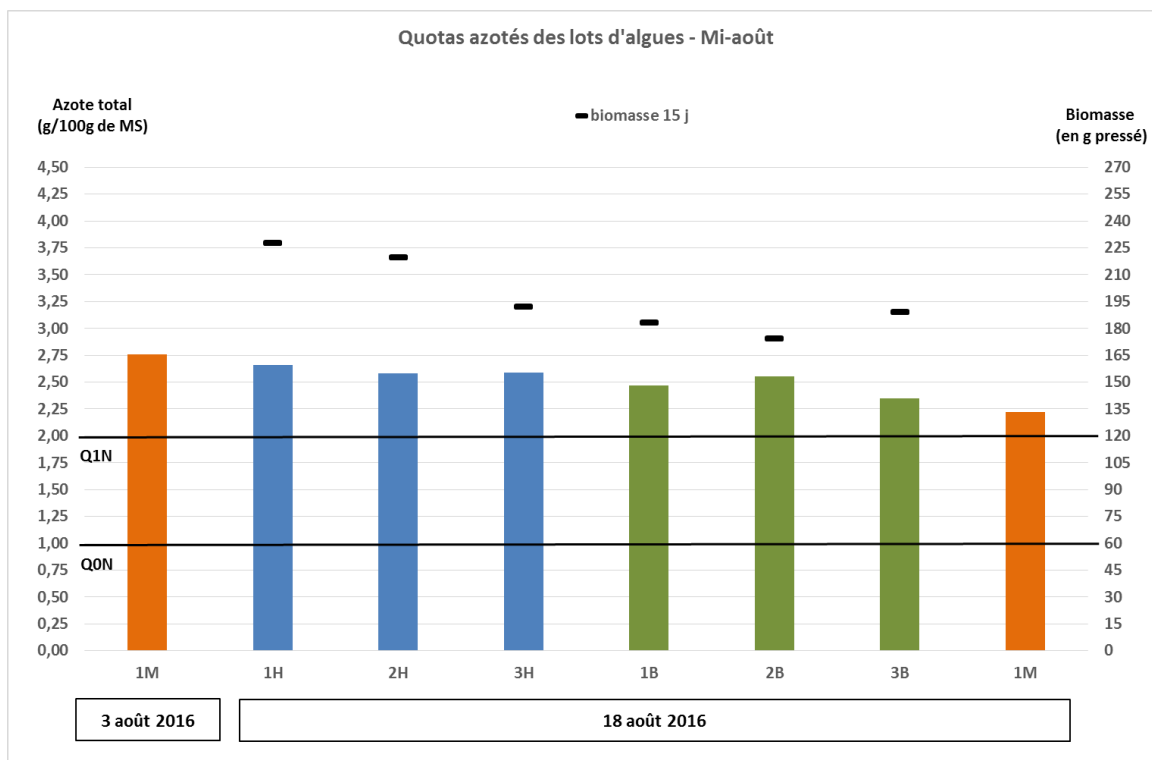


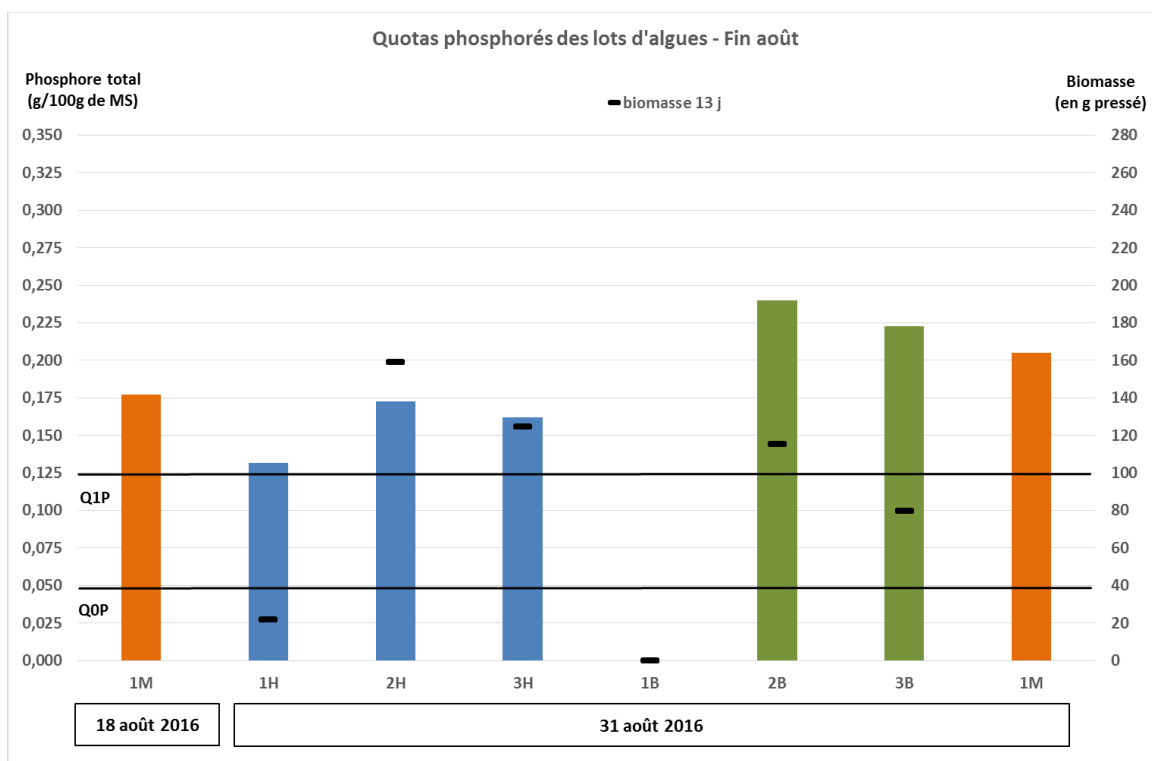
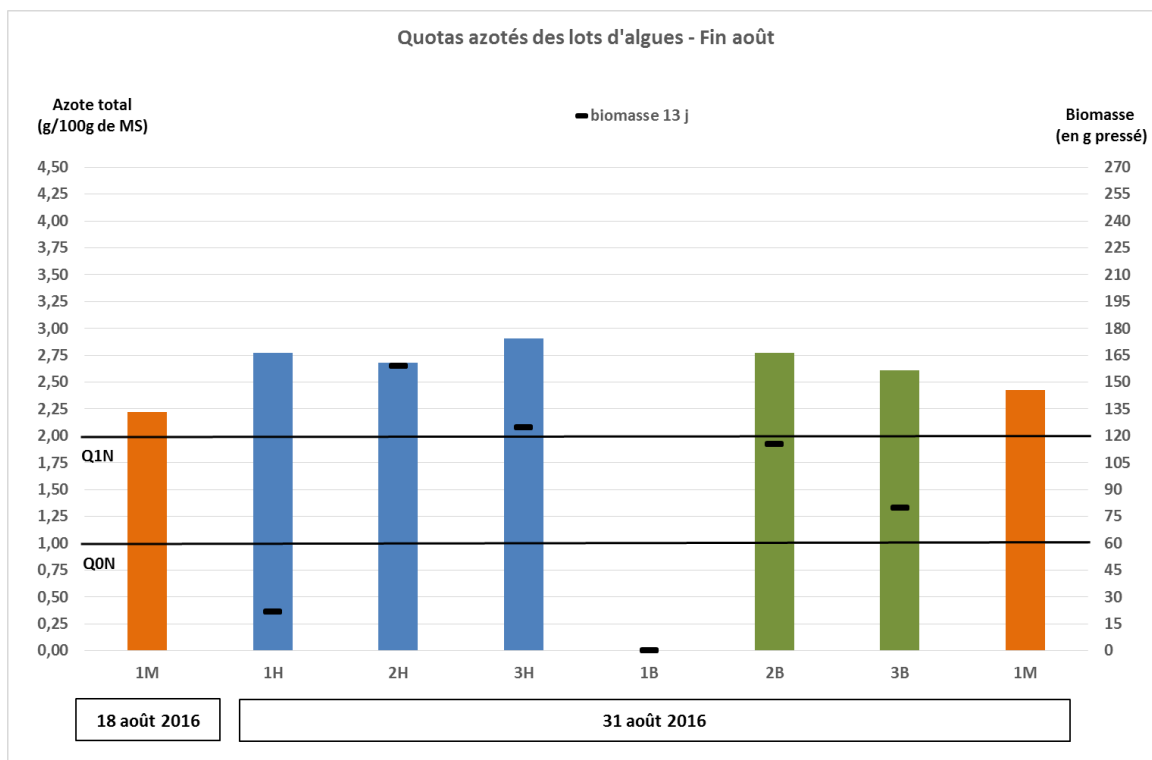


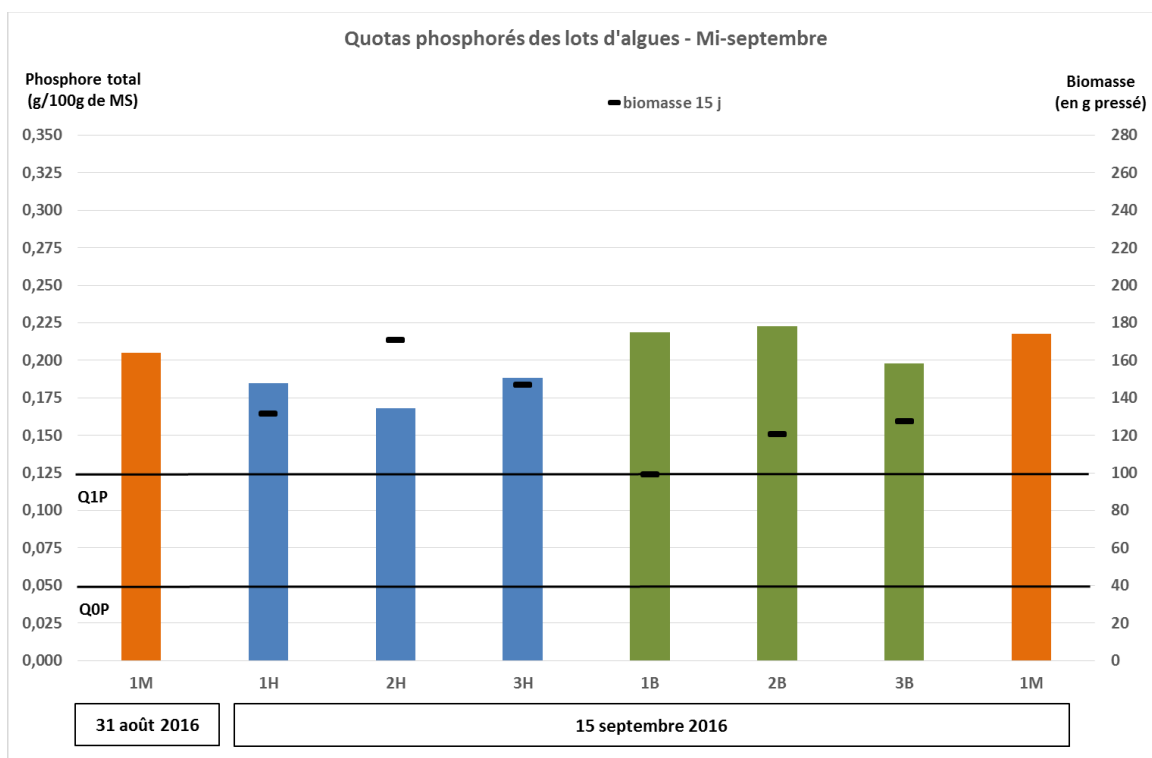
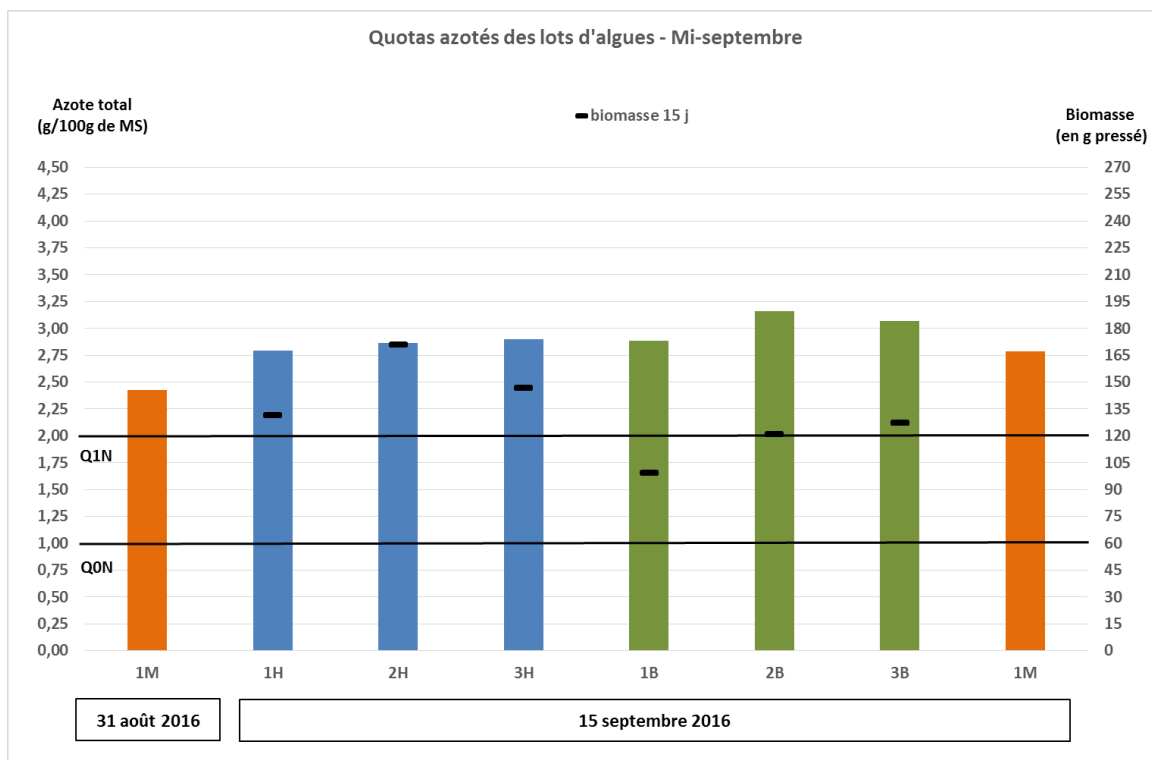
**Annexe 5 Biomasses et Quotas azotés et phosphorés
de chaque triplicat d'ulves par campagne de
prélèvement *in situ***

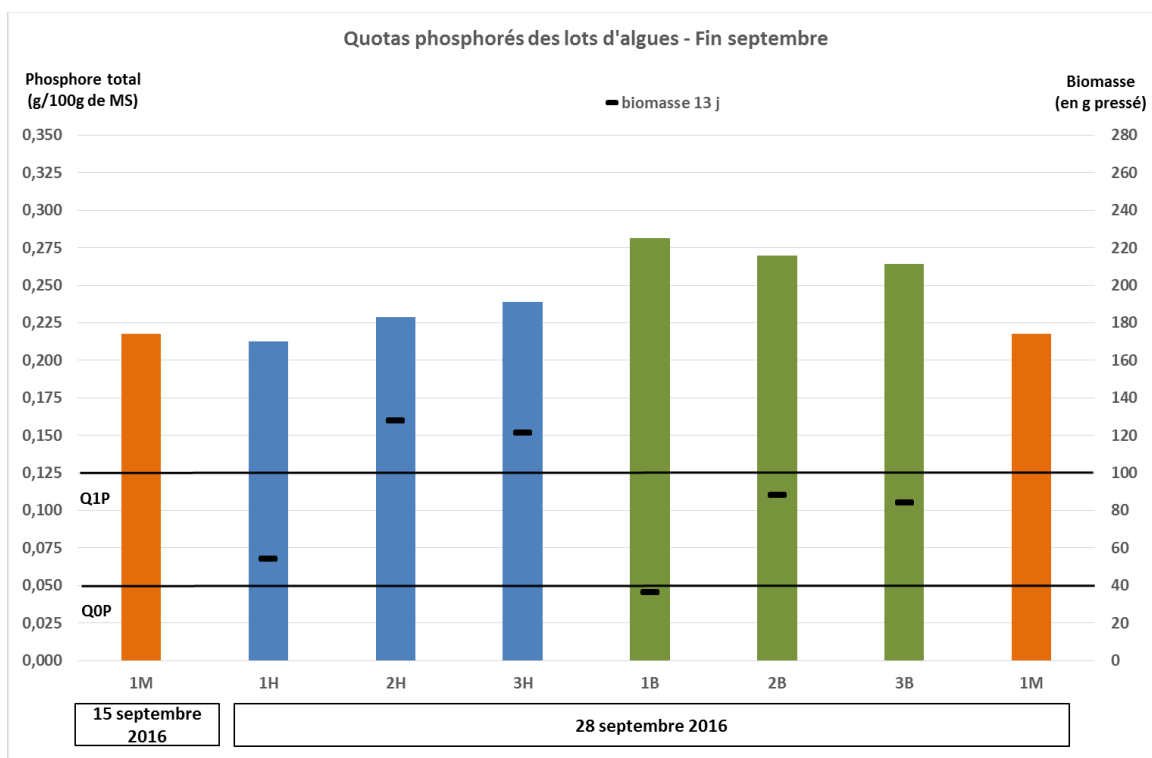
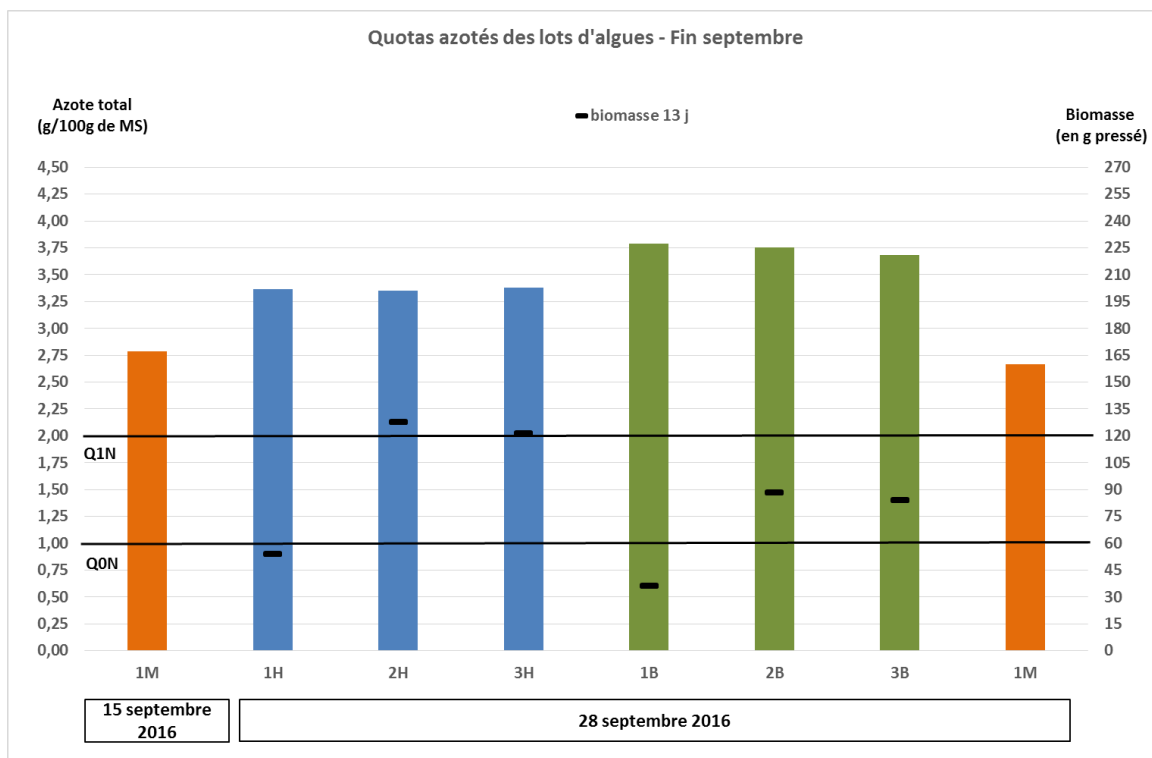


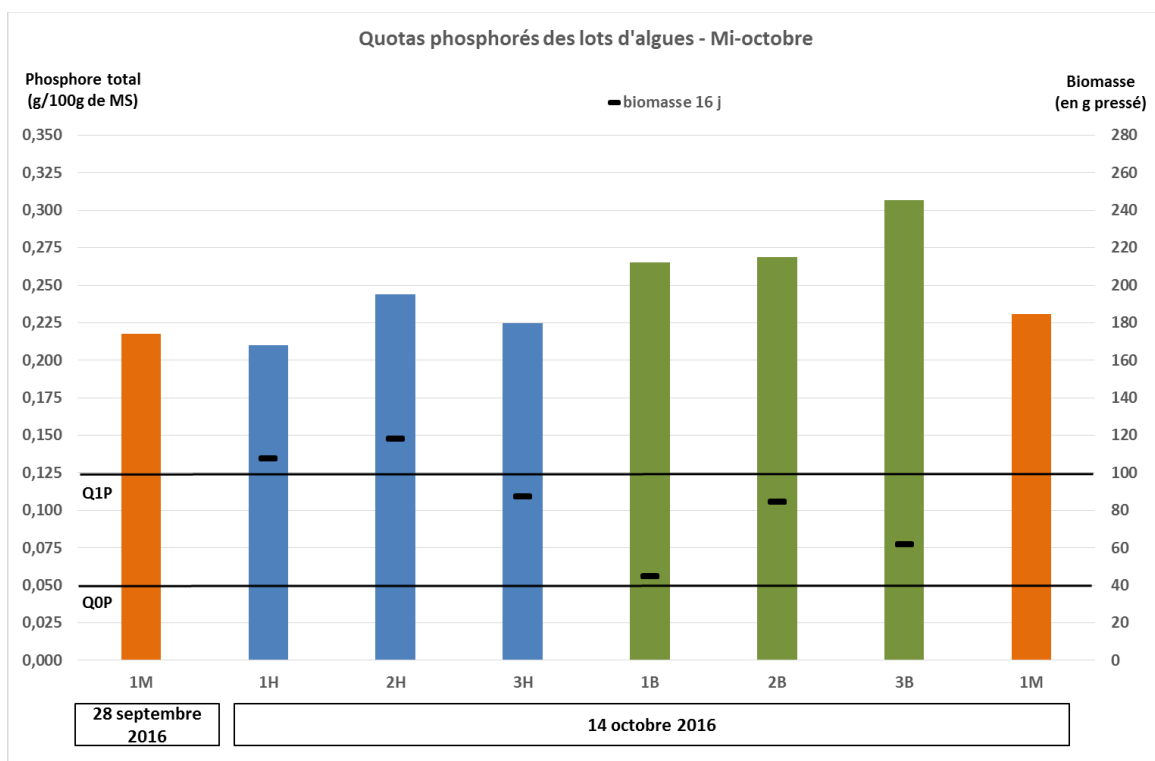
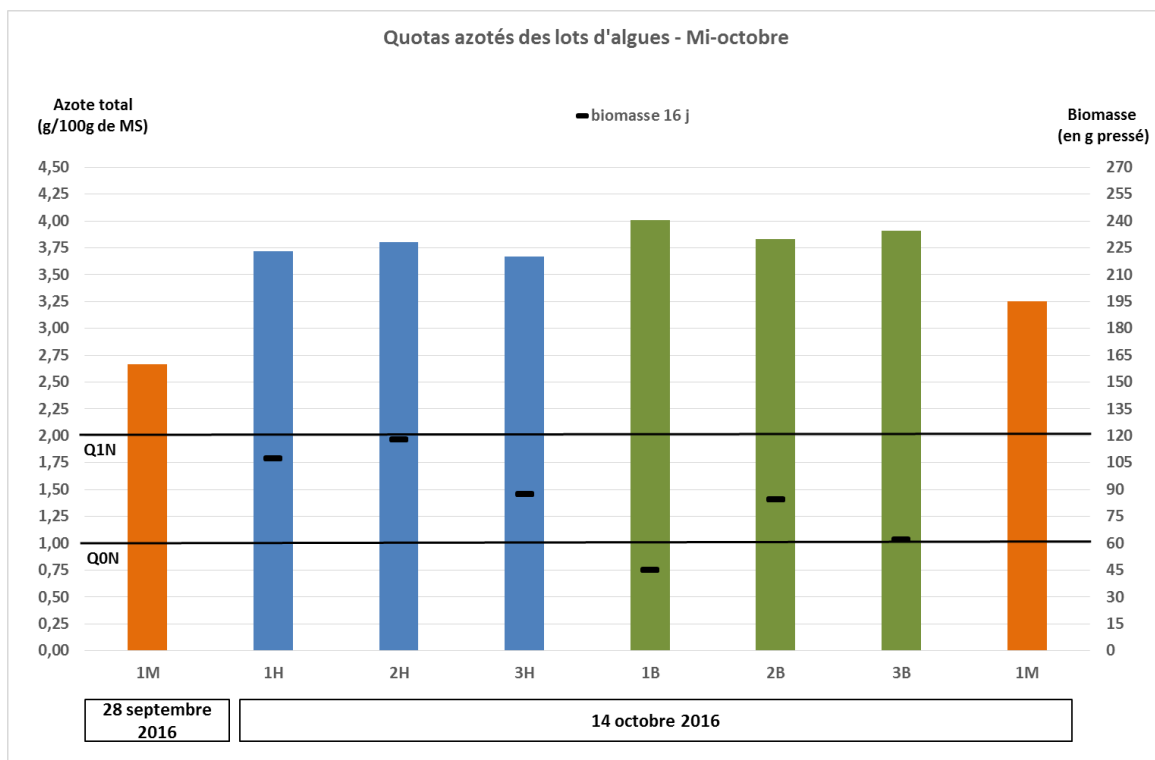


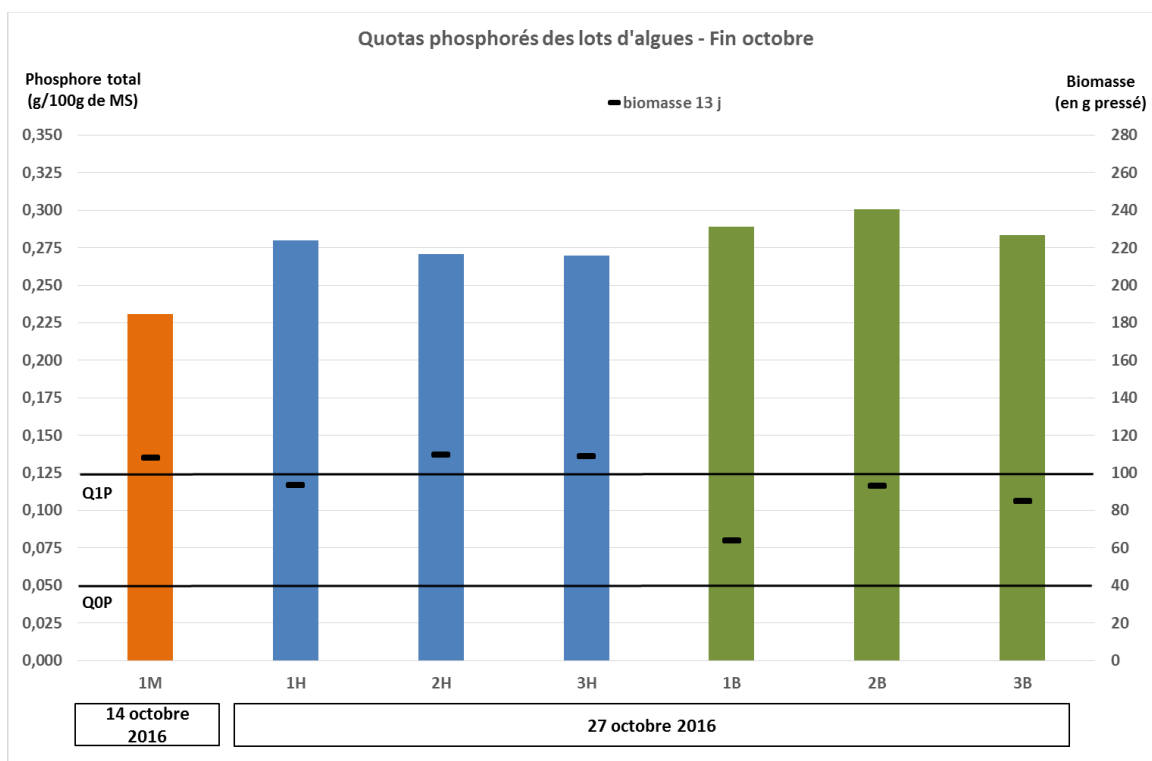
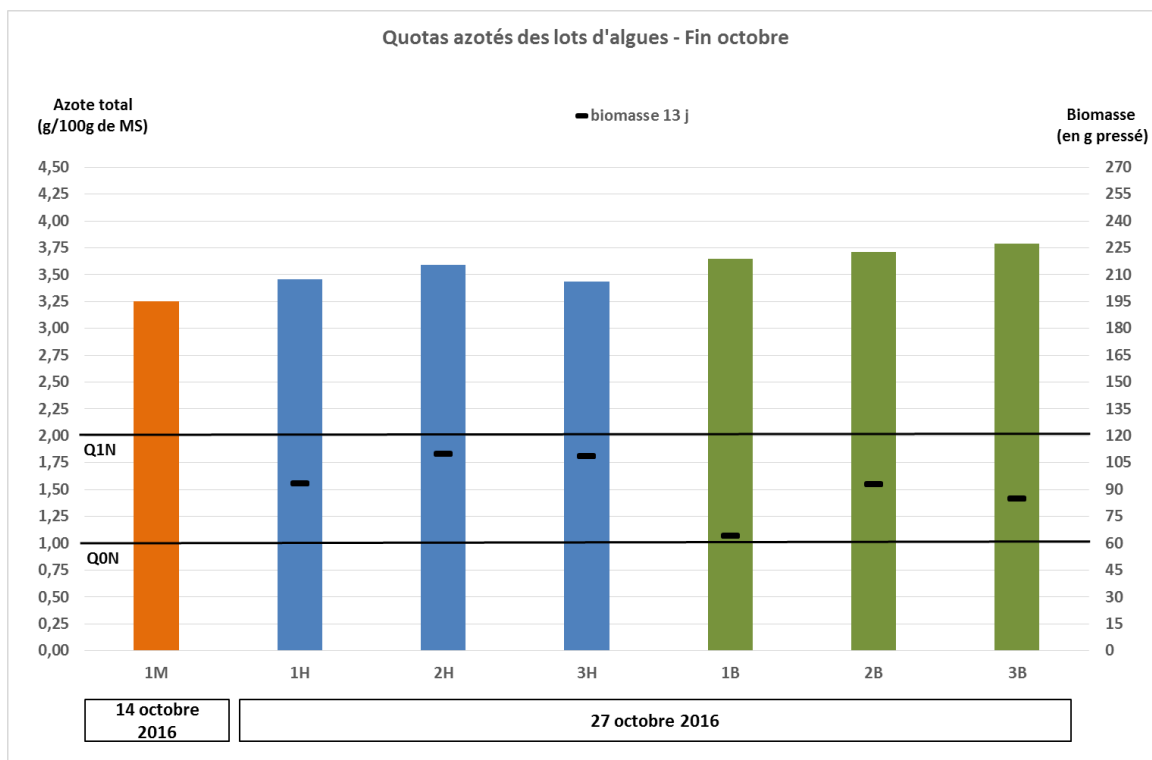




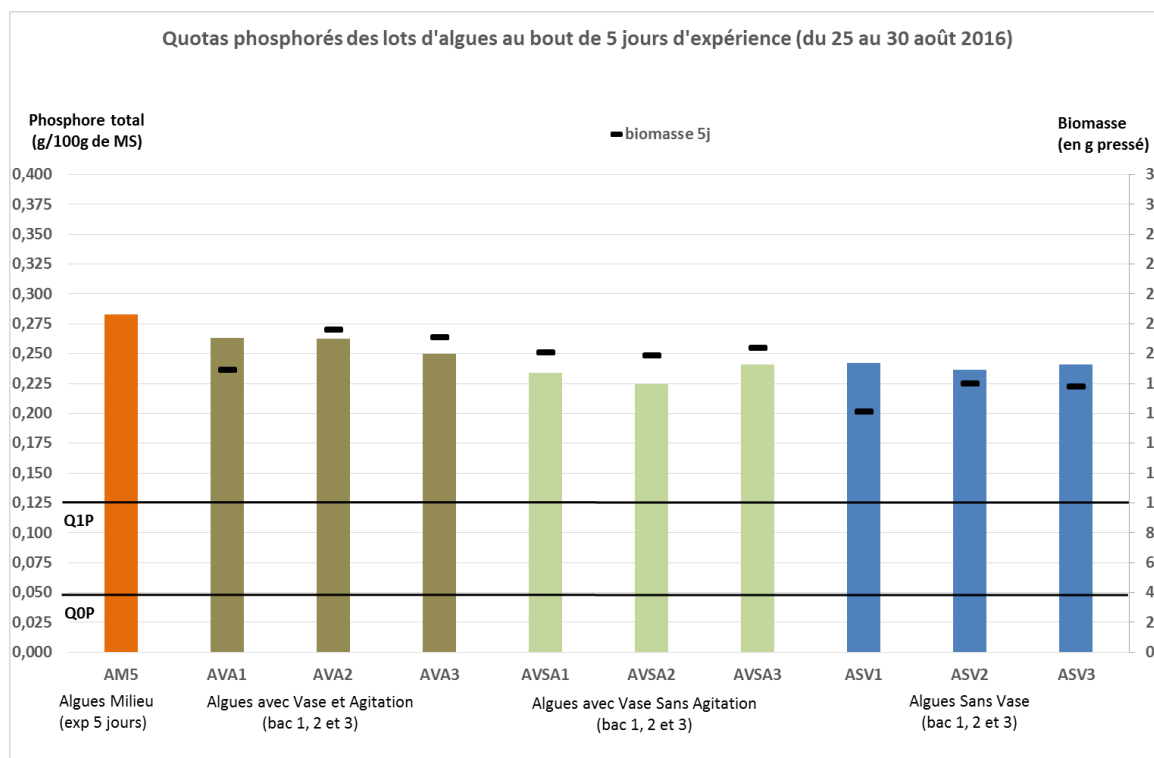
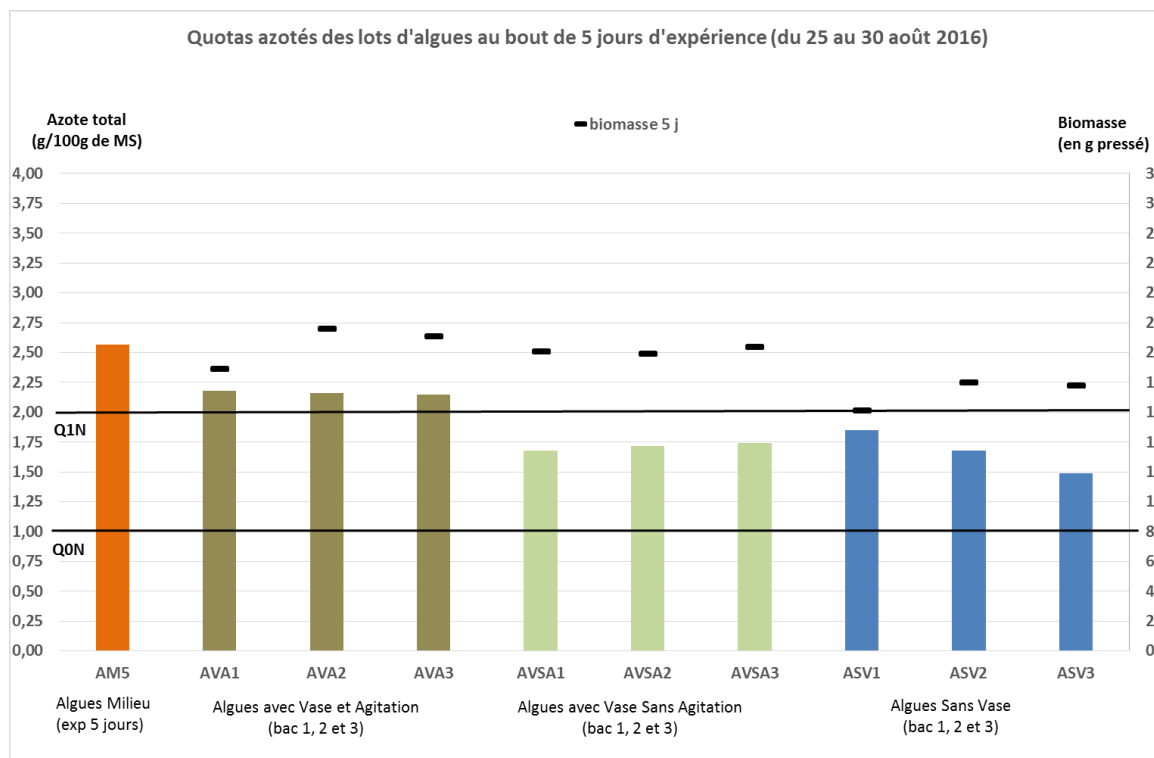


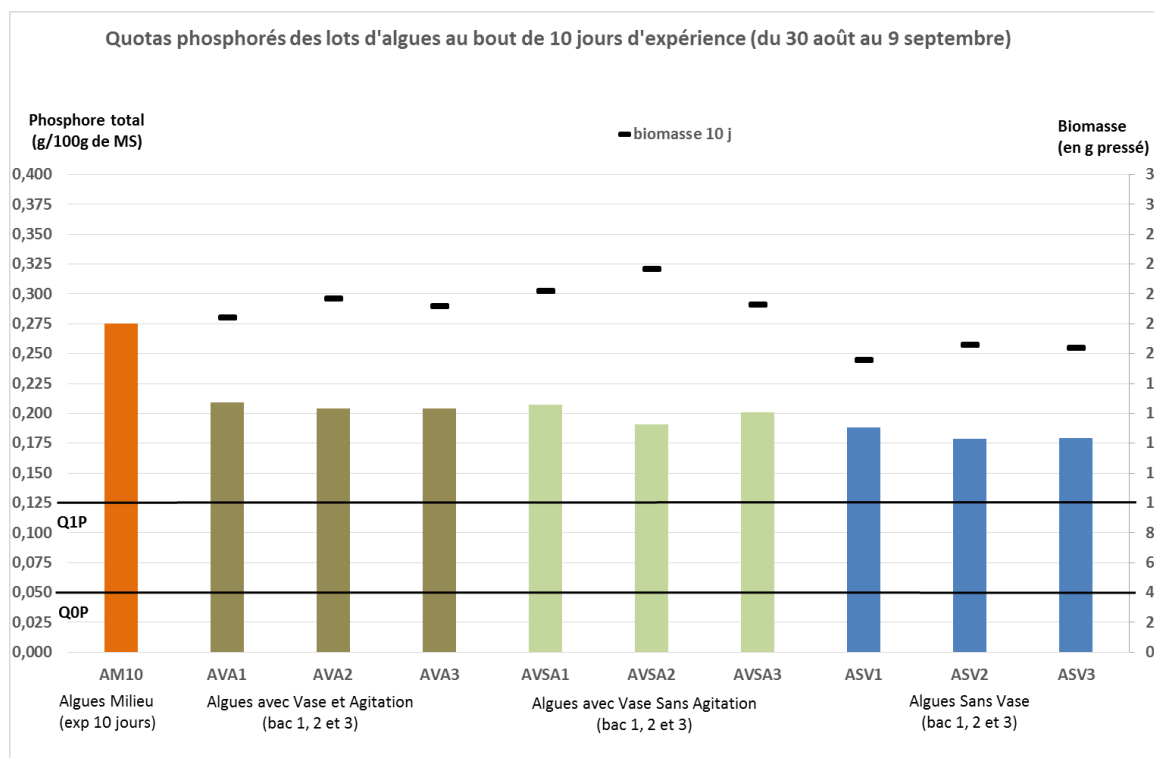
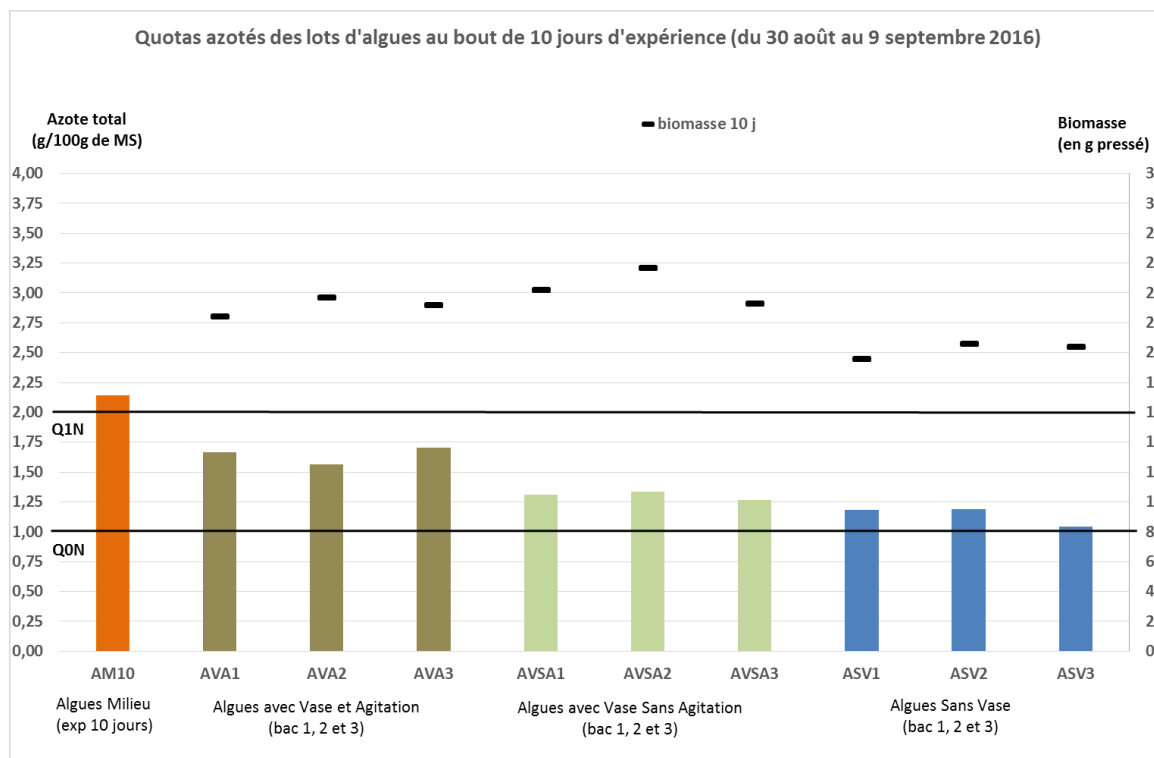


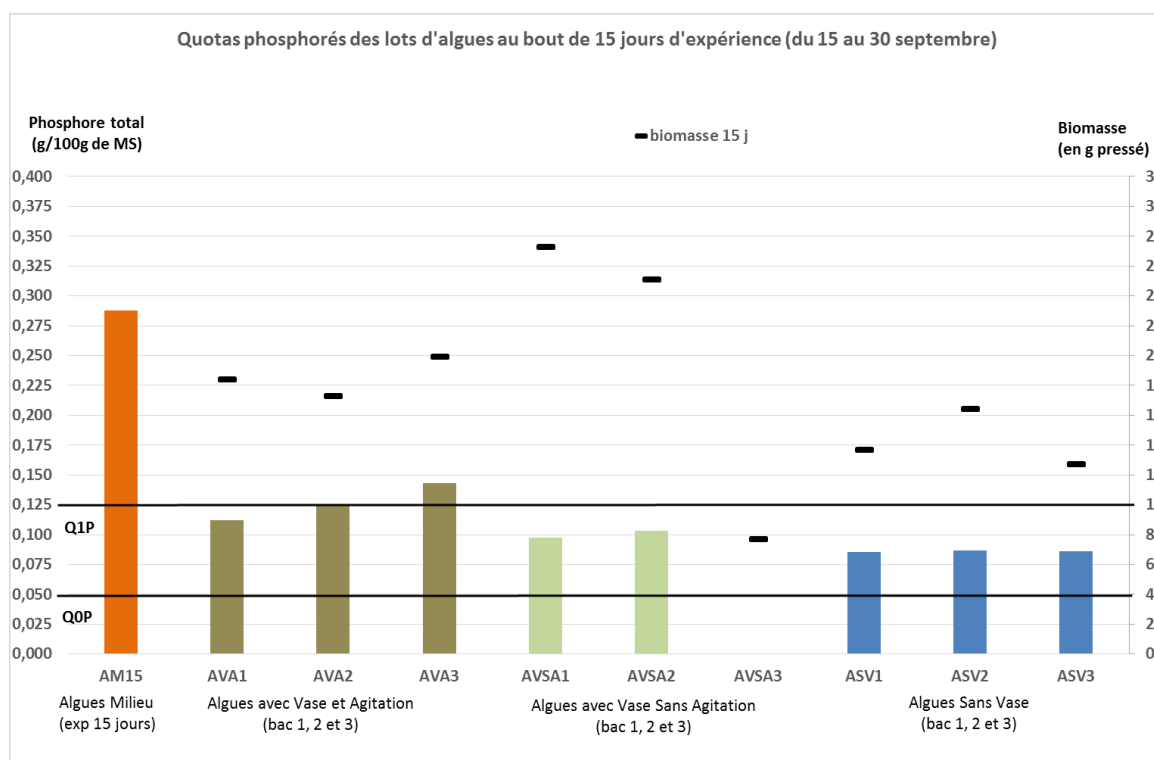
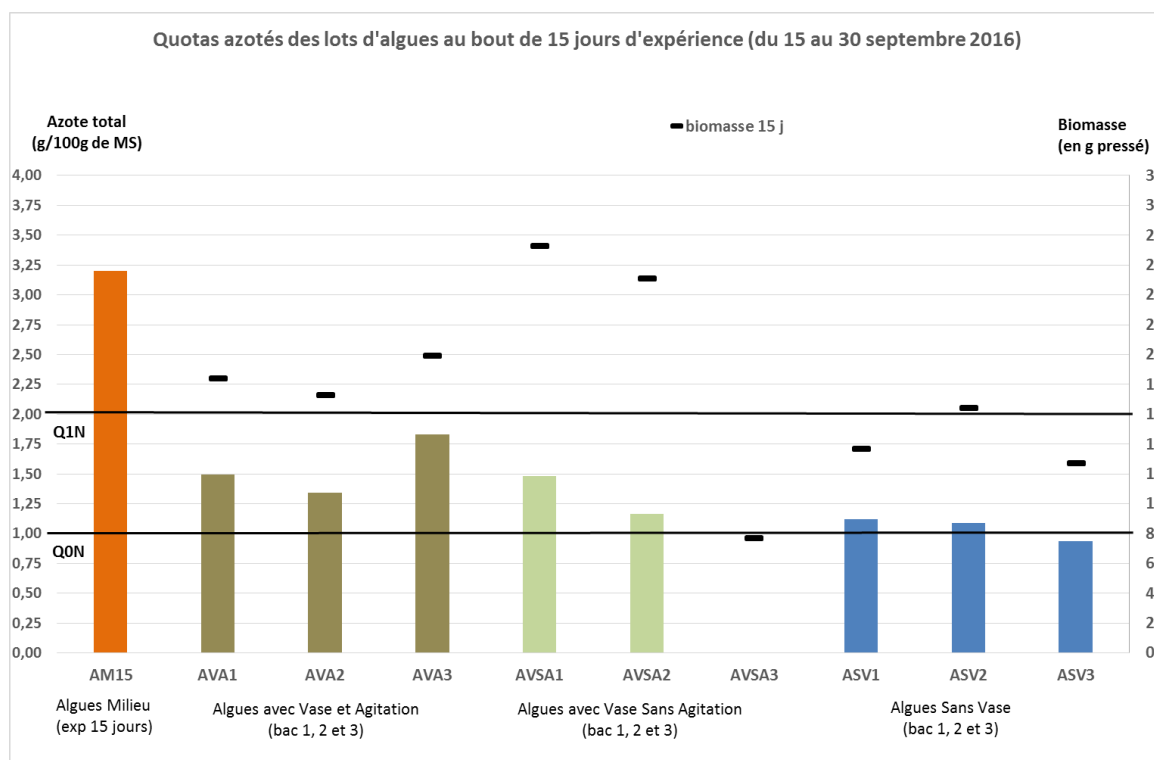




**Annexe 6 Biomasses et Quotas azotés et phosphorés
de chaque triplicat d'ulves au bout de 5, 10 et 15 jours
d'expérience (laboratoire CEVA)**







Annexe 7 **Données granulométriques de la vase**

InVivo Labs	Granulométrie de poudres				Date d'analyse: 18/10/2016
Réf échantillon: 16SA065087 Usine:			Tamiseur: Retsch AS 200 digit Méthode: à sec		
Date de prélèvement: Refus sur chaque tamis			Norme tamis: DIN/ISO 3310-1		
Lieu de prélèvement:			Dimension-forme tamis: 200 mm circulaire		
Durée de tamisage: 10 MIN			Fond du tamis: tissus métallique		
Masse initiale: 100g			Ouvertures: carrées		
Dimensions des particules: d	Refus sur chaque tamis		Ouverture nominale de maille	Refus cumulés	Passants cumulés
	Mesure	Total			
µm	g	g %	µm	%	%
d>4000	47.2	47.2	4000	47.2	52.8
4000>d>3150	4.6	4.6	3150	51.7	48.3
3150>d>2500	3.6	3.6	2500	55.3	44.7
2500>d>2000	3.2	3.2	2000	58.5	41.5
2000>d>1600	2.8	2.8	1600	61.3	38.7
1600>d>1250	2.4	2.4	1250	63.7	36.3
1250>d>1000	2.0	2.0	1000	65.7	34.3
1000>d>800	1.5	1.5	800	67.2	32.8
800>d>630	2.0	2.0	630	69.2	30.8
630>d>500	1.7	1.7	500	70.9	29.1
500>d>400	1.7	1.7	400	72.6	27.4
400>d>315	1.8	1.8	315	74.4	25.6
315>d>250	1.9	1.9	250	76.3	23.7
250>d>200	1.4	1.4	200	77.7	22.3
200>d>160	1.5	1.5	160	79.2	20.8
160>d>125	1.7	1.7	125	80.9	19.1
125>d>100	1.5	1.5	100	82.4	17.6
100>d>0	17.6	17.6	0	100.0	0.0
TOTAL	100.0	100.0			

D50= 1272.7 µm

Sg= 4.79

68% de la masse des particules ont un diamètre compris entre
265.8 µm et 6093.3 µm

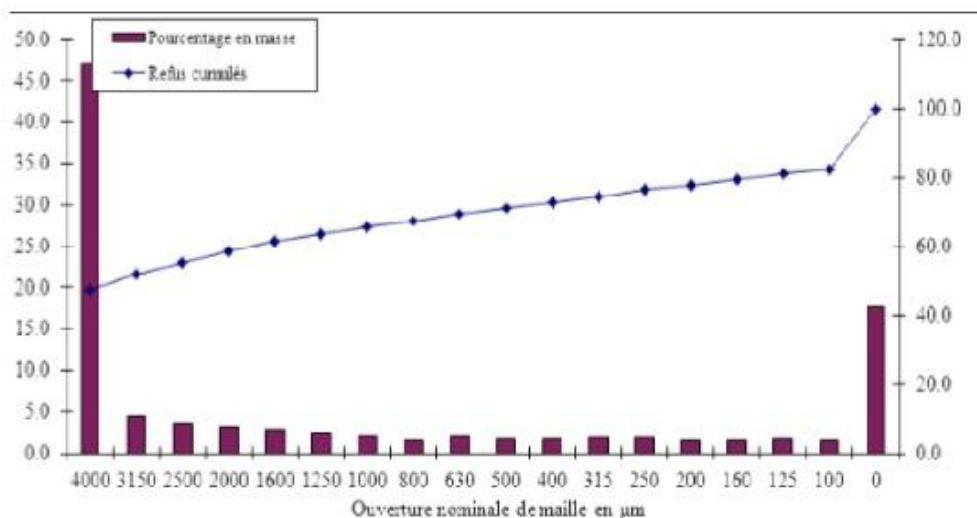


Figure 31: Granulométrie d'un échantillon de vase prélevé sur la vasière du LEDANO en début d'expérimentation labo

InVivo Labs	Granulométrie de poudres				Date d'analyse: 1/12/2016
Réf échantillon: 16SA073031 Usine: Date de prélèvement: Refus sur chaque tamis Lieu de prélèvement: Durée de tamisage: 5 min Masse initiale: 100g			Tamiseur: Retsch AS 200 digit Méthode: à sec Norme tamis: DIN/ISO 3310-1 Dimension-forme tamis: 200 mm circulaire Fond du tamis: tissus métallique Ouvertures: carrées		
Dimensions des particules: d	Refus sur chaque tamis		Ouverture nominale de maille	Refus cumulés	Passants cumulés
	Mesure	Total			
µm	g	g %	µm	%	%
d>4000	77.7	77.7	4000	77.7	22.3
4000>d>3150	4.2	4.2	3150	81.9	18.1
3150>d>2500	2.8	2.8	2500	84.7	15.3
2500>d>2000	2.0	2.0	2000	86.7	13.3
2000>d>1600	1.6	1.6	1600	88.3	11.7
1600>d>1250	1.1	1.1	1250	89.4	10.6
1250>d>1000	0.8	0.8	1000	90.2	9.8
1000>d>800	0.8	0.8	800	91.0	9.0
800>d>630	0.8	0.8	630	91.8	8.2
630>d>500	0.6	0.6	500	92.4	7.6
500>d>400	0.9	0.9	400	93.3	6.7
400>d>315	0.8	0.8	315	94.1	5.9
315>d>250	0.7	0.7	250	94.8	5.2
250>d>200	0.0	0.0	200	94.8	5.2
200>d>160	0.0	0.0	160	94.8	5.2
160>d>125	0.6	0.6	125	95.4	4.6
125>d>100	0.4	0.4	100	95.8	4.2
100>d>0	4.2	4.2	0	100.0	0.0
TOTAL	100.0	100.0			

D50= 3072.9 µm

Sg= 2.60

**68% de la masse des particules ont un diamètre compris entre
1180.2 µm et 8000.8 µm**

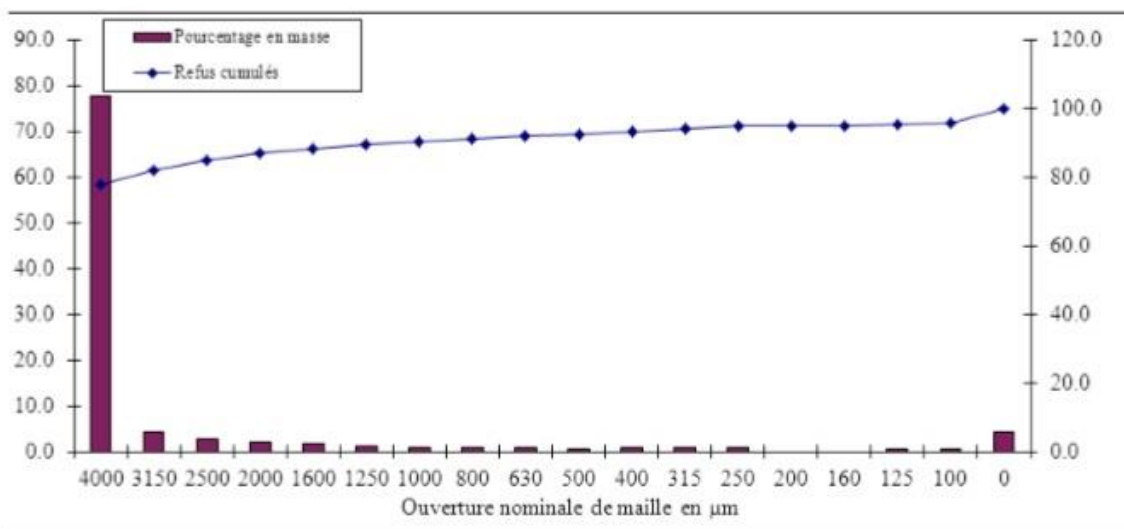


Figure 32: Granulométrie d'un échantillon de vase prélevé dans les bacs en fin d'expérimentation labo

5 Bibliographie

Asmus, R. M.; Sprung, M.; Asmus, H. (2000) Nutrient fluxes in intertidal communities of a South European lagoon (Ria Formosa) - similarities and differences with a northern Wadden Sea bay (Sylt-Romo Bay). In : *Hydrobiologia*, vol. 436, p. 217–235. DOI: 10.1023/a:1026542621512.

Barr, N. G. (2007) Aspects of nitrogen metabolism in the green alga *Ulva*; Developing an indicator of seawater nitrogen loading. University of Auckland.

Boyle, K. A.; Kamer, K.; Fong, P. (2004) Spatial and temporal patterns in sediment and water column nutrients in a eutrophic southern California estuary. In : *Estuaries*, vol. 27, n° 3, p. 378–388.

CEVA (2015) Contribution du sédiment aux cycles de l'azote et du phosphore en zone côtière - Impacts potentiels sur les marées vertes. Annexe au rapport 2014 du projet 1 du programme CIMAV. Avec la collaboration de Yannick Lerat, Nadège Rossi et Sylvain Ballu.

Dailer, M. L.; Smith, J. E.; Smith, C. M. (2012) Responses of bloom forming and non-bloom forming macroalgae to nutrient enrichment in Hawaii, USA. In : *Harmful Algae*, vol. 17, p. 111–125. En ligne : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156898831200073X>.

Gao, Li; Zhang, Luhua; Hou, Jinzhi; Wei, Quan; Fu, Feng; Shao, Hongbo (2013) Decomposition of macroalgal blooms influences phosphorus release from the sediments and implications for coastal restoration in Swan Lake, Shandong, China. In : *Ecological Engineering*, vol. 60, n° 0, p. 19–28. En ligne : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857413003066>.

Kamer, K.; Fong, P.; Kennison, R. L.; Schiff, K. (2004) The relative importance of sediment and water column supplies of nutrients to the growth and tissue nutrient content of the green macroalga *Enteromorpha intestinalis* along an estuarine resource gradient. In : *Aquatic Ecology*, vol. 38, n° 1, p. 45–56.

Perrot, T.; Rossi, N.; Ménesguen, A.; Dumas, F. (2014) Modelling green macroalgal blooms on the coasts of Brittany, France to enhance water quality management. In : *Journal of Marine Systems*, vol. 132, p. 38–53.

En ligne : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924796314000037>.