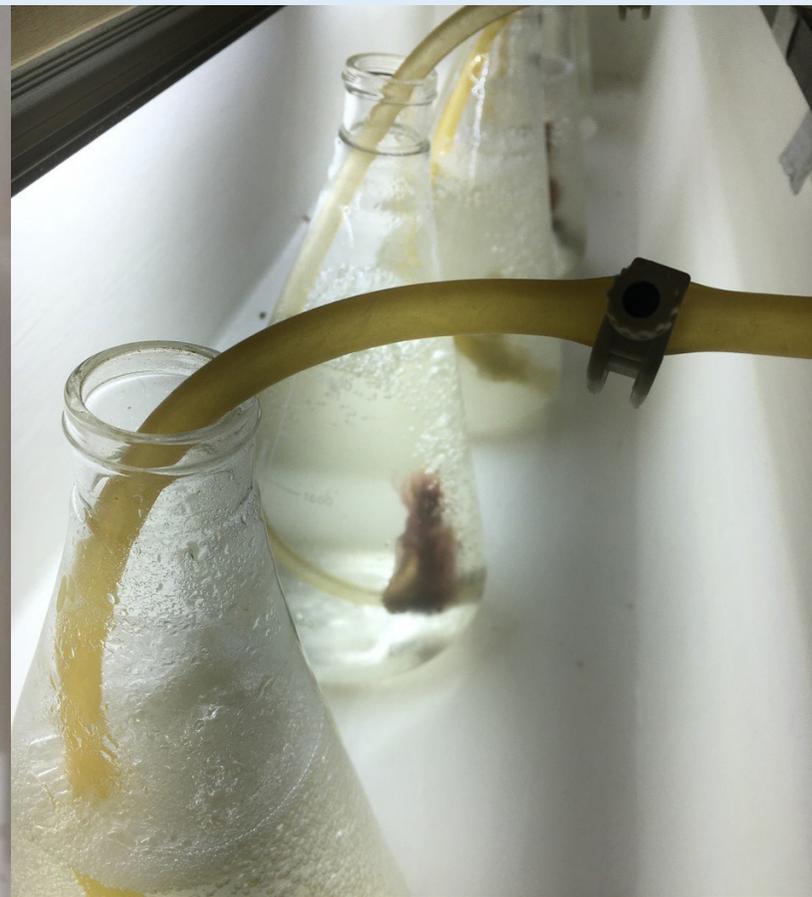




**merinov**

réinventer la mer

## Essais de culture de *Porphyra sp.* dans une perspective d'épuration des effluents de viviers de homard 2019-2020



### PAR

Isabelle Gendron-Lemieux  
Lisandre Gilmore-Solomon  
Éric Tamigneaux  
Anne Tremblay-Gratton

**Essais de culture de *Porphyra sp* dans une perspective d'épuration  
des effluents de viviers de homard 2019-2020**

**Rédaction**

Par ordre alphabétique

Isabelle Gendron-Lemieux  
Enseignante, Cégep de la Gaspésie et des Îles  
Chercheuse, Merinov  
[iglemieux@cegepgim.ca](mailto:iglemieux@cegepgim.ca)

Lisandre Gilmore-Solomon  
Enseignante, Cégep de la Gaspésie et des Îles  
Chercheuse, Merinov  
[lsolomon@cegepgim.ca](mailto:lsolomon@cegepgim.ca)

Éric Tamigneaux  
Enseignant, Cégep de la Gaspésie et des Îles  
Chercheur, Merinov  
[etamigneaux@cegepgim.ca](mailto:etamigneaux@cegepgim.ca)

Anne Tremblay-Gratton  
Professionnelle de recherche, Merinov  
[Anne.tremblay-gratton@merinov.ca](mailto:Anne.tremblay-gratton@merinov.ca)

**Collaboration**

La Renaissance des Îles

Ce projet a été réalisé grâce à l'appui  
financier de :



Ressources Aquatiques Québec, un regroupement  
stratégique financé par le Fonds de recherche du Québec  
Nature et Technologies, no 2020-RS4-265329

Avril 2021

© Merinov 2021 Tous droits réservés

## Table des matières

Résumé .....	6
1. Introduction .....	8
2. État des connaissances .....	9
3. Objectifs .....	12
3.1. Objectif 1.....	12
3.1.1. Cinétique d'absorption du $\text{NH}_4^+$ sur 24 h .....	12
3.1.2. Cinétique d'absorption du $\text{NH}_4^+$ sur 3 semaines .....	19
3.2. Objectif 2.....	26
3.2.1. Phénologie en Gaspésie .....	26
3.2.2. Coupes et observation au microscope.....	32
3.2.3. Conservation des frondes en bassins.....	36
3.2.4. Test de sporulation .....	38
3.2.5. Cinétique d'absorption de l'ammoniaque selon la méthode de conservation des algues.....	44
3.3. Objectif 3.....	44
3.3.1. Cinétique d'absorption de l'ammoniaque selon les types de supports d'algues .....	44
3.4. Objectif 4.....	50
3.4.1. Mettre le prototype de biofiltre le plus performant à l'échelle pilote et vérifier la cinétique d'absorption de l'ammoniaque excrétée par des homards maintenus dans un vivier commercial. ....	50
4. Conclusion générale.....	54
5. Recommandations et perspectives.....	57
6. Bibliographie .....	58
Annexe. Rapport <i>Les effets de la congélation de <i>Porphyra umbilicalis</i> sur sa capacité d'absorption d'ammoniaque et sur sa croissance</i> .....	61

## Liste des figures

Figure 1. A. Coupe transversale qui montre le caractère monostromatique de la fronde de <i>P. umbilicalis</i> (gross. 10 x 40). B. Vue frontale de la fronde de <i>P. umbilicalis</i> avec les cellules végétatives isodiamétriques contenant un chloroplaste en étoile, au centre de la fronde (gross. 10 x 40). .....	13
Figure 2. A. Coupe transversale qui montre le caractère distromatique de la fronde de <i>P. miniata</i> ou de <i>P. amplissima</i> (à valider) (gross. 10 x 40). B. Vue frontale de la même fronde avec les cellules végétatives au centre de la fronde (gross. 10 x 40). .....	13
Figure 3. A. Coupe transversale qui montre le caractère monostromatique de la fronde de <i>P. linearis</i> (à valider) (gross. 10 x 40). B. Vue frontale de la même fronde avec les cellules végétatives au centre de la fronde (gross. 10 x 40). <i>P. linearis</i> ne possède pas de spores neutres, contrairement à <i>P. umbilicalis</i> . .....	14
Figure 4. Concentration en ammoniacque totale ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) chez des algues rouges, <i>Porphyra</i> sp. et <i>Porphyra umbilicalis</i> exposées à une concentration initiale en ammoniacque de 50 $\mu\text{M}$ pendant 7 jours. ....	17
Figure 5. Concentration en ammoniacque totale ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) chez des algues rouges, <i>Porphyra</i> sp. et <i>Porphyra umbilicalis</i> exposées à une concentration initiale d'ammoniacque de 500 $\mu\text{M}$ pendant 7 jours. La ligne pointillée indique le seuil de concentration toxique à ne pas dépasser pour les homards (150 $\mu\text{M}$ ). ....	17
Figure 6. Taux de croissance (% MH j-1) pour une période de 24 h en fonction de l'espèce et de la concentration initiale théorique en ammoniacque dans le milieu de culture. ....	18
Figure 7. Changements dans la concentration d'ammoniacque ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) pour chacune des trois semaines d'expérience (3 x 6 jours consécutifs), pour le traitement 500 $\mu\text{M}$ et ses témoins. Les courbes en pointillé sont les témoins (sans algue). L'équation de régression est présente pour la semaine 1 (ligne rouge double) et la ligne noire indique le seuil de concentration toxique à ne pas dépasser pour les homards (150 $\mu\text{M}$ ). ....	22
Figure 8. Changements dans la concentration d'ammoniacque ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) pour chacune des trois semaines d'expérience (3 x 6 jours consécutifs), pour le traitement 150 $\mu\text{M}$ et ses témoins. Les courbes en pointillé sont les témoins (sans algue). L'équation de régression est présente pour la semaine 1 (ligne rouge double) et la ligne noire indique le seuil de concentration toxique à ne pas dépasser pour les homards (150 $\mu\text{M}$ ). ....	22
Figure 9. Taux de croissance moyen $\pm$ écart-type (% MH j-1) de <i>P. umbilicalis</i> en fonction des concentrations d'ammoniacque totale (500 $\mu\text{M}$ et 150 $\mu\text{M}$ ) dans le milieu de culture et taux de croissance dans le traitement témoin (sans ajout de nutriment) pour la semaine 1. ....	23
Figure 10. Changements du taux de croissance moyen $\pm$ écart-type (% MH j-1) de <i>P. umbilicalis</i> cultivée dans une solution 500 $\mu\text{M}$ en fonction du temps (semaine). Les lettres différentes entre les traitements indiquent une différence significative ( $p < 0.05$ ). ....	23
Figure 11. Changements du taux de croissance moyen $\pm$ écart-type (% MH j-1) de <i>P. umbilicalis</i> cultivée dans une solution 150 $\mu\text{M}$ en fonction du temps (semaine). ....	24
Figure 12. Changements du taux de croissance moyen $\pm$ écart-type (% MH j-1) du témoin de <i>P. umbilicalis</i> en fonction du temps (semaine). ....	24

- Figure 13. A. Frondes de *Porphyra umbilicalis* de couleur brun caramel avec ombilic plissé vert olive là où se trouve le crampon (flèche blanche). B. Fronde de forme plus allongée et d'une couleur rouge plus marquée, identifiée comme étant probablement *P. miniata*. C. Coupe transversale qui montre le caractère monostromatique de la fronde de *P. umbilicalis* (gross. 10 x 40). D. Coupe transversale dans la partie fertile d'une fronde qui montre des structures foncées qui pourraient être des cellules précurseurs de spores ou des spores (flèches noires) (gross. 10 x 40)..... 30
- Figure 14. A. Frondes de *Porphyra* sp. de 20-30 cm de long (flèches) sur un rocher dans le haut de l'étage infralittoral à Pabos (Chandler) le 7 juillet 2019 à marée basse (0,3 m au-dessus du zéro des cartes). B. Même endroit et même date, la fine bordure blanche à la marge de la fronde est bien visible (flèches noires). C. Frondes de *Porphyra* sp observées sur la face horizontale d'un bloc de pierre à l'intérieur de la marina de Chandler en août 2019 (flèches noires). D. Frondes de *Porphyra* sp observées sur la face verticale d'un bloc de pierre de la partie extérieure du brise-lames de la marina de Chandler en août 2019. .... 31
- Figure 15. A, B, C et D : Frondes de *Porphyra* sp (flèches noires) observées sur les blocs de pierre de la partie extérieure du brise-lames de la marina à Chandler le 8 avril 2020 à marée basse (0,1 m au-dessus du zéro des cartes)..... 32
- Figure 16. Observation de la surface des frondes de *P. umbilicalis* au microscope. A. Cellules rhizoïdes en forme de poire près du crampon (gross. 10 x 40). B, C et D. Cellules végétatives plus ou moins isodiamétriques, avec un chloroplaste en étoile au centre de la fronde (gross. 10 x 40). E. Cellules en tétrades vert pâle (flèche blanche) correspondant soit aux sporanges précurseurs de (neutro)spore en train de se différencier, soit à des spermatanges. Cellules brun sombre correspondant soit aux sporanges contenant des (neutro)spores, soit à des carposporanges (flèche noire) sous la marge de la fronde (gross. 10 x 40). F. (neutro)spores brunes (flèche noire) à la marge de la fronde (gross. 10 x 40)..... 34
- Figure 17. Observation au binoculaire de la surface des frondes de *P. umbilicalis* en septembre 2019. A. Zone fertile (flèches noires) avec des cellules plus sombres à la marge de la fronde (gross. 10 x 1,6). B. Grossissement de la zone fertile (gross. 10 x 4). C. Boursoufflure sombre (flèche noire) à l'extrémité d'une fronde (gross. 10 x 1,6). D. Grossissement de la boursoufflure (gross. 10 x 2,5). .... 35
- Figure 18. A. Bassins cylindriques utilisés pour le stockage des frondes de *P. umbilicalis*. B. Alimentation continue en eau de mer brute. C. Drain de surface avec grille. D. Injection d'air sous pression par le fond du bassin. .... 37
- Figure 19. Observations de la surface des frondes de *P. umbilicalis* au microscope. Expulsion des (neutro) spores (flèches noires) à partir d'une zone déjà partiellement vidée de ses spores le 1<sup>er</sup> octobre 2019 (A) et à partir d'une zone fertile intacte, le 25 novembre 2019 (B) (gross. 10 x 10). C. Sporanges contenant des (neutro)spores sur la bordure d'une fronde, le 20 septembre 2019 (gross. 10 x 40). D. Expulsion de (neutro)spores (flèches noires) à la bordure d'une fronde le 25 novembre 2019 (gross. 10 x 40). E. (Neutro)pores libres (flèche noire; gross. 10 x 10). F. (Neutro) pores libres (flèches noires; gross. 10 x 40)..... 41
- Figure 20. Examen microscopique de la surface de frondes de *P. umbilicalis* récoltées le 8 avril 2020 sur les blocs du brise-lames de la marina de Chandler. A. Zone fertile en bordure de fronde, contenant des (neutro)spores dispersées (gross. 10 x 4). B. Sporanges contenant les (neutro)spores, en bordure de fronde (gross. 10 x 40). C, D et E. Plantules de *P. umbilicalis* (flèches noires) à différents stades de développement et fixés sur la marge d'une fronde de la même espèce (gross. 10 x 10, 10 x 4, 10 x 4). E. Cellules rhizoïdes (flèche noire) à la base de la même plantule fixée sur la marge d'une fronde (gross. 10 x 10). .... 42

Figure 21. Examen microscopique de spores issues de frondes de <i>P. umbilicalis</i> récoltées le 6 juin 2020 sur les rochers de bord de plage à Pabos. A et B. Examen des spores 2 jours après leur libération dans un plat de Pétri. Les spores ont un diamètre de 12-15 microns (gross. 10 x 10, 10 x 40). C et D. Examen des spores 5 jours après leur libération. Les tubes de germination de certaines spores sont visibles (flèches noires; gross. 10 x 10, 10 x 40). E. Examen des spores 19 jours après leur libération (gross. 10x 40) F. Examen des spores 43 jours après leur libération (gross. 10 x 40).....	43
Figure 22. Montage expérimental pour la réalisation de l'objectif 3. ....	45
Figure 23. A. Systèmes d'algues semi-immergées (biofiltre type percolateur). B. Système d'algues immergées (biofiltre immergé à lit dynamique). ....	46
Figure 24. Fioles utilisées dans les tests de colorimétrie pour déterminer la concentration de $\text{NH}_4^+$ dans les systèmes de biofiltre d'algues.....	47
Figure 25. Frondes de <i>Porphyra</i> sp. essorées avant la pesée et avant leur introduction dans les systèmes expérimentaux. ....	48
Figure 26. Graphique illustrant l'évolution de la concentration en $\text{NH}_4^+$ dans les traitements témoins (lignes pâles), et les traitements expérimentaux (lignes foncées) dans les deux systèmes de culture : algues semi-immergées (algues fixes) et algues immergées (algues fixes) et algues immergées (algues libres), durant 72 h.....	49
Figure 27. Aperçu de l'état de <i>P. Umbilicalis</i> conservée pendant 8 mois dans des bassins à la salle des bassins de Merinov.....	50
Figure 28. Dispositif expérimental pour le sous-objectif 3.1 B. ....	51
Figure 29. Graphique illustrant l'évolution de la concentration en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans le biofiltre immergé à lit dynamique, contenant de l'eau des viviers d'une usine de homard, durant 72 h. ....	52
Figure 30. Évolution de la concentration en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans trois groupes d'Erlenmeyer remplis d'eau provenant des viviers d'une usine de homard et contenant des frondes de <i>P. Umbilicalis</i> conservées préalablement dans des bassins chez Merinov pendant 8 mois, des <i>P. Umbilicalis</i> fraîchement cueillies, ainsi qu'un témoin sans algue. ....	54

## Liste des tableaux

Tableau 1. Pourcentage de diminution (%; moyenne $\pm$ écart-type) des concentrations d'ammoniaque totale des deux traitements de concentration d'ammoniaque (150 $\mu\text{M}$ et 500 $\mu\text{M}$ ) et des témoins correspondants, durant les trois semaines d'expérience. ....	21
Tableau 2. Liste des endroits où des frondes de <i>Porphyra</i> sp. ont été observées ou récoltées en Gaspésie pour les activités d'identification, de suivi de la fertilité et d'essais de sporulation. ....	28
Tableau 3. Variation de la biomasse algale des deux types de systèmes sur une période de 72 h. ....	50

On doit citer ce document comme suit : Gendron-Lemieux, I., Gilmore-Solomon, L., Tamigneaux É. et Tremblay-Gratton, A. 2021. Essais de culture de *Porphyra sp* dans une perspective d'épuration des effluents de viviers de homard. Merinov, Rapport de R-D n° 21-01. 73 pages

## Résumé

Au Québec, le homard américain (*Homarus americanus*) fait l'objet d'une importante pêche commerciale. Dans les usines de transformation, les homards vivants sont conservés dans des viviers alimentés en eau de mer froide. Pour réduire les coûts de refroidissement, une partie de l'eau est réutilisée de sorte que le système est en recirculation partielle. L'ammoniaque excrétée par les homards s'accumule donc dans l'eau des viviers et peut augmenter les taux de mortalité. Ceci peut donc constituer une problématique pour les usines de transformation du homard. Or, certaines algues rouges comme le nori (*Porphyra sp.*) ont des taux de croissance élevés en eau froide et une capacité importante d'absorption et de séquestration de l'azote, particulièrement lorsque l'azote est disponible dans le milieu sous forme d'ammoniaque.

Ainsi, le présent projet visait à développer un filtre biologique à base d'espèces de nori indigènes pour réduire la concentration d'ammoniaque dans les effluents des usines de crustacés qui pratiquent la stabulation du homard en viviers. Les objectifs secondaires étaient les suivants : 1) déterminer laquelle des espèces locales de nori possède le meilleur potentiel pour l'absorption et la séquestration de l'ammoniaque dissous, (2) assurer la disponibilité de jeunes frondes de qualité pour ensemercer le biofiltre, (3) développer et tester deux prototypes de biofiltre avec des frondes fixées ou libres.

Les résultats du projet ont démontré que *Porphyra* est un genre répandu sur les blocs de roches dans la zone intertidale des côtes de la Gaspésie et des Îles-de-la-Madeleine entre le printemps et l'automne. Il semble que la production et la libération des spores ait lieu principalement en hiver et tôt au printemps et il n'a pas été possible d'obtenir des jeunes frondes (gamétophytes) à partir de (neutro)spores cultivées en laboratoire. L'identification de *P. umbilicalis* sur la base de critères strictement anatomique reste d'ailleurs insuffisante et une approche moléculaire devrait être utilisée pour bien l'identifier. Les frondes peuvent être conservées quelques mois en *tumble culture* dans des bassins alimentés en eau de mer, mais elles finissent par se dégrader progressivement. Les mesures d'absorption d'ammoniaque montrent que lorsque des grandes frondes sont exposées *in vitro* à des concentrations d'ammoniaque de  $50 \mu\text{moles L}^{-1}$ , elles sont capables d'absorber  $95 \pm 4,3 \%$  de l'ammoniaque au bout de 24 h avec un taux de croissance de  $6,2 \pm 10,8 \%$  de masse humide par jour. Exposées à des concentrations d'ammoniaque de  $500 \mu\text{moles L}^{-1}$ , elles absorbent  $22,6 \pm 18,5 \%$  de l'ammoniaque en 24 h et  $99,8 \pm 0,0 \%$  au bout de 7 jours, mais avec un taux de croissance négatif. Des essais *in vitro* menés sur une durée de 6 semaines en renouvelant chaque semaine la concentration de départ montrent que la cinétique d'absorption est rapide la première semaine, mais ralenti ensuite rapidement, ce qui reflète la diminution progressive de la croissance végétative des frondes et sans doute aussi la saturation du processus d'accumulation des réserves d'azote dans les tissus. Finalement deux prototypes de biofiltres (biofiltre percolateur et biofiltre immergé à lit dynamique) ont été testés durant trois jours dans un circuit fermé contenant  $500 \mu\text{moles NH}_3 \text{ L}^{-1}$ . Les deux biofiltres ont permis une réduction progressive de la concentration en ammoniaque totale et le biofiltre contenant des frondes immergées maintenues en mouvement a été le plus performant.

Pour faire suite à ce projet, il conviendrait de réaliser un suivi annuel du cycle de croissance et de reproduction de *P. umbilicalis*. Les travaux sur la congélation des tissus et des spores ainsi que ceux sur la culture de cette espèce devraient être poursuivis afin de pouvoir fournir une réserve de matériel biologique aux caractéristiques connues pour les travaux sur la bioremédiation. Finalement, les résultats justifient une mise à l'échelle et un essai des biofiltres connectés à un vivier de homards afin d'évaluer les performances et les coûts de fonctionnement sur une période de plusieurs semaines.



## 1. Introduction

En 2018, la valeur globale de la culture d'algues marines à l'échelle mondiale était chiffrée à 13,3 milliards de dollars US pour un volume de production de 32,4 millions de tonnes (FAO, 2020). Ce secteur de l'aquaculture est dominé à plus de 60 % par la production d'algues rouges telles que *Porphyra sp.*, communément appelé nori. Avec 6 % de la production mondiale d'algues, le nori est l'algue qui a la plus grande valeur commerciale (Kim *et al.*, 2017) et la culture de cette seule espèce génère près de 1 milliard de dollars US de revenus annuels (FAO, 2016). Le nori est majoritairement cultivé en Chine, au Japon et en Corée (Lavik, 2016) pour le marché bioalimentaire (Kim *et al.*, 2017).

Au Québec, seulement quelques kilos de *Porphyra sp.* sont récoltés chaque année par de petites entreprises, tandis que les activités de culture d'algues se sont concentrées sur les algues brunes de l'ordre des laminariales. Divers projets associés au développement de cette culture ont été réalisés par Merinov et le Cégep de la Gaspésie et des Îles avec le soutien du Programme d'aide à la recherche et au transfert du ministère de l'Éducation et de l'Enseignement supérieur et par la Chaire de recherche industrielle dans les collèges du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) en valorisation des macroalgues marines et du programme Optimal (ICC du CRSNG). Ces activités de recherche ont porté des fruits puisque depuis 2014, une éclosérie marine de Gaspésie fournit des plantules d'algues brunes à des entreprises qui les cultivent en mer et trois nouvelles entreprises de transformation d'algues ont été créées. Ces entreprises de transformation désirent maintenant diversifier leur production avec des algues rouges. Un projet d'aide à la commercialisation des algues réalisé par Gimxport (Dupré-Gilbert et Berger, 2018) a récemment identifié le marché du nori comme un marché porteur pour le Québec.

En Asie, le cycle de culture du nori, qui comporte plusieurs étapes en éclosérie et une phase de culture en mer, requiert beaucoup de travail manuel. Cette méthode n'est pas rentable en occident où les coûts de main-d'œuvre sont plus élevés (Pereira *et al.*, 2006). Toutefois, malgré la dégradation de la qualité des eaux côtières en Asie (Keesing *et al.*, 2016), la demande pour le nori continue d'augmenter (Lavik, 2016) grâce à la popularité des sushis en Occident (Green et Neefus, 2015). Des groupes de recherche de la côte est américaine se sont dès lors concentrés sur la culture d'espèces locales de *Porphyra sp.* et sur le développement de techniques de culture plus simples (Green et Neefus, 2015). Ces chercheurs ont démontré que ces espèces ont un taux de croissance élevé et des capacités de séquestration importantes pour l'azote (Carmona *et al.*, 2006), ce qui fait aussi d'elles des candidates parfaites pour les stratégies de bioremédiation des milieux côtiers afin d'éviter qu'un excès de nutriments n'entraîne une eutrophisation des eaux côtières (Kim *et al.*, 2017).

Au Portugal, l'entreprise ALGApplus ([www.algaplus.pt](http://www.algaplus.pt)) connaît un succès commercial en appliquant le concept de bioremédiation. L'entreprise produit deux tonnes d'algues par mois dans des bassins alimentés en eau de mer provenant d'une lagune où des élevages de poissons marins produisent de grandes quantités d'azote dissous. Au Québec, le Biodôme de Montréal a développé avec Merinov un filtre biologique à base d'algues rouges *Palmaria palmata* pour limiter l'accumulation du nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) dans les bassins d'exposition de l'écosystème marin qui fonctionne en circuit fermé (Tremblay-Gratton 2017; Tremblay-Gratton *et al.*, 2018). Ce biofiltre est constitué d'un bassin peu profond éclairé par le dessus et contenant des algues libres maintenues en mouvement permanent par injection d'air. Une extrémité du biofiltre reçoit l'effluent chargé en azote tandis que l'eau épurée sort par l'autre extrémité.

Au Québec, le homard américain (*Homarus americanus*) fait l'objet d'une pêche commerciale avec des débarquements de 8 135 tm en 2018 pour une valeur de 116,6 M\$ (MPO, 2018). Depuis 2010, les débarquements ont subi une hausse significative d'environ 20 %, de sorte que 19 usines québécoises de produits marins étaient autorisées à acheter du homard vivant en s'approvisionnant auprès de 526 entreprises de pêche. Environ 60 % du homard sortant des usines est commercialisé sous forme vivante (MAPAQ, 2012). Préalablement à l'envoi de homard vivant vers les centres urbains, les usines doivent maintenir le homard en viviers dans une eau à 10 °C pendant au moins 76 heures pour qu'il dégorge en évacuant ses excréments. Pour maintenir cette température d'eau durant l'été sans que les coûts de refroidissement soient trop élevés, une partie de l'eau qui sort des viviers est réutilisée de sorte que le système est en recirculation partielle, avec un faible ajout d'eau neuve. Comme le dégorgeement s'accompagne d'une excrétion de grandes quantités d'ammoniaque par les branchies des homards, le débit d'injection d'eau neuve dans les viviers est réglé pour maintenir la concentration d'ammoniaque totale acceptable pour la survie des homards. Selon la littérature, un taux d'ammoniaque total (NH<sub>4</sub>OH) situé au-dessus de 6 mg/L ou 150-170 µM (température 10 °C, pH 8 et salinité 30 ‰) est considéré comme dangereux pour les crustacés tels que le homard (Beard et McGregor, 2004). Le seuil au-delà duquel l'accumulation d'ammoniaque totale sous sa forme non ionisée NH<sub>3</sub>, forme toxique devant être surveillée attentivement dans les systèmes de contention de produits aquatiques, devient létale pour le homard est autour de 1 mg/L pour le homard (Chartois *et al.*, 1994).

Depuis 2009, la capacité des viviers est demeurée inchangée malgré l'augmentation des volumes débarqués. Cette capacité de contention insuffisante affecte les revenus des usines puisque la vente précipitée du produit pour libérer de l'espace en viviers influence le prix de vente à la baisse. Il devient donc avantageux de conserver des homards plus longtemps dans les viviers. L'augmentation du volume de contention en viviers, couplée à l'amélioration des systèmes de gestion de la qualité de l'eau deviennent prioritaires afin que les usines demeurent compétitives. C'est pour aider l'industrie à relever ce défi que Merinov a obtenu en 2016 le statut de centre d'accès à la technologie (CAT) sous le nom de Viviers-Conseils, dont les activités sont coordonnées par une équipe des Îles-de-la-Madeleine (IDM). Dans ce contexte, la culture de *Porphyra sp* dans des bassins connectés aux viviers pourrait jouer le rôle de biofiltre des effluents en séquestrant l'azote ammoniacal excrété par les homards, ce qui permettrait d'augmenter le volume d'effluent recirculé, de réduire les coûts de refroidissement et de diminuer les taux de mortalité dans les viviers. Cela permettrait également de tirer avantage d'une source d'azote gratuite pour développer une production secondaire à forte valeur ajoutée, recherchée par les entreprises de transformation d'algues.

## 2. État des connaissances

### Écologie des espèces canadiennes

Le genre *Porphyra* regroupe une centaine d'espèces d'algues rouges foliacées de la classe *Bangiophyceae* (Royer, 2017). Sept espèces de nori ont été recensées dans l'est du Canada : *P. linearis*, *P. leucosticta*, *P. dioica*, *P. umbilicalis*, *P. purpurea*, *P. amplissima* et *P. miniata* (Sears, 1998). Les sept espèces se distinguent par la disposition de leurs cellules reproductives sur la fronde et par le nombre de couches de cellules de la fronde (Chabot, 2018). À l'exception de *P. amplissima* qui se maintient dans la zone infralittorale et de *P. leucosticta* qui croît sur d'autres algues, la plupart des espèces de *Porphyra* vivent fixées sur des rochers dans la zone de battement des marées (Royer, 2017). La température optimale de croissance de ces algues se situe entre 10 et 17 °C (Redmond *et al.*, 2014). Toutefois, vu leur position sur le littoral, elles sont fréquemment exposées à marée basse et sont donc adaptées à la dessiccation ainsi qu'à des variations extrêmes de température (-20 à 25 °C) et de salinité (Royer, 2017; Lavik, 2016).

## Cycle de vie

Le mode de reproduction sexuée du nori implique l'alternance de deux générations : une phase haploïde macroscopique (le gamétophyte, annuel) qui est la fronde foliacée et une phase diploïde microscopique (le sporophyte) appelée *conchocelis*. Ce dernier a la forme d'un filament qui, à maturité, émet des conchosporos qui se développent à leur tour en une nouvelle fronde (gamétophyte). Certaines espèces ont également un mode de reproduction asexué où, sur la bordure externe de la fronde, il y a transformation des cellules végétatives en archéospores (spores neutres), qui une fois relâchées se développent en une nouvelle fronde, sans passer par le *conchocelis* (Redmond *et al.*, 2014). Parmi les espèces canadiennes, *P. umbilicalis* est la seule qui se reproduit seulement de façon asexuée (Royer, 2017). Les périodes de fertilité des différentes espèces au Québec sont mal connues. Dans le Maine, *P. umbilicalis* se reproduirait toute l'année, mais la reproduction serait plus fréquente en hiver et au printemps (Royer, 2017).

## Culture de nori sur filets

En Asie, la culture du nori (*P. yezoensis* et *P. tenera*) comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, les carpospores émises par les frondes foliacées se fixent et se développent en filaments *conchocelis* sur des coquilles d'huîtres dans des bassins. Par la suite, les paramètres de culture sont modifiés pour stimuler la formation de sporanges qui renferment des conchosporos. Lorsque les conchosporos sont relâchées, des filets sont immergés dans les bassins et, une fois les spores fixées sur les filets, ceux-ci sont transférés en mer (Redmond *et al.*, 2014). Suivant des essais infructueux d'introduction de *P. yezoensis* au Maine dans les années 1990, la recherche se concentre maintenant sur la domestication d'espèces locales (Brawley, 2014). He et Yarish (2006) ont développé une technique de culture *in vitro* des *conchocelis* de *P. leucosticta*. De leur côté, Blouin *et al.* (2007) ont réussi à ensemercer des filets avec les spores neutres de *P. umbilicalis*, sans passer par l'étape du *conchocelis*.

## Essais de culture de nori en bassins

Plusieurs essais de culture de frondes en bassins ont aussi été réalisés pour évaluer les performances de *P. leucosticta*, *P. umbilicalis*, *P. linearis*, *P. amplissima* et *P. purpurea* dans un contexte de bioremédiation (Royer, 2017; Green et Neefus, 2015, Redmond *et al.*, 2014; Blouin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Carmona *et al.*, 2006). Pour *P. umbilicalis*, des techniques d'isolation et de mise en culture des spores ont été développées dans une plaque à puits (Redmond *et al.*, 2014) et sur un substrat de billes de verre (Royer, 2017). De plus, il a été démontré que les frondes fertiles et les jeunes thalles de cette espèce peuvent être congelés pour conserver un stock de semences permettant de redémarrer facilement une culture (Royer, 2017; Green et Neefus, 2014). Pour l'ensemble des espèces testées, une intensité lumineuse entre 100-150 microEinstein  $m^{-2}s^{-1}$ , une photopériode avec au moins 12 h de lumière et une température entre 10 et 15 °C sont optimales pour la croissance des frondes (Carmona *et al.*, 2006). De plus, ces espèces séquestrent mieux l'azote s'il est disponible dans le milieu sous forme de  $NH_4^+$  que sous forme de  $NO_3^-$  (Carmona *et al.*, 2006) ce qui rend la chose encore plus intéressante pour la culture avec les eaux usées des viviers de homard.

## Taux de croissance

Selon les études réalisées aux États-Unis, *P. amplissima*, *P. linearis* et *P. umbilicalis* auraient les plus hauts taux de croissance en bassins. En effet, Kim *et al.* (2007) ont obtenu un taux de croissance de 16 % par jour pour *P. linearis* et Carmona *et al.* (2006) ont mesuré une croissance moyenne de 17,9 % par jour pour *P. amplissima* avec un maximum de 25,2 %. *P. umbilicalis* a un taux de croissance moyen en bassins variant

entre 9 % (Green et Neffus, 2006) et 13 % par jour (Carmona *et al.*, 2006), avec un maximum de 17,8 % (Carmona *et al.*, 2006). Selon Kim *et al.* (2007), *P. leucosticta* aurait un taux de croissance comparable à *P. umbilicalis* (10 % par jour). Cependant, le gamétophyte de cette espèce entre en mode reproduction lorsqu'il est exposé à de fortes concentrations en  $\text{NH}_4^+$  et se détériore ensuite rapidement (Carmona *et al.*, 2006). Pereira *et al.* (2006) a, pour sa part, obtenu des taux de croissance de 33 % avec *P. dioica*.

### Capacité de bioremédiation en lien avec les valeurs observées dans les viviers

*P. umbilicalis* serait l'espèce la plus performante pour la séquestration d'azote (Royer, 2017) avec 99 % de séquestration de  $\text{NH}_4^+$  après 3 jours à des concentrations entre 25 et 150  $\mu\text{M}$  (Carmona *et al.*, 2006). Il a été évalué que 1 kg de *P. umbilicalis* est suffisant pour abaisser la concentration en azote de 25  $\mu\text{M}$  dans un élevage de 5 kg de poisson (Redmond *et al.*, 2014). Kim *et al.* (2007) ont mesuré des concentrations en azote de plus de 6 % dans *P. umbilicalis*, soit près du double de ce qui a été mesuré dans des algues vertes qui ont de bonnes capacités de séquestration comme *Ulva sp.* *P. Purpurea* serait presque aussi efficace que *P. umbilicalis* pour la séquestration de l'azote, mais croît deux fois moins vite (6,1 % par jour). Finalement, *P. linearis* (Blouin *et al.*, 2007) et *P. amplissima* (Carmona *et al.*, 2006) sont de bons candidats pour la séquestration de  $\text{NH}_4^+$  à des concentrations plus élevées (250-300  $\mu\text{M}$ ).

Même si les usines de transformation souhaitent maintenir la concentration d'ammoniacque dans les viviers autour de 150  $\mu\text{M}$  pour minimiser les effets toxiques sur les homards, les valeurs observées dans certaines usines de contention du homard peuvent se situer autour de 300  $\mu\text{M}$  et parfois même à des concentrations aussi extrêmes que 500  $\mu\text{M}$ . Pour l'instant, la seule façon pour les usines de se débarrasser des quantités excessives d'ammoniacque est de vider complètement les viviers pour renouveler leur eau.

Sans affirmer que les rejets des usines de homard peuvent être la cause de marées vertes, ces dernières sont tout de même apparues lorsque des effluents riches en azote ont amené la prolifération excessive des ulvacées dans les zones côtières eutrophisées. Ces algues se sont accumulées ensuite sur le rivage comme ce fut le cas sur la côte est du Canada, en Chine ou en France (Crane et Ramsay, 2011; Zhang et collab., 2019). S'ils ne sont pas gérés correctement, des effluents riches en azote ammoniacal peuvent affecter la santé des écosystèmes côtiers. En effet, dans les eaux de surface du golfe Saint-Laurent, les concentrations en azote dissous total varient entre 0 (été) et 20  $\mu\text{M}$  (hiver), soit 25 fois moins que dans les effluents.

### Situation du marché du nori

Le nori est cultivé pour la consommation humaine et est connu des Occidentaux sous la forme de feuilles utilisées dans la confection des sushis. Dans une étude réalisée au Maine, les consommateurs n'ont pas décelé de différence organoleptique entre l'espèce asiatique *P. yeozensis* et l'espèce locale *P. umbilicalis* (Green et Neefus, 2016). Avec des concentrations variant entre 25 et 50 %, *Porphyra sp* constitue une source importante de protéines (Kim *et al.*, 2017). Ces algues, qui sont aussi composées d'acides gras Oméga 3 et 6 (Lavik, 2016), peuvent d'ailleurs remplacer jusqu'à 30 % de la farine animale dans la moulée de poisson d'élevage sans occasionner de perte de croissance (Redmond *et al.*, 2014). Le nori renferme aussi de la phycoérythrine, un pigment récemment reconnu pour ses propriétés antioxydantes (Lavik, 2016) et communément utilisées comme marqueur fluorescent en microscopie confocale (Kim *et al.*, 2007). La culture de *Porphyra sp* en bassins approvisionnés d'un rejet riche en  $\text{NH}_4^+$  favoriserait la production de phycoérythrine (Carmona *et al.*, 2006). De plus, certains paramètres comme l'intensité lumineuse et la photopériode peuvent être ajustés pour obtenir de plus fortes concentrations de ce pigment (Kim *et al.*, 2007). Finalement, le nori asiatique est aussi une source significative de calcium,

sodium, potassium, fer et magnésium ainsi que de vitamines B, C et E (Lavik, 2016). *Porphyra* est l'algue dont le prix sur le marché alimentaire est le plus élevé et les plus hautes qualités de nori transformé peuvent se vendre jusqu'à 162 euros (244 \$) par 100 g de feuilles grillées (Food ingredients first, 2010).

### 3. Objectifs

Ce projet vise à développer un biofiltre composé d'une algue rouge indigène et destiné à réduire significativement (de 500 à < 20 µM) la concentration d'azote total dans les effluents des usines de crustacés.

Les objectifs secondaires sont les suivants :

- Ob1.** Déterminer laquelle des espèces locales de *Porphyra* (*Porphyra sp.*, non identifiées à l'espèce, et *P. umbilicalis*) possède le meilleur potentiel pour l'absorption et la séquestration de l'ammoniaque dissoute, lorsque cultivée *in vitro* à 10 °C dans deux concentrations d'ammoniaque (50 et 500 µM).
- Ob2.** Assurer la disponibilité de jeunes frondes de qualité pour ensemercer le biofiltre.
- Ob3.** Développer et tester deux prototypes de biofiltre avec des frondes fixées ou libres.
- Ob4.** Mettre le prototype de biofiltre le plus performant à l'échelle pilote.
- Ob5.** Établir la valeur nutritionnelle et organoleptique des frondes de *Porphyra* produites dans le biofiltre.
- Ob6.** Établir les coûts d'opération et la rentabilité du biofiltre.

#### 3.1. Objectif 1

##### 3.1.1. Cinétique d'absorption du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sur 24 h

###### Sous objectif 1.1.

Déterminer laquelle d'entre deux espèces locales de *Porphyra sp.* (*Porphyra sp.*, non identifiées à l'espèce, et *P. umbilicalis*) possède le meilleur potentiel pour l'absorption de l'ammoniaque dissoute, lorsque cultivée *in vitro* dans deux concentrations d'ammoniaque (50 et 500 µM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), à 10 °C, sur une période de 24 h.

###### Matériel et méthodes

Des sorties effectuées sur le terrain à Chandler, Pabos et Colborne entre juin et août 2019 ont permis d'identifier des sites de récolte potentielle (substrat rocheux et accès facile) des algues *Porphyra sp* (voir section 3.2.1). Des frondes à la dérive en bon état et des fragments de frondes cramponnées sur des rochers ont été prélevés avec des ciseaux, mis dans un sac de type *Ziploc* sans eau et conservés dans un bassin cylindrique transparent, de type Kalwall, à l'ÉPAQ.

Afin de séparer les espèces dans des bassins différents en prévision des expériences de bioremédiation, une séance d'identification au binoculaire et au microscope a été planifiée, avec un technicien, une chargée de projet et un expert en taxonomie des macroalgues en juillet 2019 à l'ÉPAQ. *P. umbilicalis* a été identifiée sur la base de la position centrale du crampon qui lui donne sa forme ombiliquée, de la présence d'une couche unique de cellules (fronde monostromatique) ainsi que des cellules végétatives isodiamétriques au centre de la fronde, munies du chloroplaste en étoile typique des bangiales (Figure 1a, b). Les autres espèces récoltées sur le terrain étaient potentiellement *P. miniata*, *P. amplissima* (Figure 2a, b) et *P. linearis* (Figure 3a, b).

Malgré tout, dans le genre *Porphyra*, pour discriminer avec certitude les différentes espèces, il faut utiliser une technique moléculaire (ex. DNA barcoding) et, sur la seule base des observations au binoculaire et au microscope, leur identification à l'espèce reste incertaine. Selon le guide d'identification de Bird et McLachlan (1992), *P. umbilicalis* est d'ailleurs très souvent confondue avec *Porphyra purpurea*. C'est pourquoi elles ont été regroupées dans le même bassin sous le nom de *Porphyra sp.* pour les expériences de bioremédiation.

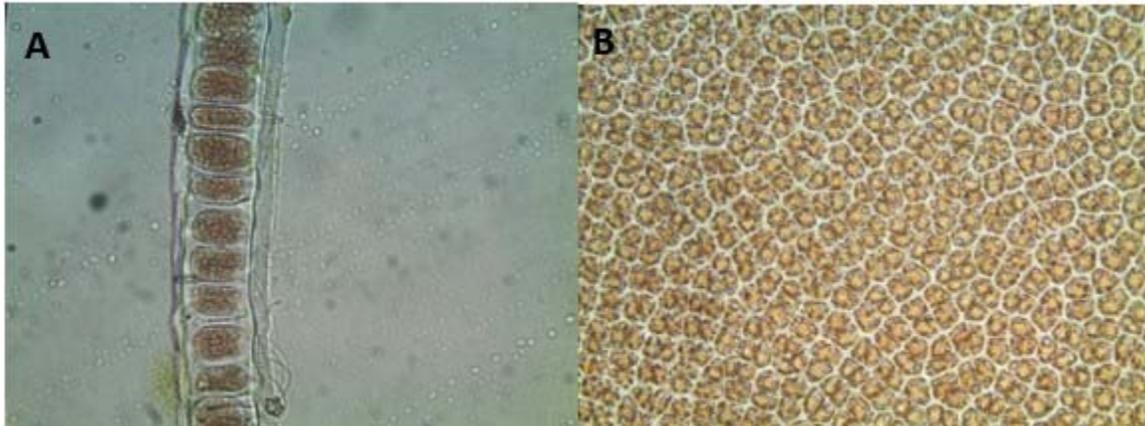


Figure 1. A. Coupe transversale qui montre le caractère monostromatique de la fronde de *P. umbilicalis* (gross. 10 x 40). B. Vue frontale de la fronde de *P. umbilicalis* avec les cellules végétatives isodiamétriques contenant un chloroplaste en étoile, au centre de la fronde (gross. 10 x 40).

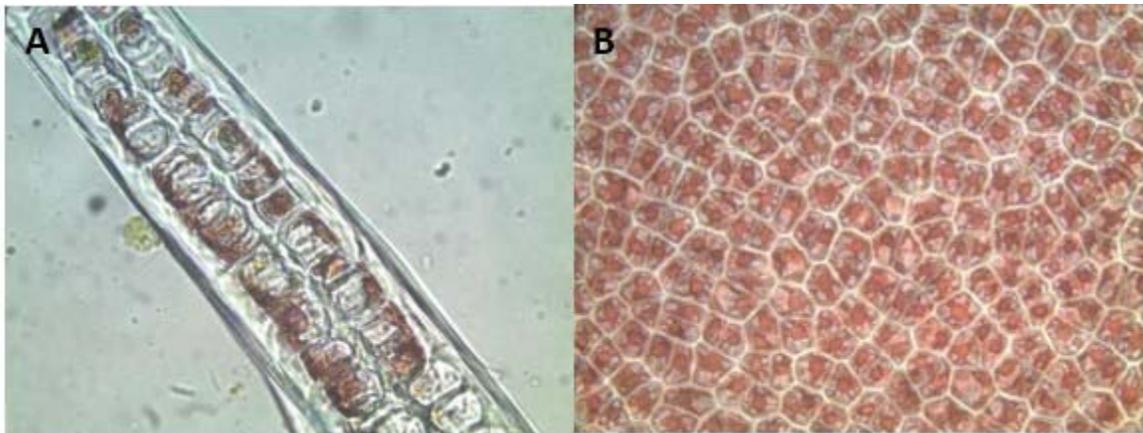
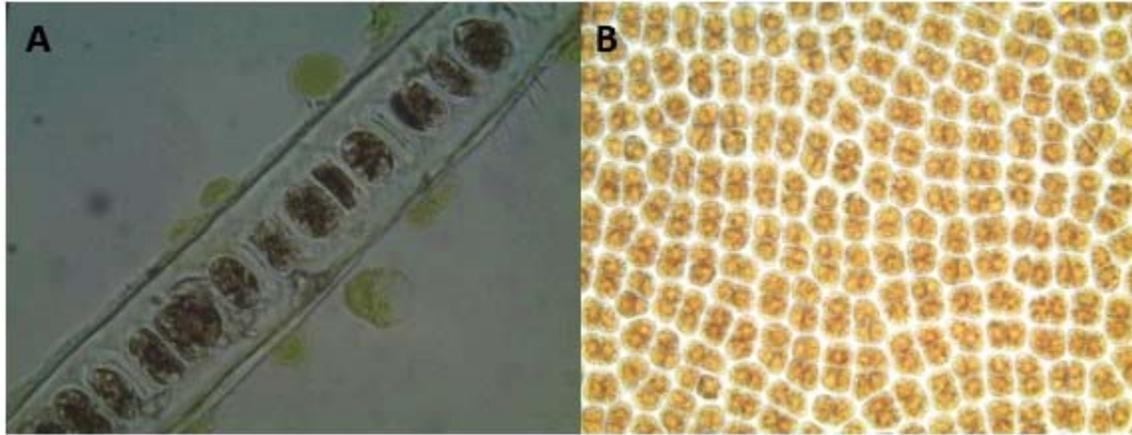


Figure 2. A. Coupe transversale qui montre le caractère distromatique de la fronde de *P. miniata* ou de *P. amplissima* (à valider) (gross. 10 x 40). B. Vue frontale de la même fronde avec les cellules végétatives au centre de la fronde (gross. 10 x 40).



**Figure 3. A. Coupe transversale qui montre le caractère monostromatique de la fronde de *P. linearis* (à valider) (gross. 10 x 40). B. Vue frontale de la même fronde avec les cellules végétatives au centre de la fronde (gross. 10 x 40). *P. linearis* ne possède pas de spores neutres, contrairement à *P. umbilicalis*.**

Avant le début de l'expérience, tous les thalles de *Porphyra sp.* et de *P. umbilicalis* ont été acclimatés séparément à la culture en bassins en circuit ouvert pendant une semaine après leur récolte. Les conditions de cette période d'acclimatation étaient un débit d'environ 1 L/minute (dans des bassins de 100 L), une eau dont la température suit les fluctuations naturelles du mois en cours, soit  $12,7 \pm 0,9$  °C, une intensité lumineuse entre 130-170  $\mu\text{moles photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et une photopériode de 16 : 8 h (Lum. : Obsc.).

La structure de l'expérience est une expérience factorielle en bloc complet avec deux niveaux d'espèces (*Porphyra sp.* non identifiée à l'espèce et *P. umbilicalis*) et deux niveaux de concentration en ammoniacque (50 et 500  $\mu\text{M NH}_4^+$ ), répliquée trois fois pour un total de douze traitements et deux témoins (sans algue à 50  $\mu\text{M}$  et sans algue à 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4^+$ ). L'expérience originale était d'une durée de 24 h. Toutefois, en cours d'expérience, il a été décidé d'étendre la période des tests afin d'inclure une mesure après 168 h (7 jours).

À la mi-septembre, les thalles de *Porphyra sp.* et *Porphyra umbilicalis* ont été cultivés dans des ballons en verre d'une capacité de 6 L, avec une densité de culture de 0,5g/L dans 4 L. L'eau de mer naturelle utilisée avait une salinité de 25 ‰ et était préalablement filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$  absolu et désinfectée aux UV. L'expérience s'est déroulée dans une salle de phytologie, ce qui a permis de programmer une intensité lumineuse de  $150 \pm 25$   $\mu\text{moles photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (lumière blanche fluorescente), une photopériode de 16 : 8 h et une température constante de 10 °C. Les ballons étaient munis d'un bouchon afin de limiter la perte d'eau par évaporation en cours d'expérience. Les algues étaient maintenues en mouvement à l'aide d'un kit d'aération qui comprenant une pipette de verre passée à travers le bouchon en caoutchouc et reliée à une entrée d'air par un tuyau souple et un filtre à air Whatman HEPA-Vent 50 mm diam (0,3  $\mu\text{m}$ ).

À partir d'une solution mère de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (1g  $\text{NH}_4\text{Cl/L}$ ), 10,7 ml de la solution étaient ajoutés dans la moitié des ballons de 4 L pour atteindre la concentration initiale de 50  $\mu\text{M NH}_4$  et 107 ml ajoutés dans l'autre moitié des ballons pour atteindre la concentration de 500  $\mu\text{M NH}_4$ . Les algues ont été ajoutées par la suite. Une fois en solution, l'ammoniacque coexiste sous trois formes :  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  et  $\text{NH}_4^+$ . Puisque la forme  $\text{NH}_4\text{OH}$  est instable, sa durée de vie est très brève. Les méthodes d'analyse chimique de l'ammoniacque vont donc mesurer essentiellement la concentration des deux formes les plus stables :  $\text{NH}_3$  (ammoniac) et  $\text{NH}_4^+$  (ion ammonium). Lorsqu'il est question d'ammoniacque totale, cela fait référence à la quantité

totale d'ammoniaque présente dans l'eau, c'est-à-dire la somme de  $\text{NH}_3$  et  $\text{NH}_4^+$ . Le pourcentage de l'ammoniaque totale qui se trouve sous la forme de  $\text{NH}_3$  ou de  $\text{NH}_4^+$  dans la solution dépend de la salinité, du pH et de la température de l'eau. Toutefois, dans l'eau de mer, c'est la forme  $\text{NH}_3$  qui prédomine. Les méthodes d'analyse chimique déterminent la concentration en ammoniaque totale dans les échantillons.

Afin de suivre l'évolution des concentrations en ammoniaque en cours d'expérience, trois échantillons d'eau de 15 ml ont été prélevés par traitement, aux temps 0 h, soit avant l'introduction des algues, 18 h et 24 h. En cours d'expérience, il a été convenu de prélever un quatrième échantillon d'eau après 168 h (7 jours) afin d'étendre la période des tests et évaluer la tendance en prévision des prochains tests sur 3 semaines (voir section suivante). Les échantillons d'eau étaient filtrés à  $0,45 \mu\text{m}$ , puis gardés dans un congélateur à  $-80^\circ\text{C}$  avant d'être envoyés à l'Institut Maurice-Lamontagne pour analyses par fluorimétrie (Jasco FP-2020, méthode G-327-05, limite de détection :  $0,015 \text{ mmoles m}^{-3}$ ). Les échantillons ont été analysés une seule fois, sans duplicatas. Les résultats des analyses étaient exprimés sous forme de poids des molécules d'ammonium par volume d'eau :  $\mu\text{M NH}_4$ . La température de l'eau, l'intensité lumineuse et le pH étaient mesurés avant l'introduction des algues et à la fin de la période de 24 h avec un thermomètre au mercure, un *quantum flux* et un pH-mètre respectivement. La biomasse des algues était prise après avoir tapoté doucement les algues dans du papier brun pour enlever l'excès d'eau, au Temps 0 h (2 g) et après 24 h afin de connaître le taux de croissance pendant cette période.

#### Résultats et discussion

Durant les premières 24h de l'expérience, la température de l'eau, tout traitement confondu, s'est maintenue à une moyenne de  $13,9 \pm 0,5^\circ\text{C}$  et l'intensité lumineuse à une moyenne de  $166 \pm 10 \mu\text{moles photon m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Le pH avait une moyenne de  $7,75 \pm 0,06$  en début d'expérience (temps 0) et une valeur moyenne supérieure au temps 24 h, soit  $7,94 \pm 0,11$ .

#### **Absorption et fluctuation des concentrations d'ammoniaque totale**

Lorsque cultivée à une concentration faible de  $50 \mu\text{M}$ , *P. umbilicalis* absorbe en moyenne  $61,0 \pm 9,9\%$  de l'ammoniaque totale du milieu en moins de 18 h,  $95,0 \pm 4,3\%$  en 24 h et  $98,2 \pm 0,5\%$  en 7 jours. La concentration d'ammoniaque passe donc de  $49,07 \pm 10,34 \mu\text{M}$  (concentration réelle de départ) à  $2,47 \pm 2,28 \mu\text{M}$  en 24 h et à peine  $0,82 \pm 0,15 \mu\text{M}$  au bout de 7 jours (Figure 4). Avec *Porphyra sp.*, la concentration d'ammoniaque diminue de  $37,4 \pm 20,2\%$  en 18 h,  $51,0 \pm 16,3\%$  en 24 h, et  $97,8 \pm 0,4\%$  au bout de 7 jours. La concentration d'ammoniaque dans le milieu de culture est donc passée de  $58,47 \pm 19,30 \mu\text{M}$  (concentration réelle de départ) à  $34,00 \pm 1,91 \mu\text{M}$  en 18 h, à  $26,57 \pm 1,79 \mu\text{M}$  en 24 h et à moins de  $1,27 \pm 0,32 \mu\text{M}$  au bout de 7 jours (Figure 4).

Lorsque cultivée à une concentration élevée de  $500 \mu\text{M}$ , *P. umbilicalis* absorbe en moyenne  $16,1 \pm 18,9\%$  de l'ammoniaque totale en 18 h,  $22,6 \pm 18,5\%$  en 24 h et  $99,8 \pm 0,0\%$  au bout de 7 jours. La concentration d'ammoniaque passe de  $613,67 \pm 136,05 \mu\text{M}$  (concentration réelle de départ) à  $497,67 \pm 11,06 \mu\text{M}$  en 18h,  $458,33 \pm 12,10 \mu\text{M}$  en 24 h et  $1,16 \pm 0,26 \mu\text{M}$  en 7 jours (Figure 5). Avec *Porphyra sp.*, la concentration d'ammoniaque enregistre une augmentation de  $7,2 \pm 11,4\%$  en 18 h, de  $1,8 \pm 20,3\%$  en 24 h et finalement une diminution de  $26,8 \pm 7,5\%$  en 7 jours par rapport à la concentration de départ. Les valeurs mesurées passent de  $452,67 \pm 48,06 \mu\text{M}$  (concentration réelle de départ) à  $482,00 \pm 25,51 \mu\text{M}$  en 18h,  $454,33 \pm 42,67 \mu\text{M}$  en 24 h et finalement  $329 \pm 8,19 \mu\text{M}$  en 7 jours (Figure 5).

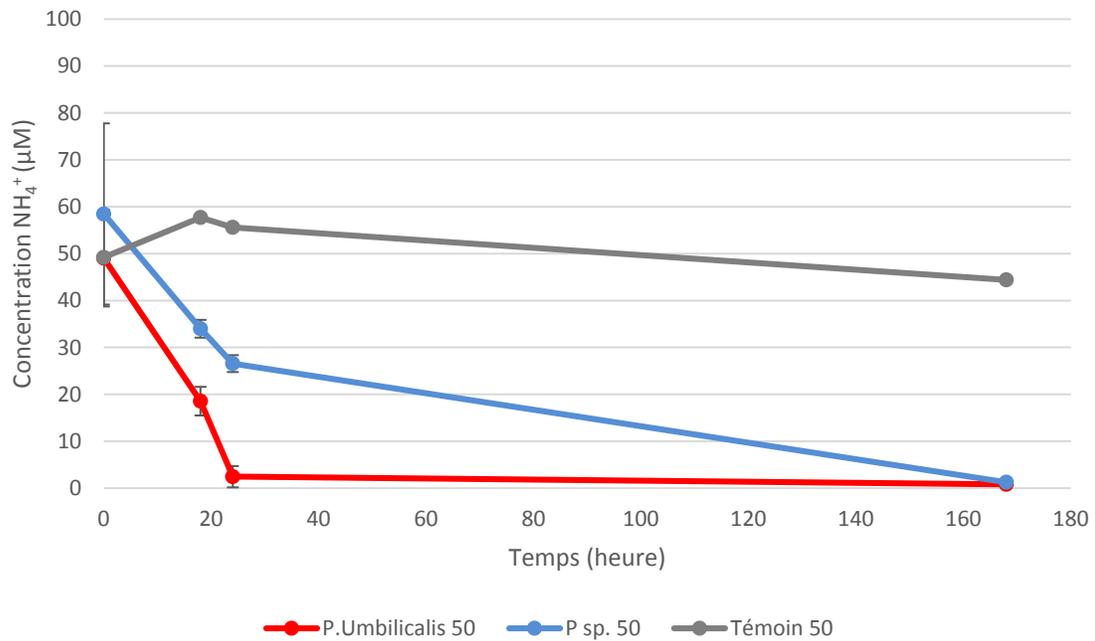
Chez le témoin sans algue, exposé à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  (concentration réelle de 49,2  $\mu\text{M}$ ), il y a eu une augmentation de 13,0 % de l'ammoniaque après 24 h et une diminution de 9,8 % après 7 jours par rapport à la concentration de départ (Figure 4). Chez le témoin sans algue, exposé à 500  $\mu\text{M}$  (concentration réelle de 483,0  $\mu\text{M}$ ), il y a eu une diminution de 6,2 % après 24 h, mais une augmentation de 23,2 % par rapport à la concentration de départ a finalement été enregistrée après 7 jours (Figure 5).

Après 18 h de culture, une différence est déjà perceptible entre les deux espèces. *P. umbilicalis* enregistre un pourcentage de diminution d'ammoniaque plus important que la seconde espèce, et ce, que la concentration initiale d'ammoniaque soit 50  $\mu\text{M}$  ou 500  $\mu\text{M}$  (Figures 4 et 5).

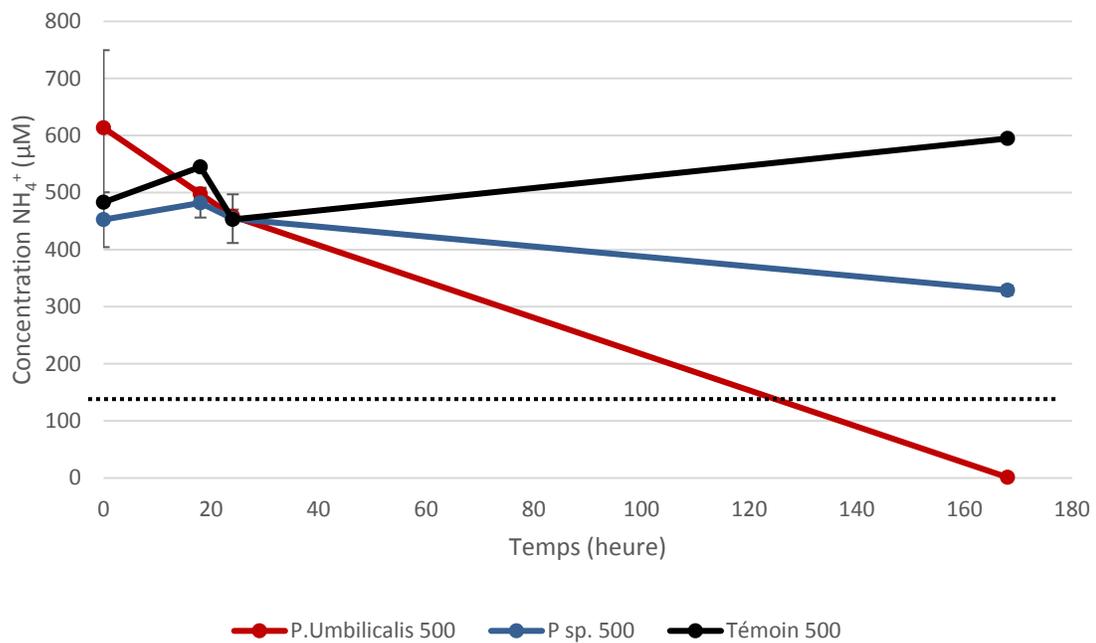
Après 24 h de culture, la différence entre les deux espèces continue de s'accroître pour les deux traitements. À 50  $\mu\text{M}$ , *P. umbilicalis* permet d'enlever  $95,0 \pm 4,3$  % de l'ammoniaque contrairement à *Porphyra sp.* qui n'enlève que la moitié, soit  $51,0 \pm 16,3$  %. Pour le traitement à 500  $\mu\text{M}$ , bien que les concentrations obtenues après 24 h soient similaires ( $458,33 \pm 12,10$   $\mu\text{M}$  pour *P. umbilicalis* et  $454,33 \pm 42,67$   $\mu\text{M}$  pour *Porphyra sp.*) les concentrations de départ étaient différentes (614 vs 453  $\mu\text{M}$ ), bien que faisant partie du traitement à concentrations élevées (500  $\mu\text{M}$ ). Dans ce contexte, *P. umbilicalis* a absorbé environ le quart de l'ammoniaque, soit  $22,6 \pm 18,5$  %, alors qu'aucune diminution n'est enregistrée pour la seconde espèce (Figures 4 et 5).

Après 7 jours, la différence d'efficacité d'absorption entre les deux espèces n'est plus visible dans le traitement à 50  $\mu\text{M}$  puisque dans les deux cas les concentrations en ammoniaque sont presque nulles ( $0,82 \pm 0,15$   $\mu\text{M}$  pour *P. umbilicalis* vs.  $1,27 \pm 0,32$   $\mu\text{M}$  pour *Porphyra sp.*). Par contre, pour le traitement à 500  $\mu\text{M}$ , *P. umbilicalis* a une efficacité supérieure puisqu'en une semaine, elle absorbe plus de  $99,8 \pm 0,0$  % de l'ammoniaque, alors que la seconde espèce n'en enlève que le quart, soit  $26,8 \pm 7,5$  % (Figures 4 et 5).

À quelques reprises, des augmentations de concentration d'ammoniaque totale ont été enregistrées. Ce fut le cas pour le témoin (sans algue) à 50  $\mu\text{M}$  après 24 h et pour le témoin (sans algue) à 500  $\mu\text{M}$  après 18 h et 7 jours. La hausse de concentration des nutriments pourrait avoir été causée par un phénomène d'évaporation malgré la présence de bouchon sur tous les ballons, ou bien avoir été causée par une erreur de dilution avant l'analyse des échantillons par fluorimétrie. À noter aussi qu'il y avait seulement un témoin pour chacune des deux concentrations, ce qui limite l'interprétation de ces données. Le traitement à 500  $\mu\text{M}$  de *Porphyra sp.* a également enregistré des augmentations de concentration après 18 h chez deux de ses triplicatas et après 24 h chez un de ses triplicatas. Dans ce cas, comme il y avait présence d'algues, il serait possible que l'augmentation des concentrations ait été causée par une dégradation du matériel biologique.



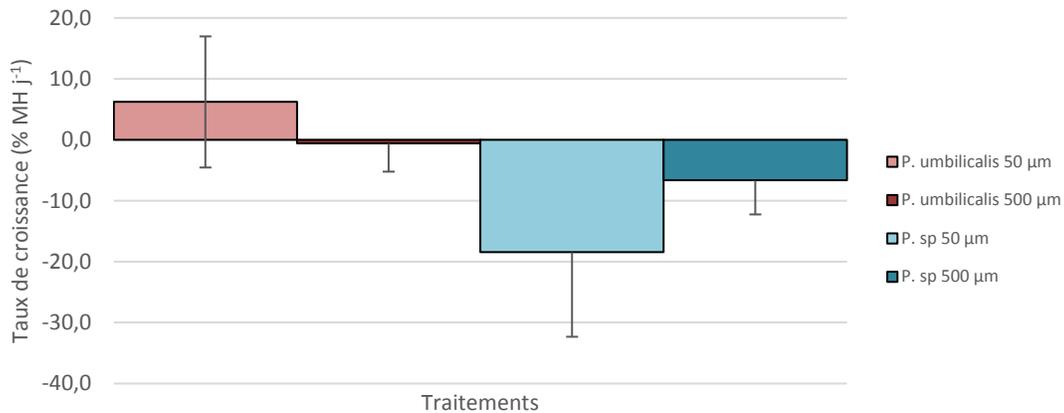
**Figure 4. Concentration en ammoniaque totale ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) chez des algues rouges, *Porphyra sp.* et *Porphyra umbilicalis* exposées à une concentration initiale en ammoniaque de  $50 \mu\text{M}$  pendant 7 jours.**



**Figure 5. Concentration en ammoniaque totale ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) chez des algues rouges, *Porphyra sp.* et *Porphyra umbilicalis* exposées à une concentration initiale d'ammoniaque de  $500 \mu\text{M}$  pendant 7 jours. La ligne pointillée indique le seuil de concentration toxique à ne pas dépasser pour les homards ( $150 \mu\text{M}$ ).**

## Taux de croissance après 24 h

Le taux de croissance de *P. umbilicalis* soumis au traitement de 50  $\mu\text{M}$  est de  $6,2 \pm 10,8 \text{ \% MH j}^{-1}$  et de  $-0,6 \pm 4,6 \text{ \% MH j}^{-1}$  lorsque soumis au traitement de 500  $\mu\text{M}$ . Le taux de croissance de *Porphyra sp* est de  $-18,5 \pm 13,9 \text{ \% MH j}^{-1}$  et de  $-6,6 \pm 5,6 \text{ \% MH j}^{-1}$  dans des conditions de 50  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$  respectivement. Comme il n'y a pas eu de mesures de la biomasse après 7 jours de culture, le taux de croissance associé à cette période reste inconnu (Figure 6).



**Figure 6. Taux de croissance (% MH j<sup>-1</sup>) pour une période de 24 h en fonction de l'espèce et de la concentration initiale théorique en ammoniacque dans le milieu de culture.**

Le taux de croissance enregistré sur une période de 24 h est variable selon les traitements. Le seul taux de croissance positif enregistré est associé à l'espèce *P. umbilicalis* dans des conditions de 50  $\mu\text{M}$  (de  $6,2 \pm 10,8 \text{ \% MH j}^{-1}$ ). La mise en perspective de ce résultat avec le pourcentage élevé d'absorption qui lui est associée ( $95,0 \pm 4,3 \text{ \%}$ , soit environ 48  $\mu\text{M}$  en 24 h) est encourageante et indique que les conditions de croissance étaient favorables pour cette combinaison de traitement (espèce \* concentration faible). Ce résultat de croissance se situe légèrement sous le  $8 \text{ \% MH j}^{-1}$  mesurer par Kim *et al.* (2007) à 25  $\mu\text{M}$  ou encore au  $15 \text{ \% MH j}^{-1}$  mesurer par Carmona *et al.* (2006) à 75  $\mu\text{M}$ .

Dans des conditions de fortes concentrations de 500  $\mu\text{M}$ , le taux de croissance de *P. umbilicalis* reste pratiquement nul et même légèrement négatif ( $-0,6 \pm 4,6 \text{ \% MH j}^{-1}$ ), ce qui témoigne d'une certaine dégradation des thalles en à peine 24 h, même si elles absorbent une quantité plus importante d'ammoniacque ( $22,6 \pm 18,5 \text{ \%}$ , soit environ 113  $\mu\text{moles NH}_4^+\text{L}^{-1}$ ) que dans la combinaison précédente (à 50  $\mu\text{moles NH}_4^+\text{L}^{-1}$ ). Cette combinaison ne devrait toutefois pas encore être écartée pour la suite des expériences puisque la dégradation reste faible par rapport à celles enregistrées chez *Porphyra sp.* ( $-18,5 \pm 13,9 \text{ \% MH j}^{-1}$  à 50  $\mu\text{moles NH}_4^+\text{L}^{-1}$  et  $-6,6 \pm 5,6 \text{ \% MH j}^{-1}$  à 500  $\mu\text{M}$ ).

Les fortes concentrations en ammoniacque de 500  $\mu\text{M}$  pourraient expliquer la diminution du taux de croissance observé chez *P. umbilicalis*, mais pas nécessairement un taux de croissance négatif. En effet, l'ammoniacque à forte concentration a des effets toxiques connus chez les végétaux terrestres (van der Eerden, 1982; Britto et Kronzucker, 2002) tout comme chez les algues marines (Grote, 2016). Une concentration en ammoniacque de 100  $\mu\text{M}$  sur une période de 10 jours ne semble pas provoquer de signe de toxicité chez l'algue marine *Ulva lactuca* (Nielsen *et al.*, 2012), ce qui est également le cas pour *P. umbilicalis* lorsque cultivée pendant 4 jours à une concentration de 250  $\mu\text{M}$  et à 10 °C. Le taux de

croissance de cette dernière reste également positif et relativement élevé ( $10\% \text{ j}^{-1}$ ) (Kim et al., 2007). Par contre, des signes de blanchiment des thalles sont observés chez l'algue *Palmaria palmata* après 3 semaines de culture dans des concentrations en ammoniacque élevées égales à la présente étude ( $500 \mu\text{M}$ ). L'augmentation des concentrations jusqu'à  $500 \mu\text{M}$  avait comme effet de réduire son taux de croissance à moins de  $2,21\% \text{ d}^{-1}$  (Grote, 2016).

Il faut noter aussi que la mesure de la biomasse humide sur des frondes de seulement 2 g souffre d'un certain degré d'imprécision. Il y a probablement une variabilité de taux d'humidité et donc de poids causé par les petites différences dans le temps nécessaire aux manipulations, dans l'essuyage des frondes, etc. Chez *P. umbilicalis*, une espèce monostromatique (une couche de cellule d'épaisseur), la croissance ne se traduit pas par une augmentation de l'épaisseur de la fronde, mais par une augmentation de la surface. La prise de photo et la mesure de la superficie des frondes avec un logiciel adapté (p.ex. Image J) constituerait une méthode alternative de mesure de la croissance peut-être mieux adaptée dans le cas de très faibles biomasses (voir par exemple Gendron-Lemieux *et al.*, 2018).

### Conclusion

À la lumière des résultats obtenus, *P. umbilicalis* semble une meilleure candidate que les autres espèces pour absorber l'ammoniacque à court terme, soit après 18 h et 24 h, et ce, dans les deux concentrations testées. Sur une période plus longue de 7 jours, elle est également la meilleure candidate pour réduire les fortes concentrations d'ammoniacque ( $500 \mu\text{mole NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ ), tandis qu'aucune différence d'efficacité d'absorption n'existe entre les deux espèces après 7 jours à faible concentration ( $50 \mu\text{M}$ ).

*P. umbilicalis* est également la seule espèce à avoir enregistré un taux de croissance positif au cours des premières 24 h de culture. Le taux de croissance légèrement négatif enregistré à  $500 \mu\text{M}$  pour cette même espèce ne concorde toutefois pas avec la capacité d'absorption élevée qui lui est associée et cela mérite quelques attentions supplémentaires pour la suite des expériences. Des tests de culture à  $500 \mu\text{M}$  sur une période plus longue, par exemple trois semaines, permettraient également d'évaluer si à cette concentration élevée, il y a un effet toxique de l'ammoniacque sur la santé des thalles.

### **3.1.2. Cinétique d'absorption du $\text{NH}_4^+$ sur 3 semaines**

#### Sous objectif 1.2

Déterminer laquelle des deux espèces locales de *Porphyra sp.* (*Porphyra sp.*, non identifiée à l'espèce, et *P. umbilicalis*) possède le meilleur potentiel pour l'absorption de l'ammoniacque dissous, lorsque cultivée *in vitro* dans deux concentrations d'ammoniacque ( $150$  et  $500 \mu\text{M}$ ), à  $10^\circ\text{C}$ , sur une période de 3 semaines.

#### Matériel et méthodes

Tout comme pour l'expérience précédente, une période d'acclimatation en circuit ouvert d'une semaine a été respectée avant le début de l'expérience de 3 semaines. Les paramètres durant cette période étaient similaires à ceux de l'expérience de 24 h. Avant de débiter l'expérience, *Porphyra sp.* a démontré des signes de dégradation et la quantité de thalles disponibles s'est avérée trop faible pour mener à bien l'expérience. De plus, comme les résultats de l'expérience de 24 h favorisaient l'espèce *P. umbilicalis* pour la suite des expériences, il a été décidé que seule cette espèce serait considérée. La structure de l'expérience de 3 semaines a donc été ajustée. Il est à noter que de nouvelles frondes ont été utilisées pour cette section des expériences.

Le nouvel objectif de l'expérience a été formulé comme suit : Mesurer l'efficacité d'absorption de l'ammoniacque totale dissoute de *P. umbilicalis* ainsi que son taux de croissance dans des conditions de moyenne et forte concentration d'ammoniacque totale ( $150$  et  $500 \mu\text{M}$ ) sur une période de 3 semaines.

Pendant l'expérience, les thalles de *P. umbilicalis* ont été cultivés dans des ballons en verre d'une capacité de 6 L, avec une densité de culture de 0,5g/L dans 4 L. Les thalles ont été cultivés avec les mêmes équipements que pour l'expérience de 24h ainsi qu'avec les mêmes paramètres de culture. Les mêmes procédures ont été utilisées pour ajuster les concentrations d'ammoniaque dans les ballons en verre. Chacune des concentrations d'ammoniaque (150 et 500  $\mu\text{M}$ ) a été répliquée 6 fois. Un témoin sans algue avec ajout d'ammoniaque à 150  $\mu\text{M}$  et un second témoin sans algue, mais avec ajout de 500  $\mu\text{M}$  ont été utilisés afin de s'assurer que les diminutions de concentration d'ammoniaque observées chez les traitements étaient bien dues à la présence des algues.

Finalement, un témoin avec algues, mais sans ajout de nutriments a été répliqué deux fois, pour un total de 16 ballons. L'utilité du dernier témoin était de comparer, à titre indicatif seulement, la croissance des algues sans ajout de nutriment à celles avec ajout de nutriment. À noter que ce témoin aurait pu être utilisé comme un traitement à part entière, mais que la quantité de traitements a été limitée en raison d'une restriction au niveau du matériel et du budget disponible. La quantité d'ammoniaque naturellement présente dans l'eau de mer à cette période de l'année n'a pas directement été mesurée aux fins de cette expérience. Néanmoins, la concentration d'ammoniaque totale dans les océans se retrouve souvent sous la limite de détection. Elle est généralement de moins de 0,3  $\mu\text{M}$  (Paulot *et al.*, 2015). De plus, entre 1994 et 2008, les concentrations de nitrate ( $\text{NO}_3^-$  forme d'azote dominante dans les océans), dans la couche superficielle de surface (0 m) n'ont pas dépassé 15  $\mu\text{M}$  et sont restées la plupart du temps en dessous de 10  $\mu\text{M}$  pour la période d'août et septembre à la station côtière du quai de Gascons qui est en zone non eutrophisée (communication personnelle Michel Star, Institut Maurice-Lamontage; données provenant du programme de monitoring des algues toxiques du MPO).

Pour la première semaine d'expérience (6 jours consécutifs), le suivi des concentrations en ammoniaque totale s'est effectué par le prélèvement d'un échantillon d'eau de 15 ml aux temps 0 h, soit juste avant l'ajout des algues, 48 h, 96 h et 168 h. Pour la deuxième et la troisième semaine d'expérience, un échantillon d'eau était prélevé aux temps 0 h et 168 h. Le traitement des échantillons jusqu'à leur analyse a été effectué de la même manière que la précédente expérience. L'intensité lumineuse était mesurée à chaque temps 0 h de chaque semaine. Le pH et la température de l'eau dans chacun des ballons étaient mesurés aux mêmes temps que pour les prises d'échantillon d'eau. La biomasse était pesée à chaque temps 0 h et 168 h afin de connaître le taux de croissance à la fin de chacune des semaines. Entre chaque semaine, les ballons étaient rincés trois fois à l'eau nanopure. De la nouvelle eau de mer tempérée à 10 °C était versée dans les ballons, et le poids des algues était ajusté à 0,5 g/L en conservant les mêmes algues. Si le taux de croissance enregistré était négatif, des morceaux de nouvelles frondes étaient ajoutés pour atteindre ce même poids de départ. La concentration d'ammoniaque de départ était également réajustée dans le même ballon ; p. ex : un ballon ayant reçu 150  $\mu\text{M}$  la première semaine gardait donc la même concentration tout au long des 3 semaines de l'expérience.

### Résultats et discussion

Durant les 3 semaines de l'expérience, la température de l'eau tout traitement confondu s'est maintenue à une moyenne de  $11,0 \pm 1,3$  °C, l'intensité lumineuse à une moyenne de  $140 \pm 11$   $\mu\text{moles photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$  et le pH à une moyenne de  $7,63 \pm 0,15$ .

## Absorption et fluctuation des concentrations d'ammoniaque totale

Pour le traitement 500  $\mu\text{M}$ , la diminution d'ammoniaque à la semaine 1 est de  $78,7 \pm 13,1$  % (Tableau 1). En effet, la concentration d'ammoniaque totale passe de  $485,6 \pm 76,7$   $\mu\text{M}$  (concentration initiale réelle) à  $< 150$   $\mu\text{M}$ , plus spécifiquement  $103,75 \pm 63,34$   $\mu\text{M}$  (Figure 7). Puisque 5,4 % de diminution est observé chez le témoin pour cette même période, environ 73 % de la diminution chez le traitement peut être attribué à l'effet d'absorption des algues. À la semaine 2, la concentration d'ammoniaque totale passe de  $495,33 \pm 40,86$   $\mu\text{M}$  à  $386,13 \pm 59,29$   $\mu\text{M}$ , ce qui représente une diminution de  $21,8 \pm 11,6$  %. Toutefois, seulement 3 % de diminution peut en réalité être attribué à la présence des algues puisque le témoin enregistre une diminution de plus de 18 %. À la semaine 3, une diminution de 5 % de la concentration en ammoniaque totale observée peut être attribuée à l'effet d'absorption des algues. Finalement, la diminution d'ammoniaque totale observée chez les traitements à la semaine 1 (73 %) est significativement plus élevée que celles observées à la semaine 2 (3 %) ( $p < 0,01$ ) et 3 (5 %) ( $p < 0,01$ ).

Pour le traitement 150  $\mu\text{M}$ , la concentration réelle initiale d'ammoniaque totale de  $143,43 \pm 12,58$   $\mu\text{M}$ , descend à moins de  $6,42 \pm 11,23$   $\mu\text{M}$  pour la semaine 1 (Figure 8), ce qui représente une diminution de plus de  $95,7 \pm 7,3$  % (Tableau 4). Toutefois, la diminution attribuable à l'effet d'absorption des algues est de 55 %, puisque le témoin enregistre une baisse de 40 %. À la semaine 2, le traitement enregistre une diminution de  $64,7 \pm 32,3$  %, la concentration de départ de  $140,89 \pm 6,60$   $\mu\text{M}$  diminue donc jusqu'à  $49,60 \pm 44,75$   $\mu\text{M}$ . Après vérification avec le témoin équivalent, la diminution attribuable aux algues est de 53 %. À la semaine 3, l'effet d'absorption des algues est responsable d'une diminution d'environ 28 % de l'ammoniaque total. Finalement, la diminution d'ammoniaque totale chez les traitements observés à la semaine 1 (55 %) n'est pas significativement différente de celle observée à la semaine 2 (53 %). Par contre, elle est significativement plus élevée que celle observée à la semaine 3 (28 %) ( $p < 0.01$ ).

**Tableau 1. Pourcentage de diminution (%; moyenne  $\pm$  écart-type) des concentrations d'ammoniaque totale des deux traitements de concentration d'ammoniaque (150  $\mu\text{M}$  et 500  $\mu\text{M}$ ) et des témoins correspondants, durant les trois semaines d'expérience.**

	Traitement 500 $\mu\text{M}$	Témoin 500 $\mu\text{M}$ (sans algue)	Différence (diminution attribuable aux algues à 500 $\mu\text{M}$ )	Traitement 150 $\mu\text{M}$	Témoin 150 $\mu\text{M}$ (sans algue)	Différence (diminution attribuable aux algues à 150 $\mu\text{M}$ )
<b>Semaine 1</b>	$78,7 \pm 13,1$ %	5,4 %	~ 73 %	$95,7 \pm 7,3$ %	40,4 %	~ 55 %
<b>Semaine 2</b>	$21,8 \pm 11,6$ %	18,5 %	~ 3 %	$64,7 \pm 32,2$ %	11,7 %	~ 53 %
<b>Semaine 3</b>	$13,2 \pm 12,8$ %	7,8 %	~ 5 %	$36,7 \pm 17,7$ %	8,2 %	~ 28 %

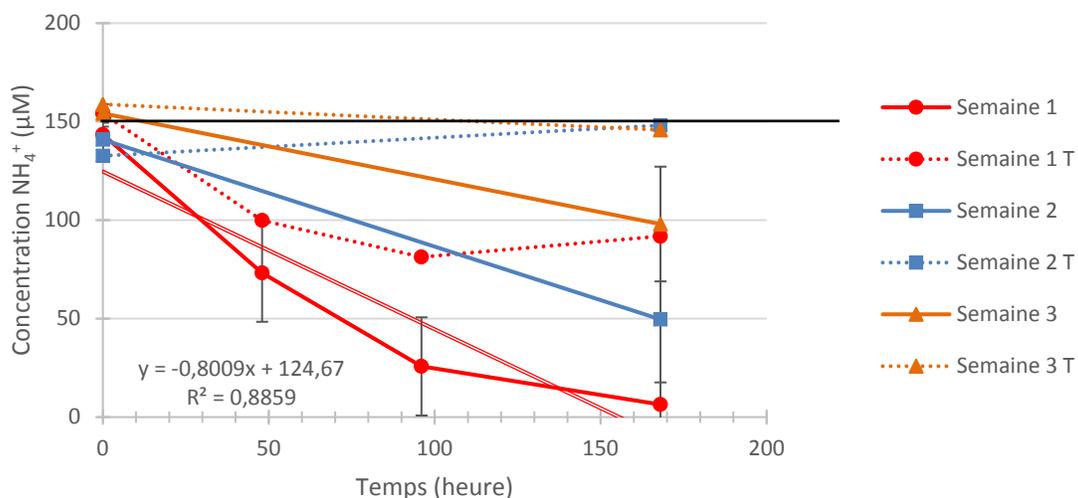


Figure 7. Changements dans la concentration d’ammoniaque ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) pour chacune des trois semaines d’expérience (3 x 6 jours consécutifs), pour le traitement 500  $\mu\text{M}$  et ses témoins. Les courbes en pointillé sont les témoins (sans algue). L’équation de régression est présente pour la semaine 1 (ligne rouge double) et la ligne noire indique le seuil de concentration toxique à ne pas dépasser pour les homards (150  $\mu\text{M}$ ).

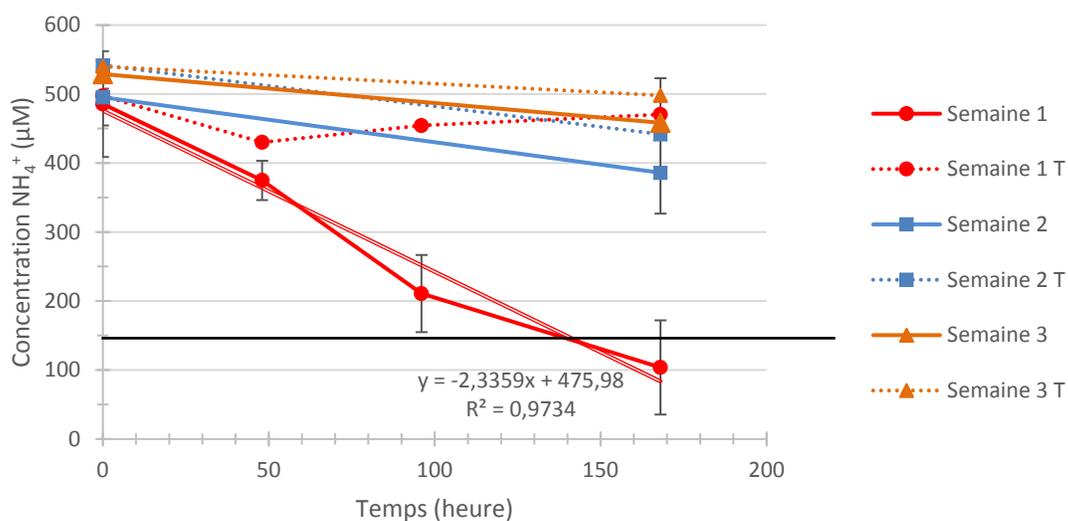
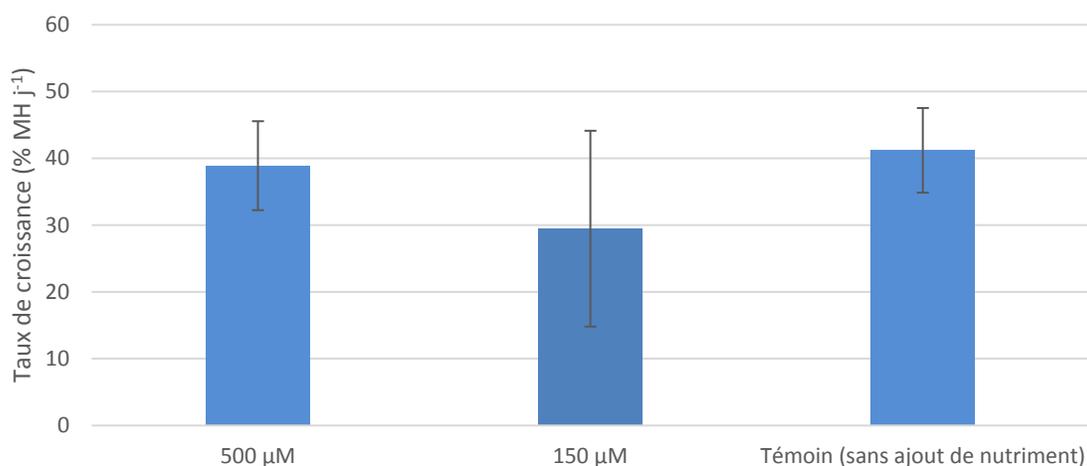


Figure 8. Changements dans la concentration d’ammoniaque ( $\mu\text{M}$ ) en fonction du temps (heure) pour chacune des trois semaines d’expérience (3 x 6 jours consécutifs), pour le traitement 150  $\mu\text{M}$  et ses témoins. Les courbes en pointillé sont les témoins (sans algue). L’équation de régression est présente pour la semaine 1 (ligne rouge double) et la ligne noire indique le seuil de concentration toxique à ne pas dépasser pour les homards (150  $\mu\text{M}$ ).

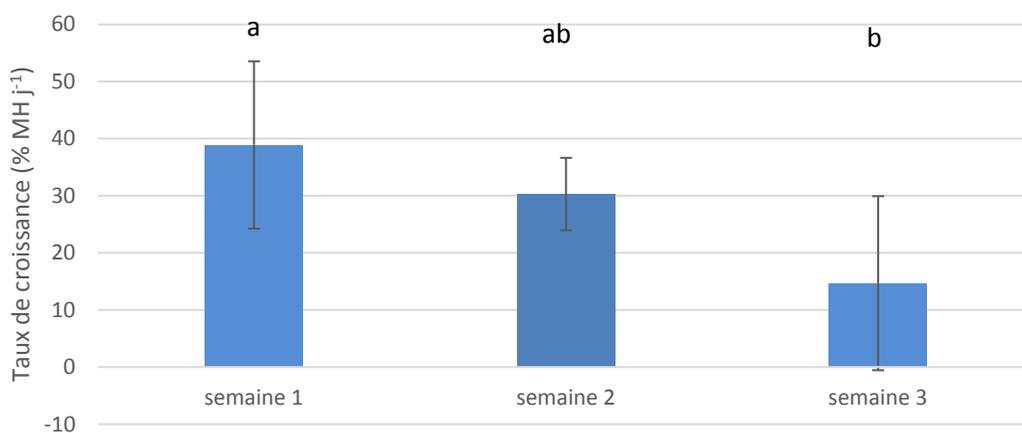
### Taux de croissance

À la fin de la première semaine d’expérience, le taux de croissance de *P. umbilicalis* n’était pas significativement différent entre les traitements ( $p = 0,136$ ). Ces taux de croissance moyens étaient de  $38,9 \pm 6,7 \text{ } \% \text{ MH j}^{-1}$  pour le traitement 500  $\mu\text{M}$ ,  $29,5 \pm 14,7 \text{ } \% \text{ MH j}^{-1}$  pour le traitement 150  $\mu\text{M}$  et de  $41,2 \pm 6,3 \text{ } \% \text{ MH j}^{-1}$  pour le témoin sans ajout de nutriment (Figure 9).



**Figure 9. Taux de croissance moyen  $\pm$  écart-type (% MH j<sup>-1</sup>) de *P. umbilicalis* en fonction des concentrations d'ammoniaque totale (500  $\mu$ M et 150  $\mu$ M) dans le milieu de culture et taux de croissance dans le traitement témoin (sans ajout de nutriment) pour la semaine 1.**

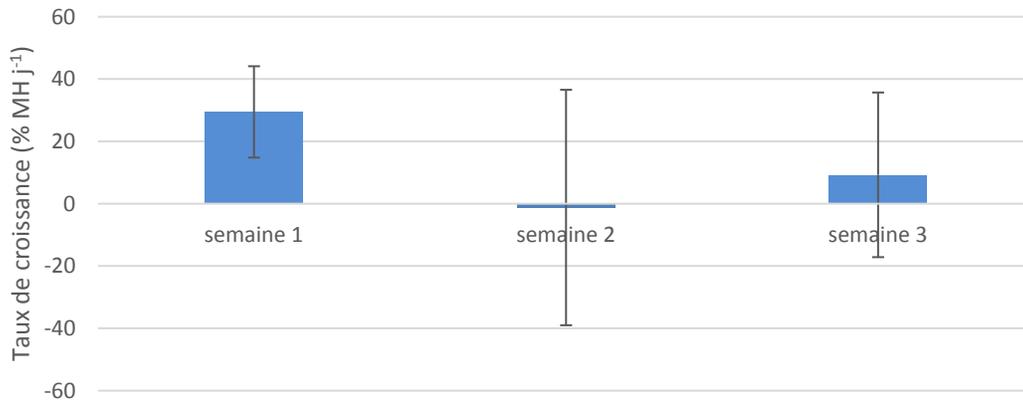
La croissance de l'algue observée à 500  $\mu$ M tend à diminuer avec le temps. En effet, à la semaine 3, le taux de croissance ( $14,7 \pm 13,2$  % MH j<sup>-1</sup>) est significativement plus petit qu'à la semaine 1 ( $38,9 \pm 6,7$  % MH j<sup>-1</sup>) ( $p = 0.01$ ) (Figure 10). À titre indicatif, le taux de croissance moyen est de  $28,0 \pm 15,5$  % MH j<sup>-1</sup>.



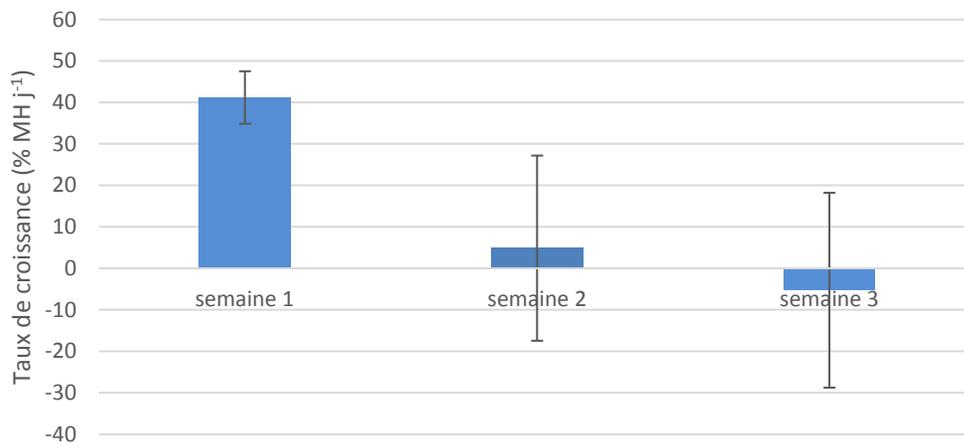
**Figure 10. Changements du taux de croissance moyen  $\pm$  écart-type (% MH j<sup>-1</sup>) de *P. umbilicalis* cultivée dans une solution 500  $\mu$ M en fonction du temps (semaine). Les lettres différentes entre les traitements indiquent une différence significative ( $p < 0.05$ ).**

Il n'y a pas de différence significative entre les taux de croissance mesurés pendant les différentes semaines d'expérience pour le traitement 150  $\mu$ M ( $p = 0,188$ ) (Figure 11). Le taux de croissance enregistré à la semaine 1 est de  $29,5 \pm 14,7$  % MH j<sup>-1</sup>,  $-1,24 \pm 37,8$  % MH j<sup>-1</sup> à la semaine 2 et  $9,3 \pm 26,4$  % MH j<sup>-1</sup> à la semaine 3. Le taux de croissance moyen pour l'ensemble de l'expérience est de  $12,5 \pm 29,3$  % MH j<sup>-1</sup>.

Comme l'expérience ne comprenait que deux ballons témoins, il est impossible de valider si les différences observées entre les semaines sont significatives ou non (Figure 12). Les grands écarts-types observés pour les semaines 2 et 3 s'expliquent par le fait que les algues d'un des ballons ont maintenu une croissance positive à travers les semaines (taux de croissance de 25,1 %, 18,2 % et 14,0 % MH j<sup>-1</sup> aux semaines 1, 2 et 3), alors les algues du second ballon se sont graduellement dégradées (16,1 %, -13,4 %, -19,2 % MH j<sup>-1</sup> aux semaines 1, 2 et 3). Le taux de croissance moyen à la semaine 1 est de 40,2 ± 6,3 % MH j<sup>-1</sup> et il est de 4,9 ± 22,3 % MH j<sup>-1</sup> et de -5,3 ± 23,5 % MH j<sup>-1</sup> aux semaines 2 et 3.



**Figure 11. Changements du taux de croissance moyen ± écart-type (% MH j<sup>-1</sup>) de *P. umbilicalis* cultivée dans une solution 150 µM en fonction du temps (semaine).**



**Figure 12. Changements du taux de croissance moyen ± écart-type (% MH j<sup>-1</sup>) du témoin de *P. umbilicalis* en fonction du temps (semaine).**

À la première semaine de l'expérience, il n'y a pas de différence significative entre le taux de croissance des algues cultivées à 500 µM, 150 µM et le témoin sans ajout de nutriments. L'eau de mer dans laquelle les algues étaient maintenues en acclimatation avant l'expérience semble donc contenir les conditions nécessaires (nutriments et paramètres de culture) pour soutenir une croissance élevée à la première semaine d'expérience (moyenne de 32,2 ± 12,1 % MH j<sup>-1</sup> tout traitement confondu). Ainsi, l'avantage des algues qui ont été soumises à 500 µM à la semaine 1, allant de pair avec une absorption de 73 %

d'ammoniacque, se révèle plus particulièrement à partir de la semaine 2 et 3. En effet, contrairement aux algues du traitement 150  $\mu\text{M}$ , les algues du traitement 500  $\mu\text{M}$  maintiennent un taux de croissance positif (Figure 10) durant cette période alors qu'elles n'absorbent qu'entre 3-5 % de 500  $\mu\text{M}$  d'ammoniacque (équivalent à environ 15-25  $\mu\text{M}$ ) contrairement à 28-53 % de 150  $\mu\text{M}$  d'ammoniacque (équivalent à environ 42-75  $\mu\text{M}$ ) (Tableau 1).

Lorsque cultivée avec une concentration en ammoniacque totale de 150 et de 500  $\mu\text{M}$ , la capacité d'absorption des algues tend à diminuer entre les semaines 1 et 3 (de 55 % à 28 % à 150  $\mu\text{M}$  et de 73 % à 5 % à 500  $\mu\text{M}$ ) (Tableau 1). Le taux de croissance tend également à diminuer entre les semaines 1 et 3 chez les deux traitements (de  $29,5 \pm 14,7$  à  $9,3 \pm 26,4$  %  $\text{MH j}^{-1}$  à 150  $\mu\text{M}$  et de  $38,9 \pm 6,7$  à  $14,7 \pm 13,2$  %  $\text{MH j}^{-1}$  à 500  $\mu\text{M}$ ). De plus, des taux de croissance négatifs ont même été enregistrés aux semaines 2 et 3 à 150  $\mu\text{M}$  (Figure 11, voir écarts-types), tout comme chez les témoins d'ailleurs (Figure 12, voir écarts-types). Dans le cas du traitement 150  $\mu\text{M}$ , l'ammoniacque totale absorbée au fil des semaines, pourrait bien avoir été utilisée pour la création de nouveaux tissus, mais à un rythme globalement inférieur à la dégradation des tissus plus anciens comme ce qui a été observé chez *P. yezoensis* (Carmona *et al.*, 2006) ou encore chez les laminaires (comm. personnelle Éric Tamigneaux, 2020).

S'il est pris en considération, pour être plus représentatif d'une culture à long terme, que les résultats obtenus en fin d'expérience, alors les performances de *P. umbilicalis* dans ce projet sont en deçà de celles observées, par exemple, chez Carmona *et al.* (2006). Cet auteur observe que *P. umbilicalis* enlèverait en moyenne 88 % de l'ammoniacque, lorsque cultivée dans un milieu contenant 300  $\mu\text{M}$  d'ammoniacque pendant 7 jours (Carmona *et al.*, 2006), contrairement à 5 % durant la semaine 3 à 500  $\mu\text{M}$  dans la présente étude. Lorsque cultivée sous 150  $\mu\text{M}$  d'ammoniacque, *P. umbilicalis* absorberait en moyenne 99 % de l'ammoniacque après seulement 3-4 jours tout en maintenant un taux de croissance de 13,1 %  $\text{MH j}^{-1}$  (écart-type inconnu) et sans jamais enregistrer de taux de croissance négatif (Carmona *et al.*, 2006), le taux de croissance à la semaine 3 de la présente étude à 150  $\mu\text{M}$  étant de  $9,3 \pm 26,4$  %  $\text{MH j}^{-1}$ . Des taux de croissance moyens de 9 % par jour en bassins pour *P. umbilicalis* ont été observés (Green et Nefus, 2006) et *P. leucosticta* aurait un taux de croissance comparable à *P. umbilicalis* de 10 % par jour (Kim *et al.*, 2007).

### Conclusions

Dans une perspective de culture sur 3 semaines en utilisant des thalles récoltés à la fin de l'été/début de l'automne, des concentrations de 150 et 500  $\mu\text{M}$  ne semblent pas convenir pour *P. umbilicalis*. En effet, à 150  $\mu\text{M}$ , même si l'algue absorbe plus de 55 % de l'ammoniacque à la semaine 1, cette capacité d'absorption tend à diminuer au fil des semaines et des taux de croissance négatifs ont même été obtenus à partir de la semaine 2. À 500  $\mu\text{M}$ , le taux de croissance ainsi que la capacité d'absorption diminuent également au fil des semaines, ce qui ne leur permettent plus d'atteindre la cible désirée, soit < 150  $\mu\text{M}$ . En effet, cette cible n'est atteinte qu'à la semaine 1, soit lorsque la condition des algues (réserves tissulaires et paramètres de culture) est au stade préexpérience.

Afin d'optimiser le taux de croissance et la capacité d'absorption d'ammoniacque dans des concentrations élevées en ammoniacque, quelques pistes sont suggérées pour des travaux futurs :

1. **Utiliser des thalles de printemps plutôt que d'automne.** Les expériences de bioremédiation ont été menées avec des frondes de fin d'été/début d'automne. Durant cette saison au Québec, les thalles de *P. umbilicalis* se préparent à la reproduction, comme en témoigne les observations faites par binoculaire (voir section 3.2.1 et 3.2.2). Il est bon de se demander si la période automnale ne se traduirait pas par une pause dans la croissance pour favoriser la reproduction

ou si l'algue ne se retrouve pas trop stressée par les températures élevées de l'été/début d'automne. Au printemps, les frondes sont probablement dans leur pic de croissance. L'utilisation de jeunes frondes prélevées directement du milieu naturel ou obtenues à partir de spores et cultivées en bassins pourrait potentiellement être bénéfique pour les essais de bioremédiation puisqu'en général, les jeunes thalles tendent à avoir une capacité d'absorption des nutriments ainsi qu'un taux de croissance plus élevé que les thalles plus âgés (Kraemer et Yarish, 1999). Cela a notamment été observé chez *Porphyra yezoensis* (Hafting, 1999).

2. **Faire des ajouts d'éléments nutritifs supplémentaires pour stimuler l'absorption de l'ammoniaque.** En effet, dans la présente étude, aucun ajout de microéléments n'a été fait, ni aucun ajout de phosphore afin de maintenir un ratio moléculaire de 10:1 (N:P) comme c'est habituellement fait dans les études portant sur la séquestration de l'azote (Carmona *et al.*, 2006). Dans le milieu naturel, plus de 21 nutriments sont nécessaires pour combler les besoins nutritionnels des algues marines (Lobban et Harrison, 1997) et les macroéléments tels le carbone, l'azote ( $\text{NH}_4^+$  et  $\text{NO}_3^-$ ) et le phosphore ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), sont les plus importants (Harrison et Hurd, 2001). Des carences en nutriments, de quelque nature que ce soit, peuvent éventuellement provoquer la dégradation des thalles (Gomez Pinchetti *et al.*, 1998).
3. **Effectuer les expériences de bioremédiation sur le long terme dans des installations à plus grandes échelles.** En effet, les expériences en ballons (petite échelle) permettent d'avoir un contrôle sur plusieurs paramètres de culture, mais l'interprétation des résultats reste limitée. Effectuer les essais à plus grande échelle permettrait d'utiliser un plus grand nombre de thalles par réplicat, d'augmenter la fiabilité des observations, surtout au niveau des mesures de poids pour évaluer le taux de croissance (6 % de taux de croissance équivaut à 0,12 g, soit une goutte d'eau en trop restée sur les thalles lors de la pesée), et d'être plus représentatif d'un système opérationnel.
4. **Introduire des périodes de carences nutritionnelles durant les tests.** En effet, ces périodes de carence permettraient de diminuer les concentrations de N et P dans les cellules des thalles et donc de stimuler davantage l'absorption des nutriments une fois que les frondes sont remises en contact avec de fortes teneurs en nutriments. Par exemple, après une semaine, les frondes dans le biofiltre pourraient être remplacées par de nouvelles frondes conservées dans un bassin de stockage en circuit ouvert alors que les frondes saturées remplaceraient les nouvelles dans le bassin de stockage. L'alternance entre ces deux stocks d'algues pourrait favoriser l'optimisation de la capacité de bioremédiation des algues.

## 3.2. Objectif 2

### 3.2.1. Phénologie en Gaspésie

#### Sous objectif 2.1

Identifier quelques lieux de récolte possible, documenter les signes de fertilité et déterminer le degré de fertilité des frondes.

#### Méthodes

À différents intervalles de temps entre le printemps et l'automne, plusieurs sites caractérisés par un substrat rocheux et un accès facile au bas de la zone intertidale ont été visités. Des photos ont été prises dans les zones où *Porphyra* est présente (Tableau 2).

#### Résultats

Les explorations réalisées entre juin 2019 et juin 2020 dans le cadre du projet ont permis d'observer la présence de l'espèce *Porphyra sp.* à plusieurs endroits dans la région entre Grande-Rivière et Port-Daniel

en Gaspésie (Tableau 2 et figures 13, 14 et 15). À cette étape du projet, la texture caoutchouteuse et l'apparence plissée de la fronde, le crampon positionné au centre de la fronde, le froncement caractéristique de la fronde, en forme d'ombilic, autour du crampon, la couleur verte olive à la base qui change graduellement vers un rouge brun clair parfois caramel vers la marge, la forme généralement arrondie et la finesse de la fronde ainsi que la présence d'une transition marquée (bande blanche) entre les structures végétatives et les structures reproductrices étaient les caractères utilisés pour identifier les spécimens de *Porphyra umbilicalis* (Saunders 2020) (Figure 13). Des spécimens de ce qui pourrait être *P. miniata* ont également été observés (Figure 13).

En Gaspésie, des spécimens de cette espèce ont été fréquemment observés sur les rochers du haut de la zone intertidale, au même niveau que les fucus, en particulier sur les brises lames des ports et des marinas (Figure 14). Le plus souvent les spécimens étaient regroupés en peuplements denses sur les faces verticales et horizontales de certains rochers, alors que les rochers proches en étaient dépourvus (Figure 14 d). Les frondes étaient facilement accessibles lors des marées basses, en particulier pendant les marées de vives-eaux, quand la majorité des frondes étaient hors de l'eau. Aux mois de juin 2019 et juin 2020, de grandes quantités de frondes de 10-30 cm de longueur, détachées de leur substrat, flottaient souvent près du rivage de certaines plages en Gaspésie. Sous un fort éclairage, les fines frondes translucides avaient une couleur brun caramel plutôt que rouge entre juin et août 2019. Après la mi-septembre 2019 et en avril 2020, les frondes étaient plus pigmentées et de couleur rouge.

En milieu naturel, les frondes récoltées en 2019 étaient propres et sans biosalissures ou épiphytes. Les frondes récoltées en septembre abritaient une grande quantité de petits escargots herbivores de type lacune de mer (*Lacuna vincta*) et il était nécessaire de retirer ces escargots avant de transférer les frondes dans les bassins de stockage. Du printemps jusqu'en automne 2019, la marge de la plupart des frondes était décolorée, avec une bande de couleur blanche sur le pourtour des frondes. En avril 2020, par contre, il n'y avait pas de marge décolorée visible sur le pourtour des frondes (Figure 15).

Des plantules de *P. umbilicalis* à différents stades de développement ont été observées sur la marge d'une fronde en avril 2020 (Figure 20). En mai 2020, des grandes (20-40 cm) frondes bien pigmentées et en parfait état ont été observées à la dérive près de la plage de Pabos. Un examen au microscope a montré que ces frondes étaient dépourvues de salissures et que la marge était constituée de cellules végétatives, sans trace de sporange et sans bordure décolorée. Plusieurs frondes ont des fragments de *Ulva*, de *Chondrus crispus* ou d'algues brunes filamenteuses attachées à leur crampon, ce qui suggère qu'elles s'étaient développées en épiphytes. La première semaine de juin 2020 à Pabos, il y avait beaucoup de frondes détachées en bon état et propres à la dérive en bord de plage ou dans les cuvettes à marée basse. Les frondes fixées sur les rochers en bordure de la plage de Pabos étaient nombreuses et bien développées, avec ce qui ressemblait à des sporanges sur les marges.

### Conclusions

Cette partie du projet a permis de vérifier que le genre *Porphyra* était relativement commun dans plusieurs zones rocheuses entre Percé et Port-Daniel et que les frondes étaient présentes jusqu'en haut de la zone intertidale. À marée basse, les frondes partiellement desséchées et collées aux rochers étaient peu visibles. La majorité des frondes échantillonnées avaient les caractéristiques morphologiques de *P. umbilicalis*, mais cette identification provisoire devra être confirmée par une analyse de barcoding moléculaire (DNA barcoding). Les frondes en milieu plus exposé sont de plus grandes tailles que les frondes en milieu exposé.

**Tableau 2. Liste des endroits où des frondes de *Porphyra sp.* ont été observées ou récoltées en Gaspésie pour les activités d'identification, de suivi de la fertilité et d'essais de sporulation.**

Lieu	Date d'observation ou de récolte	Observations
Anse à Dominique, Pointe-au-Maquerau (Port-Daniel - Gascons)	1 juillet 2019	
Pabos (Chandler)	9 juin 2019	Beaucoup de grandes frondes détachées qui flottent dans l'eau près du rivage de la plage à l'ouest du pont. La majorité est constituée de frondes de <i>P. umbilicalis</i> , mais il y a aussi quelques spécimens de <i>P. miniata</i> . La majorité des frondes ont une marge blanche (zipper).
Pabos (Chandler)	29 juin 2019	Frondes fertiles. Libération de spores observée au microscope.
Pabos (Chandler)	7 juillet 2019	Petite plage à l'ouest du pont. Frondes avec marge blanche attachées par leur crampon sur les rochers et émergées à marée basse (marée de vives-eaux). La majorité des frondes ont une marge blanche.
Pabos (Chandler)	24 mai 2020	Grandes frondes détachées qui flottent dans l'eau près du rivage. Frondes en excellent état avec une belle pigmentation rouge et aucun signe de fertilité, pas de marge décolorée.
Pabos (Chandler)	6 juin 2020	Frondes de <i>Porphyra</i> propres et de belle apparence sur les rochers et dans les cuvettes de la plage Pabos Ouest. Quelques-unes commencent à laisser voir une fine ligne blanche à la marge. Test de sporulation réussi.
Pabos (Chandler)	24 juin 2020	Nombreuses <i>Porphyra</i> fixées sur rochers sur plage ouest de Pabos. Aussi beaucoup de frondes détachées à la dérive, avec marge blanche.
Chandler	28 juin 2019	Frondes fertiles. Libération de spores observée au microscope.
Chandler	30 août 2019	Beaucoup de frondes de <i>P. umbilicalis</i> attachées sur les rochers du brise-lames à gauche de la marina (milieu + exposé) et émergées à marée basse. Les frondes à cet endroit ont une longueur allant jusqu'à 20 cm alors qu'elles avaient à peine 1-2 cm lors d'une première observation en juin. La majorité des frondes ont une marge blanche.

Lieu	Date d'observation ou de récolte	Observations
Chandler	17 septembre 2019	Beaucoup de frondes de <i>P. umbilicalis</i> attachées sur les rochers du brise-lames à gauche de la Marina (+ exposé) et à droite à l'intérieur de la Marina (+ protégé). En milieu exposé, les roches sont couvertes de petits plants de 5-10 cm de long, tandis que dans l'intérieur du port, ce sont des grandes et larges frondes de 30 -40 cm. La majorité des frondes ont une marge blanche et, à marée basse, elles sont complètement émergées et partiellement desséchées.
Chandler	8 avril 2020	À marée basse (0,1 m), quelques petites frondes de 5-10 cm éparées, émergées et attachées sur les rochers du brise-lames, à gauche de la marina (+ exposées) parmi des frondes de fucus et d'ascophylles du haut de la zone intertidale.
Grande-Rivière	28 septembre 2019	Quelques frondes sur la partie supérieure d'un rocher isolé proche de la plage, en arrière de Merinov. Émergées à marée basse.
Grande-Rivière	10 octobre 2019	Sur les blocs du brise-lames du port (T. Reesor, comm. pers. octobre 2019).
Pointe St-Pierre (Percé)	20 août 2019	Beaucoup de grandes frondes affleurant à la surface et attachées sur les rochers du brise-lames à l'intérieur du petit port de pêche, au bout de la route du quai.

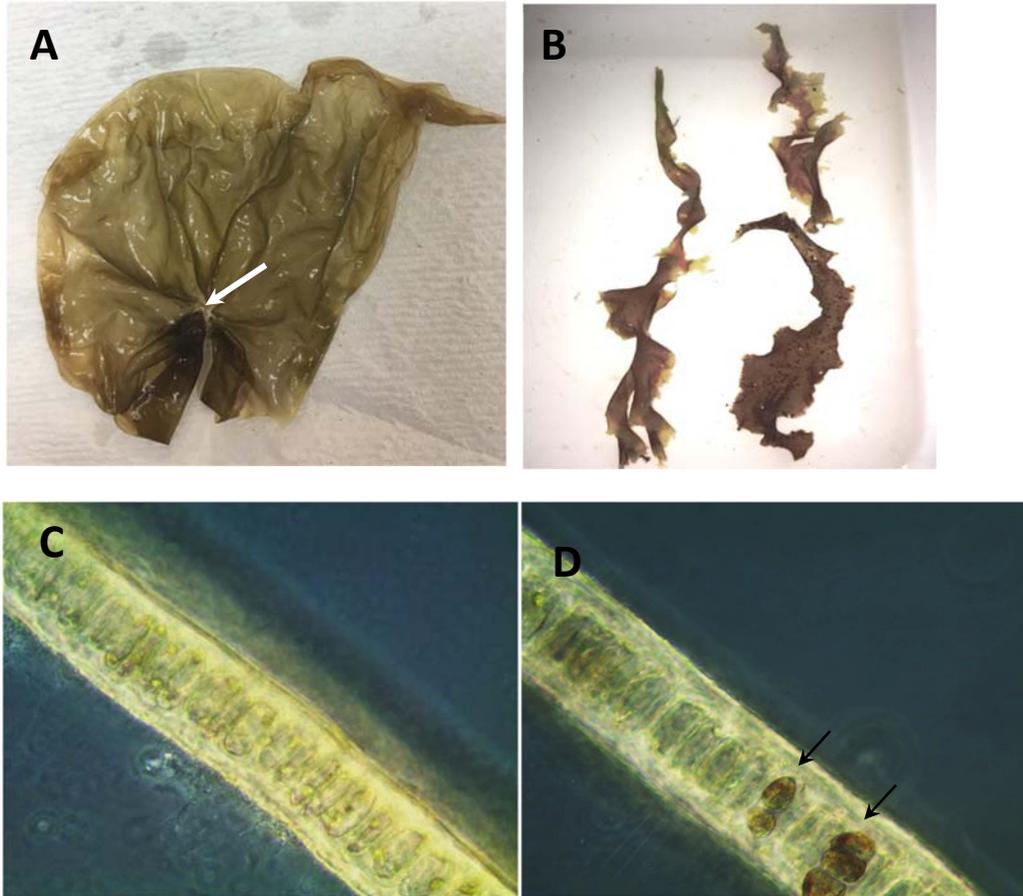


Figure 13. A. Fronde de *Porphyra umbilicalis* de couleur brun caramel avec ombilic plissé vert olive là où se trouve le crampon (flèche blanche). B. Fronde de forme plus allongée et d'une couleur rouge plus marquée, identifiée comme étant probablement *P. miniata*. C. Coupe transversale qui montre le caractère monostromatique de la fronde de *P. umbilicalis* (gross. 10 x 40). D. Coupe transversale dans la partie fertile d'une fronde qui montre des structures foncées qui pourraient être des cellules précurseurs de spores ou des spores (flèches noires) (gross. 10 x 40).



Figure 14. A. Fronde de *Porphyra* sp. de 20-30 cm de long (flèches) sur un rocher dans le haut de l'étage infralittoral à Pabos (Chandler) le 7 juillet 2019 à marée basse (0,3 m au-dessus du zéro des cartes). B. Même endroit et même date, la fine bordure blanche à la marge de la fronde est bien visible (flèches noires). C. Fronde de *Porphyra* sp observées sur la face horizontale d'un bloc de pierre à l'intérieur de la marina de Chandler en août 2019 (flèches noires). D. Fronde de *Porphyra* sp observées sur la face verticale d'un bloc de pierre de la partie extérieure du brise-lames de la marina de Chandler en août 2019.



Figure 15. A, B, C et D : Frondes de *Porphyra sp* (flèches noires) observées sur les blocs de pierre de la partie extérieure du brise-lames de la marina à Chandler le 8 avril 2020 à marée basse (0,1 m au-dessus du zéro des cartes).

### 3.2.2. Coupes et observation au microscope

#### Sous objectif 2.2

Vérifier le caractère monostomatique ou distomatique des frondes dans une optique d'identification taxonomique, se familiariser avec les différentes catégories de cellules et vérifier la présence de (neutro)spores matures.

#### Méthodes

Pendant les observations en bord de mer, des fragments de frondes ont été prélevés avec des ciseaux. Les fragments ont été transportés dans un sac de type *Ziploc* sans eau et ensuite conservés dans un bassin cylindrique transparent de type Kalwall, avec une légère aération provenant du fond du bassin et une alimentation constante en eau de mer non filtrée, dans une salle à température constante (10 °C), éclairée par des néons blancs (18:6). Au laboratoire, la surface des tissus vivants a été observée et photographiée à l'aide d'un microscope binoculaire et d'un microscope photonique équipés d'une caméra et d'un système de traitement informatisé des images (Caméra Infinity 1 et logiciel Infinity Analyze de Teledyne Lumenera). Des coupes transversales fines ont aussi été réalisées avec une lame de rasoir, déposées sur une lame de microscope avec une goutte d'eau de mer et recouvertes d'une lamelle.

## Résultats

Les frondes identifiées comme *P. umbilicalis* sur le terrain sur la base des caractères morphologiques apparents ont été rapportées au laboratoire. L'examen des coupes transversales a montré que les frondes étaient caractérisées par une seule couche de cellules (frondes monostromatiques) (Figure 13c). L'observation de la surface des fragments a permis de reconnaître les cellules rhizoïdes dans les tissus proches du crampon, les cellules végétatives avec leur chloroplaste unique en forme d'étoile qui constituent la surface centrale de la fronde, les cellules en tétrades, précurseurs de (neutro)spores, et les (neutro)spores matures près de la marge des frondes, tels que décrits par Royer *et al.* (2018) (Figure 16).

Les spécimens prélevés entre juin et septembre 2019 avaient souvent une bande de tissu décoloré autour de la marge de la fronde (Figure 13b). La surface décolorée s'est élargie au cours de l'été et en automne, au détriment des tissus végétatifs pigmentés. Même s'il n'y a pas eu de bande sombre bien marquée observée sous la bande décolorée, l'examen de la marge montrait parfois des petites plaques plus sombres avec des cellules foncées, souvent organisées en tétrades, qui ressemblaient beaucoup à ce qui est observé sur les frondes fertiles des tétrasporophytes de *Palmaria palmaria* (Figure 17a et b). Des boursoflures noires avec une apparence de moisissures ont parfois été observées sur les marges des frondes conservées en bassins (Figure 17c et d). L'examen au binoculaire a montré qu'il s'agissait de bulles contenant un agglomérat de cellules rondes sombres (spores?) dans une gelée qui pourrait correspondre au mucilage mentionné par Royer *et al.* (2018).

## Conclusions

Cette partie du projet a permis d'améliorer les connaissances sur la morphologie de l'algue et d'apprendre la distinction entre les tissus végétatifs et les tissus reproducteurs.

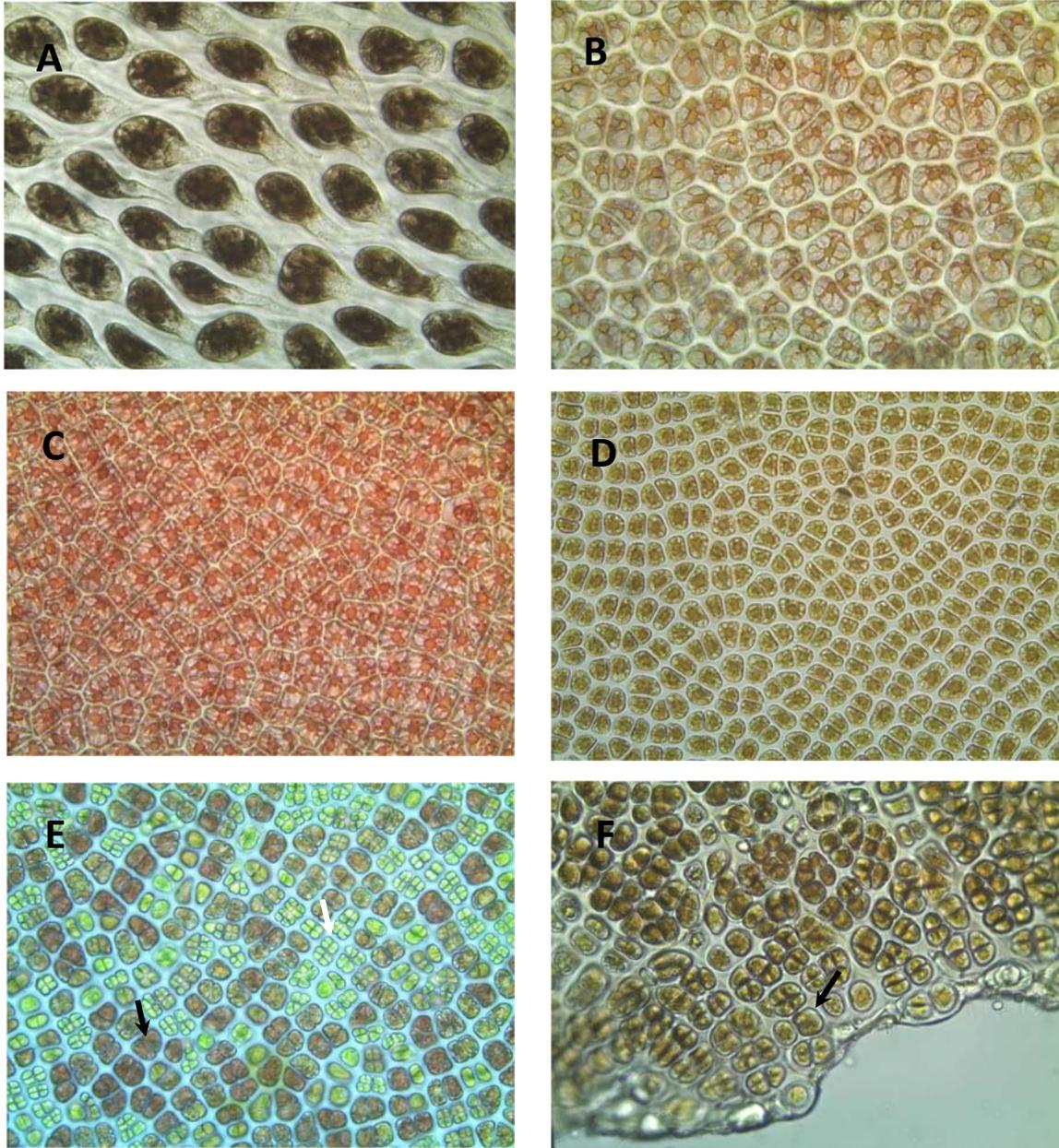


Figure 16. Observation de la surface des frondes de *P. umbilicalis* au microscope. A. Cellules rhizoïdes en forme de poire près du crampon (gross. 10 x 40). B, C et D. Cellules végétatives plus ou moins isodiamétriques, avec un chloroplaste en étoile au centre de la fronde (gross. 10 x 40). E. Cellules en tétrades vert pâle (flèche blanche) correspondant soit aux sporanges précurseurs de (neuro)spore en train de se différencier, soit à des spermatanges. Cellules brun sombre correspondant soit aux sporanges contenant des (neuro)spores, soit à des carposporanges (flèche noire) sous la marge de la fronde (gross. 10 x 40). F. (neuro)spores brunes (flèche noire) à la marge de la fronde (gross. 10 x 40).

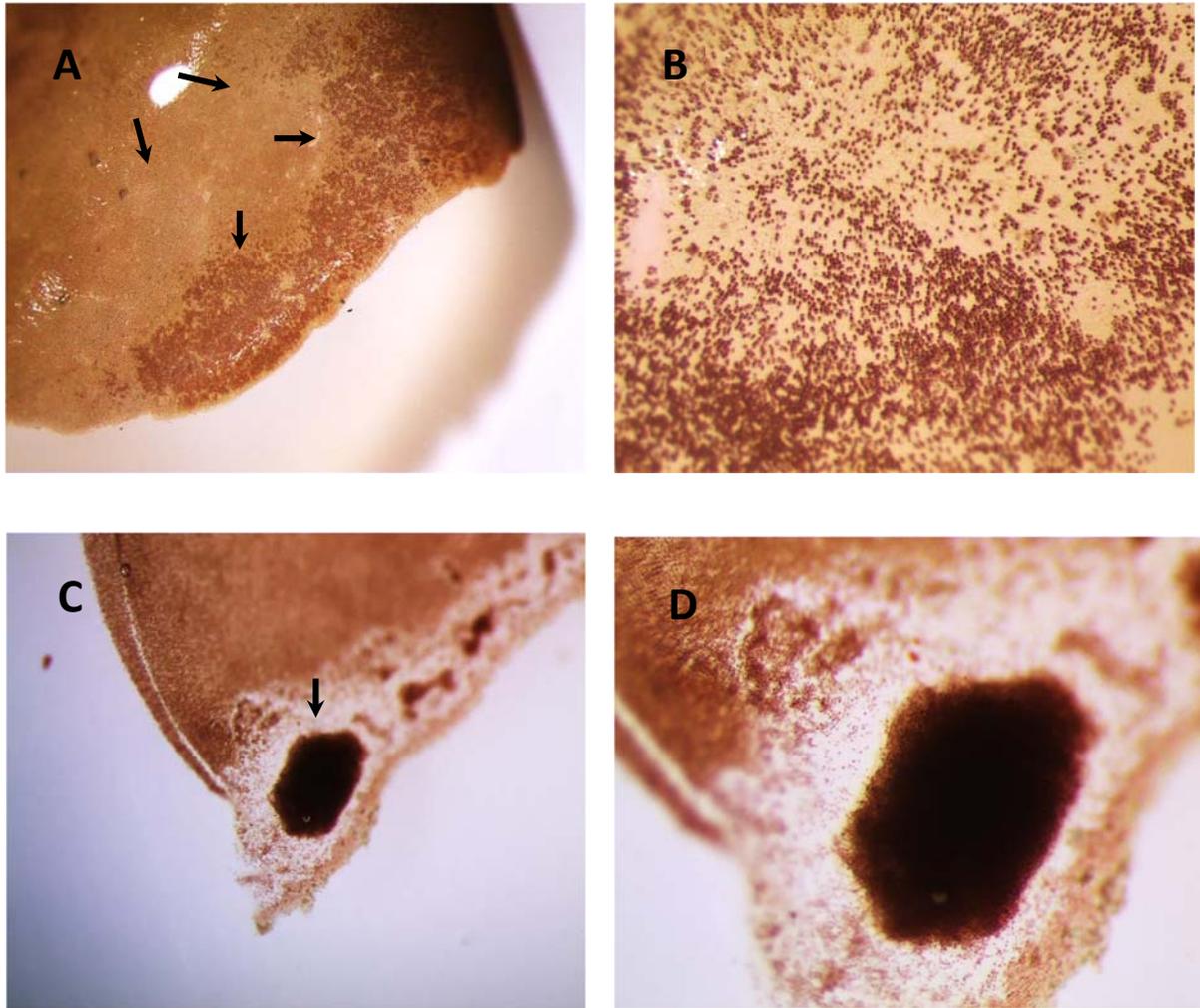


Figure 17. Observation au binoculaire de la surface des frondes de *P. umbilicalis* en septembre 2019. A. Zone fertile (flèches noires) avec des cellules plus sombres à la marge de la fronde (gross. 10 x 1,6). B. Grossissement de la zone fertile (gross. 10 x 4). C. Boursouflure sombre (flèche noire) à l'extrémité d'une fronde (gross. 10 x 1,6). D. Grossissement de la boursouflure (gross. 10 x 2,5).

### 3.2.3. Conservation des frondes en bassins

#### Sous objectif 2.3

Conserver une réserve de frondes fraîches en bon état pour les tests de sporulation et pour les essais de biofiltre et vérifier si la maturation et la production de neutrospores peuvent se poursuivre en bassins.

#### Méthodes

Le 18 septembre 2019, une cinquantaine de frondes correspondant à un poids total humide de 600 g ont été réparties dans deux bassins cylindriques transparents de type Kalwall (46 cm diam., 86 cm de hauteur, 75 cm de hauteur d'eau, soit un volume d'eau de 125 L) avec un fond conique dans une salle à température contrôlée maintenue à 10 °C (Figure 18a). Les bassins étaient alimentés en continu par de l'eau de mer non filtrée (Figure 18b) avec un débit de 461,5 ml par minute, soit un changement d'eau complet toutes les 4,5 h, équivalent à cinq changements d'eau par jour. La température de l'eau dans les bassins a varié entre 12 et 13 °C et la salinité s'est maintenue à 29,9 ‰. Dans la partie supérieure (75 cm), les bassins étaient pourvus d'un drain d'évacuation recouvert d'une grille (Figure 18c) et de l'air sous pression était injecté par le fond du bassin (Figure 18d) avec un débit faible, suffisant pour maintenir les frondes dans un lent mouvement de rotation vertical entre le fond et la surface. L'éclairage d'une intensité de 150-190  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sur la paroi extérieure des bassins était assuré par des néons blancs *Cool White* fixés verticalement sur le mur et programmés pour assurer une photopériode constante de 12:12 (Lum.:Obsc.).

#### Résultats

Pendant trois mois, de la mi-septembre à la mi-novembre les frondes dans les deux bassins sont restées en relativement bon état. L'aération par le fond a permis de maintenir les frondes en mouvement constant, le drain de surface ne s'est pas bouché, la température et la salinité sont restées stables et les parois des bassins sont restées propres. Durant cette période, la bordure blanche des frondes s'est progressivement élargie et les bordures de certaines frondes se sont progressivement repliées sur elles-mêmes au lieu de rester planes. Des zones sombres contenant ce qui semblait être des neutrospores ont été observées sur la marge de certaines frondes pendant la période de conservation en bassins, mais il ne semblait pas y avoir de tendance claire vers un accroissement du nombre de frondes fertiles ou une extension des zones fertiles sur les frondes matures durant la période de maintien en bassins.

À partir de la fin décembre 2019, un enrichissement en nutriments (Fritz A et Fritz B, 0,2 ml L<sup>-1</sup>) a été tenté à deux reprises dans le but de vérifier l'effet sur la croissance et la fertilité. Cet enrichissement a provoqué une prolifération de diatomées et d'algues brunes filamenteuse sur les parois des bassins et aussi sur les frondes de *Porphyra* qui sont devenues inutilisables pour des tests de sporulation. Par la suite, en janvier et en février 2020, il a été observé que les frondes de *Porphyra* étaient de plus en plus recouvertes de biosalissures, dont certaines ressemblaient à des gamétophytes de laminaires. Et de fait, au début de mars 2020, les frondes de *Porphyra* avaient une couleur très sombre et étaient couvertes de petites plantules d'*Alaria esculenta*, de *Saccharina latissima* et de *Saccorhiza dermatodea* de 2 à 4 cm de long. Durant cette période, les frondes de *Porphyra* fortement épiphytées se sont progressivement désagrégées et, au début du mois de mars 2020, il ne restait qu'une petite partie de fronde intacte autour du crampon.

#### Conclusions

Cette partie du projet a permis de montrer qu'il était possible de conserver des frondes en bon état dans une culture en suspension libre durant l'automne et l'hiver. Il serait probablement plus avantageux d'utiliser de l'eau de mer filtrée et désinfectée pour éviter le développement d'algues épiphytes et de diatomées, en particulier si l'ajout de nutriments dans le bassin est envisagé.

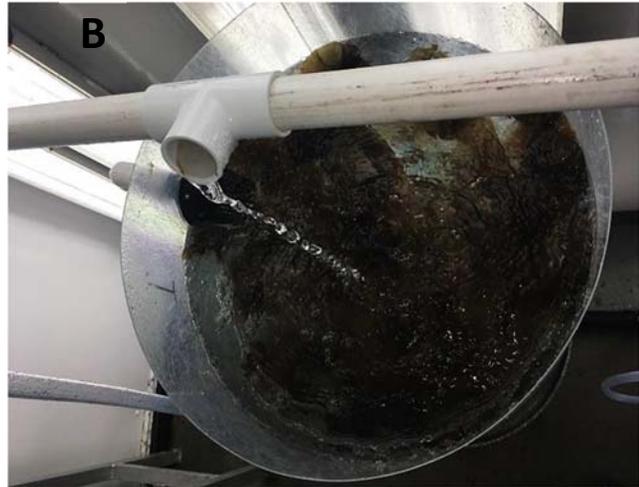


Figure 18. A. Bassins cylindriques utilisés pour le stockage des frondes de *P. umbilicalis*. B. Alimentation continue en eau de mer brute. C. Drain de surface avec grille. D. Injection d'air sous pression par le fond du bassin.

### 3.2.4. Test de sporulation

#### Sous objectif 2.4.

Produire une réserve de frondes cultivées, issues de la germination de (neutro)spores en éclosion, pour ensemer le biofiltre avec des jeunes frondes de qualité.

#### Méthodes

À huit occasions, entre septembre et décembre 2019, des frondes fertiles provenant directement des zones de récolte ou des bassins de stockage ont été sélectionnées sur la base de la présence, le long de la marge, de zones fertiles pigmentées, plus sombres, indicatrice de la présence de (neutro)spores. La présence de (neutro)spores était ensuite confirmée par un examen au binoculaire. Selon les recommandations dans Royer (2017) et dans Redmond *et al.* (2014), les parties fertiles contenant les (neutro)spores ont été excisées au scalpel et découpées en morceaux de 1 cm x 1 cm. Les fragments ont été frottés avec du papier absorbant et rincés ensuite dans un bac contenant de l'eau de mer autoclavée. Après avoir été éponnés, les fragments ont été insérés entre deux couches de papier absorbant opaque et laissés pendant dans un frigo à 10 °C pendant 1 à 2 h jusqu'à ce que les frondes soient partiellement sèches (30 % de leur poids humide), avec une texture caoutchouteuse.

Les fragments ont ensuite été réhydratés en les plongeant dans un bécher rempli avec 500 ml d'eau de mer autoclavée contenant du fertilisant Guillard F/2 (0,2 ml/L) et du dioxyde de germanium (0,1 ml/L). Un aérateur était placé dans le fond du bécher pour créer une agitation vigoureuse. Un échantillon était prélevé toutes les 5 minutes avec une pipette Pasteur, déposé sur une lame de verre, recouvert d'une lamelle et la présence de spores était vérifiée au microscope. Lorsque des spores étaient présentes en grande quantité, l'eau du bécher était filtrée sur deux tamis superposés composés de membrane Nytex avec des mailles de 100 microns et de 50 microns.

Cette suspension de spores a été utilisée de différentes façons. Les premiers tests ont été menés en déposant simplement 8 ml de la solution de spores dans des plats de Pétri en polypropylène vides afin de vérifier et de documenter les étapes de la germination des spores. En novembre, un essai a été réalisé avec des plats de Pétri dans chacun desquels un substrat de culture différent avait été déposé : billes de verre de 2mm diam., corde de nylon blanc tressé 2 mm diam. et corde de kuralon blanc à trois brins, 2 mm diam. À nouveau 8 ml de suspension de spores ont été versés dans chaque Pétri. Les plats de Pétri étaient conservés dans une salle maintenue à 12 °C, sous un éclairage (néon blanc) de 30 micromoles de photon  $m^{-2} s^{-1}$  avec une photopériode de 18 h :6 h (Lum.:Obsc). Tous les deux jours, les plats de Pétri étaient placés sur le plateau du microscope à inversion pour vérifier l'évolution des spores et prendre des photos.

En juin 2020, un dernier essai a été réalisé de la façon suivante. Les frondes récoltées en bord de mer ont été placées dans un sac de type *Ziploc* (sans eau) et conservées 4 jours dans un frigo à 4 °C. Au laboratoire, après examen au binoculaire et au microscope, sept frondes avec des signes de fertilité ont été sélectionnées, frottées et enroulées dans une double couche de papier absorbant et ensuite entreposées une heure dans un incubateur à 10 °C. Ensuite, les bordures extérieures (1 cm) des frondes ont été excisées au scalpel et distribuées dans trois plats Pétri en verre contenant de l'eau de mer à 10 °C contenant des fertilisants (Fritz A, Fritz B) et du dioxyde de germanium. Les plats de Pétri ont été installés sur une plaque agitatrice orbitale (100 rotations par minute) dans un incubateur à 10 °C, sans éclairage. Au bout de 2 jours, les fragments de fronde ont été retirés des plats et un éclairage LED blanc a été ajouté et ajusté pour obtenir une photopériode 16:8 et une intensité de 5 micromoles de photons  $m^{-2} s^{-1}$ . Au

bout de 5 jours, le milieu de culture a été renouvelé et après 8 jours, l'intensité de l'éclairage a été augmentée à 30 micromoles de photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### Résultats

Après réhydratation des fragments fertiles, la libération spontanée de cellules pigmentées, déformables, plus ou moins sphériques, à partir de zones venant d'être excisées a été plusieurs fois observée (Figure 19).

Durant les essais, les spores dans les plats de pétri n'ont jamais montré de signes de germination et, après quelques jours, elles n'étaient plus visibles. Par contre, au bout de quelques semaines, des amas de filaments pigmentés ont été observés dans le fond de plusieurs Pétri et des jeunes frondes vertes, ressemblant à des ulves, se sont développées aussi.

Au moment de l'échantillonnage mené à Chandler le 8 avril 2020, l'examen au microscope a montré que des petits embryons en développement et des petites frondes de quelques millimètres étaient attachés sur la marge de certaines frondes. D'après la morphologie de ces jeunes frondes, il semblerait qu'il s'agisse de jeunes spécimens de *Porphyra* (Figure 20).

Au moment du dernier essai de sporulation le 12 juin 2020, il y a eu une émission massive de grosses cellules de 12-15 microns de diamètre ayant l'apparence de spores (Figure 21). Au bout de 2 jours, certaines étaient allongées et semblaient sur le point de se diviser. Cinq jours après la réhydratation des marges, des tubes de germination en cours d'allongement étaient bien visibles sur certaines spores. Après 15 jours, les spores initiales étaient prolongées par des longs filaments multicellulaires semblables à des gamétophytes d'algues brunes, mais il n'y avait pas de trace d'élargissement, de division latérale ou de formation de frondes. Au bout de 43 jours, les filaments étaient très ramifiés, mais il n'y avait pas de trace d'élargissement, de division latérale ou de formation de frondes.

### Conclusions

Entre juin et septembre, beaucoup de frondes en Gaspésie étaient peu colorées et elles avaient une bordure blanche plus ou moins large. En outre, même si des zones fertiles peu étendues étaient encore visibles en dessous de la bordure blanche, il n'y avait pas de bordure rouge sombre bien définie. Elles avaient probablement déjà sporulé, étaient peut-être aussi stressées par le manque de nutriments et la température élevée de l'eau de surface en été, et la marge des frondes était peut-être abîmée par les herbivores brouteurs (isopodes, gammarides, lacunes). Ce phénomène a déjà été observé dans le Maine (É.-U.) par Blouin *et al.* (2007) et par Brawley (2014).

En Irlande, le pic de fertilité des frondes de *P. umbilicalis* a lieu de janvier à mars (Watson, 2019). Sur la côte est américaine, cette espèce est en mode de reproduction toute l'année sauf durant l'été (Blouin *et al.*, 2007). Les frondes y sont reproductives principalement de la fin de l'automne jusqu'au début du printemps, quand la température de l'eau est basse et que la concentration en nutriments est élevée (Royer 2017). La production de neutrospores y serait d'ailleurs plus élevée (pics de fertilité) en novembre, en janvier et mars (Royer, 2017). Dans la baie de Fundy en Nouvelle-Écosse par contre, selon Curtis (1997), les frondes de cette espèce sont présentes toute l'année et sont fertiles entre avril et août, mais l'océanographie particulière de la baie, avec ses fortes amplitudes et courants de marée, pourrait expliquer cette divergence. L'observation de jeunes embryons et plantules en développement à Chandler au début du mois d'avril 2020 semble confirmer que, en Gaspésie aussi, la reproduction a lieu en hiver (Figure 20).

Si on se base sur ces informations, au Québec, il faudrait idéalement cibler le pic de fertilité qui a lieu l'hiver (janvier-mars dans le Maine et en Irlande), avant le bloom de phytoplancton et la stratification de l'eau du printemps, ce qui au Québec pose un problème d'accessibilité puisque durant cette saison les blocs de roches en milieu exposé sont rendus difficiles d'accès par la neige et la glace. Le début du projet a eu lieu en juin 2019, mais, maintenant que les sites où *P. umbilicalis* est présent ont été identifiés en Gaspésie et aux Îles, un suivi systématique du statut de fertilité des frondes en nature devrait être fait sur une année, en portant une attention à la période entre avril et juin, quand le littoral redevient accessible.

Malgré tout, le stockage de ces frondes dans des bassins alimentés avec de l'eau de mer brute ne s'est pas traduit par un changement de leur pigmentation ou de leur degré de fertilité durant l'automne. Il faudrait tenter d'utiliser la méthode de Royer (2017) qui suggère que, en trois mois, des frondes immatures peuvent être conditionnées à développer des tissus fertiles en les fixant par le crampon sur le bord d'un bassin.

La disparition de la totalité des spores dans les récipients de culture est un phénomène qui a déjà été observé par Blouin (2007) lors de tests de sporulation avec des frondes récoltées en juin et en juillet dans le Maine. Même si des frondes partiellement fertiles sont présentes toute l'année, il y a sans doute une variation saisonnière dans la viabilité des spores. À nouveau, cela indique que des tests devraient être recommencés au printemps. Le fait que les plats de Pétri soient en polypropylène et peuvent développer de l'électricité statique à leur surface quand l'air est sec, semble aussi parfois responsable de la lyse des spores d'algue rouge. Dans ce cas, un rinçage préalable à l'eau de mer ou l'utilisation de plats de Pétri en verre constituent des solutions.

Les amas de filaments pigmentés observés dans le fond des plats de Pétri lors des essais de sporulation en automne 2019 et au printemps 2020 pourraient être des *conchocelis*, le sporophyte filamenteux issu des zygospores du cycle sexué de *Porphyra*. Le *conchocelis* se développe normalement dans les coquilles calcaires des mollusques (Redmond *et al.*, 2014). Le fait que les spores obtenues aient, à plusieurs reprises, germé pour former des filaments au lieu de jeunes embryons de plantules signifierait soit que *P. umbilicalis* ne forme pas de neutrospores à ces périodes de l'année dans le golfe du Saint-Laurent, soit que les frondes utilisées appartenaient à une autre espèce. Selon plusieurs auteurs, sur la côte est de l'Atlantique, *P. umbilicalis* se multiplierait uniquement selon un mode asexué, avec dispersion de neutrospores (Redmond et collab., 2014). Cela souligne encore une fois la nécessité de réaliser une identification des frondes avec des outils moléculaires.

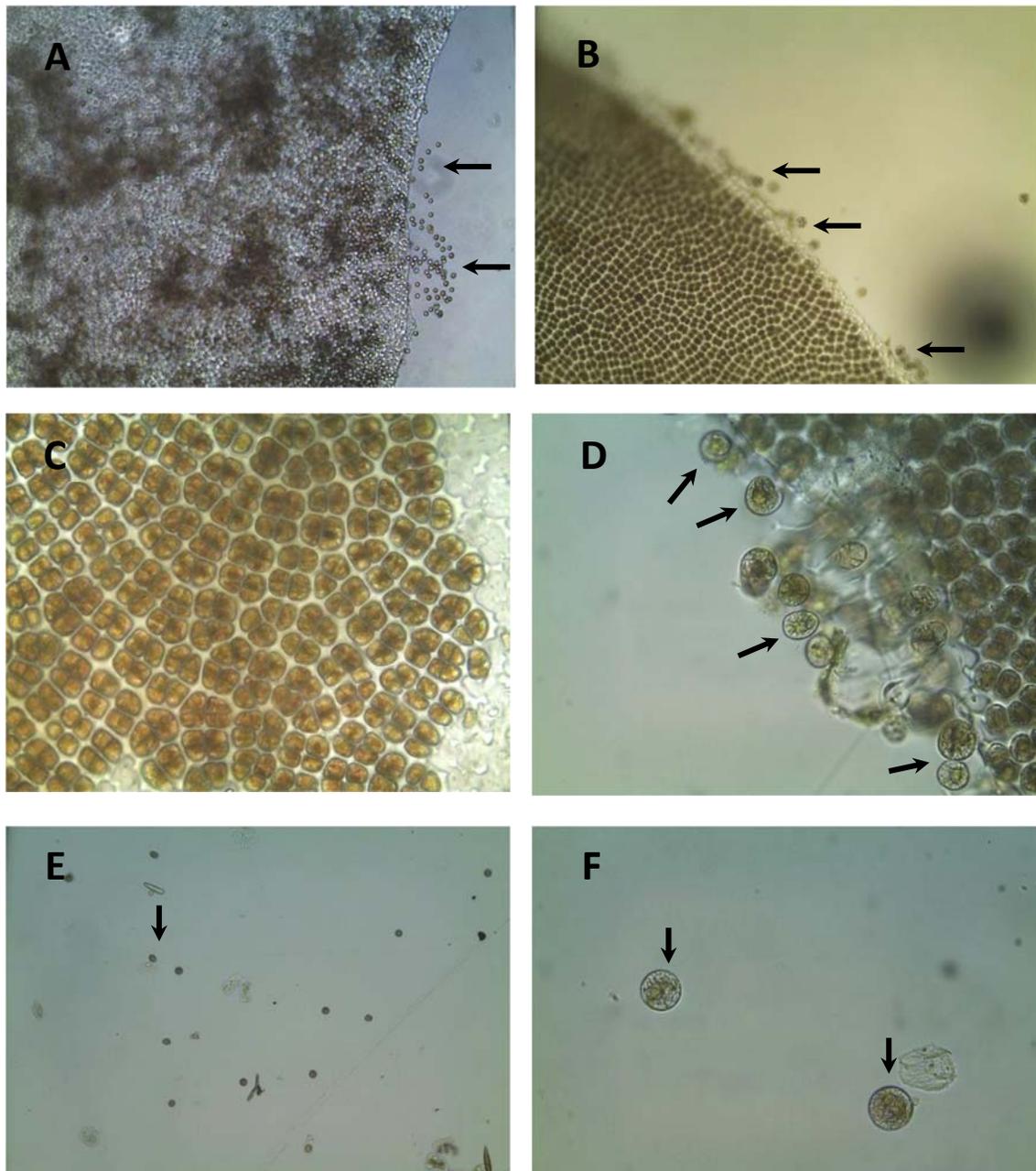


Figure 19. Observations de la surface des frondes de *P. umbilicalis* au microscope. Expulsion des (neuro)spores (flèches noires) à partir d'une zone déjà partiellement vidée de ses spores le 1<sup>er</sup> octobre 2019 (A) et à partir d'une zone fertile intacte, le 25 novembre 2019 (B) (gross. 10 x 10). C. Sporangies contenant des (neuro)spores sur la bordure d'une fronde, le 20 septembre 2019 (gross. 10 x 40). D. Expulsion de (neuro)spores (flèches noires) à la bordure d'une fronde le 25 novembre 2019 (gross. 10 x 40). E. (Neuro)pores libres (flèche noire; gross. 10 x 10). F. (Neuro)pores libres (flèches noires; gross. 10 x 40).

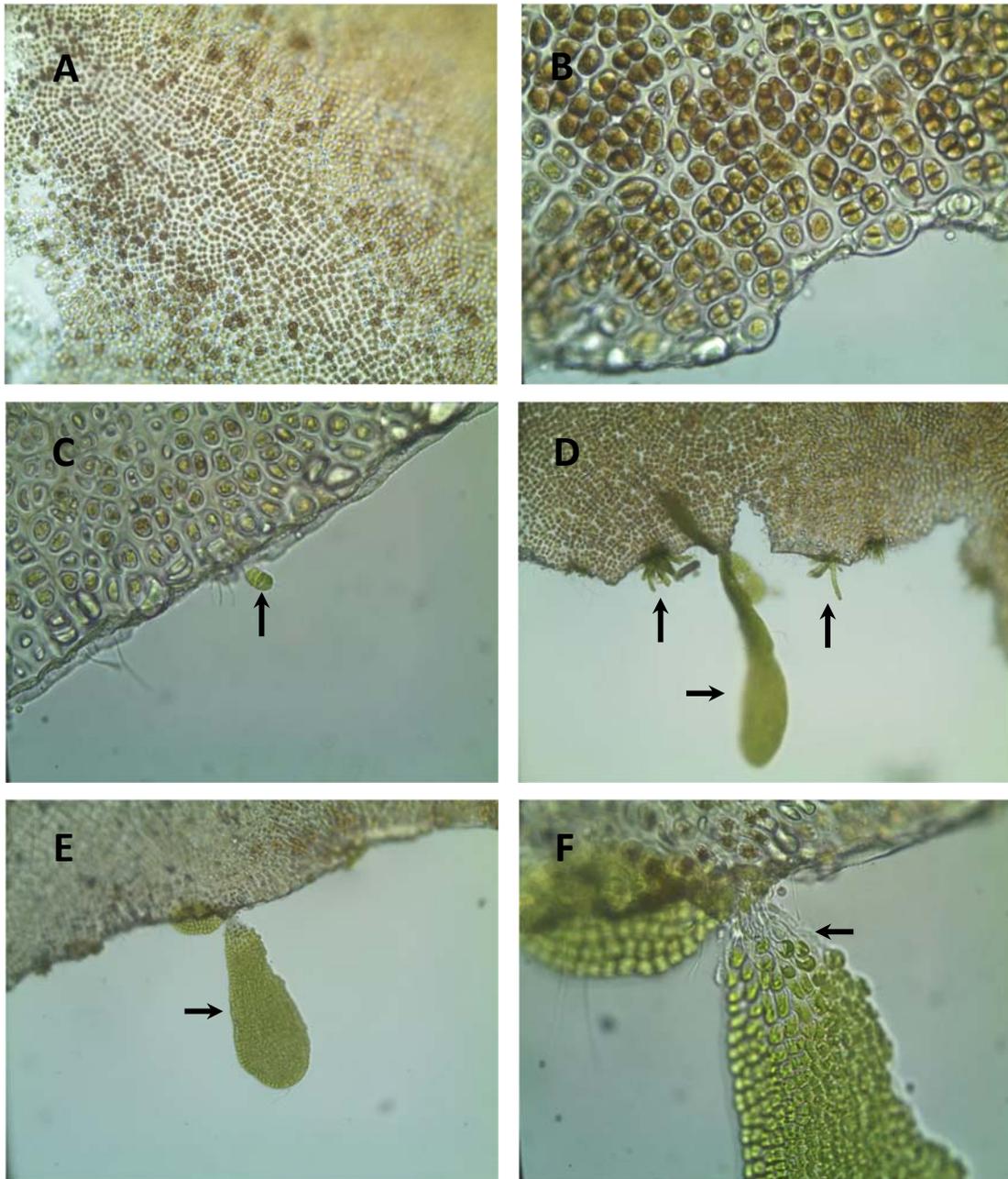


Figure 20. Examen microscopique de la surface de frondes de *P. umbilicalis* récoltées le 8 avril 2020 sur les blocs du brise-lames de la marina de Chandler. A. Zone fertile en bordure de fronde, contenant des (neutro)spores dispersées (gross. 10 x 4). B. Sporangies contenant les (neutro)spores, en bordure de fronde (gross. 10 x 40). C, D et E. Plantules de *P. umbilicalis* (flèches noires) à différents stades de développement et fixés sur la marge d'une fronde de la même espèce (gross. 10 x 10, 10 x 4, 10 x 4). E. Cellules rhizoïdes (flèche noire) à la base de la même plantule fixée sur la marge d'une fronde (gross. 10 x 10).

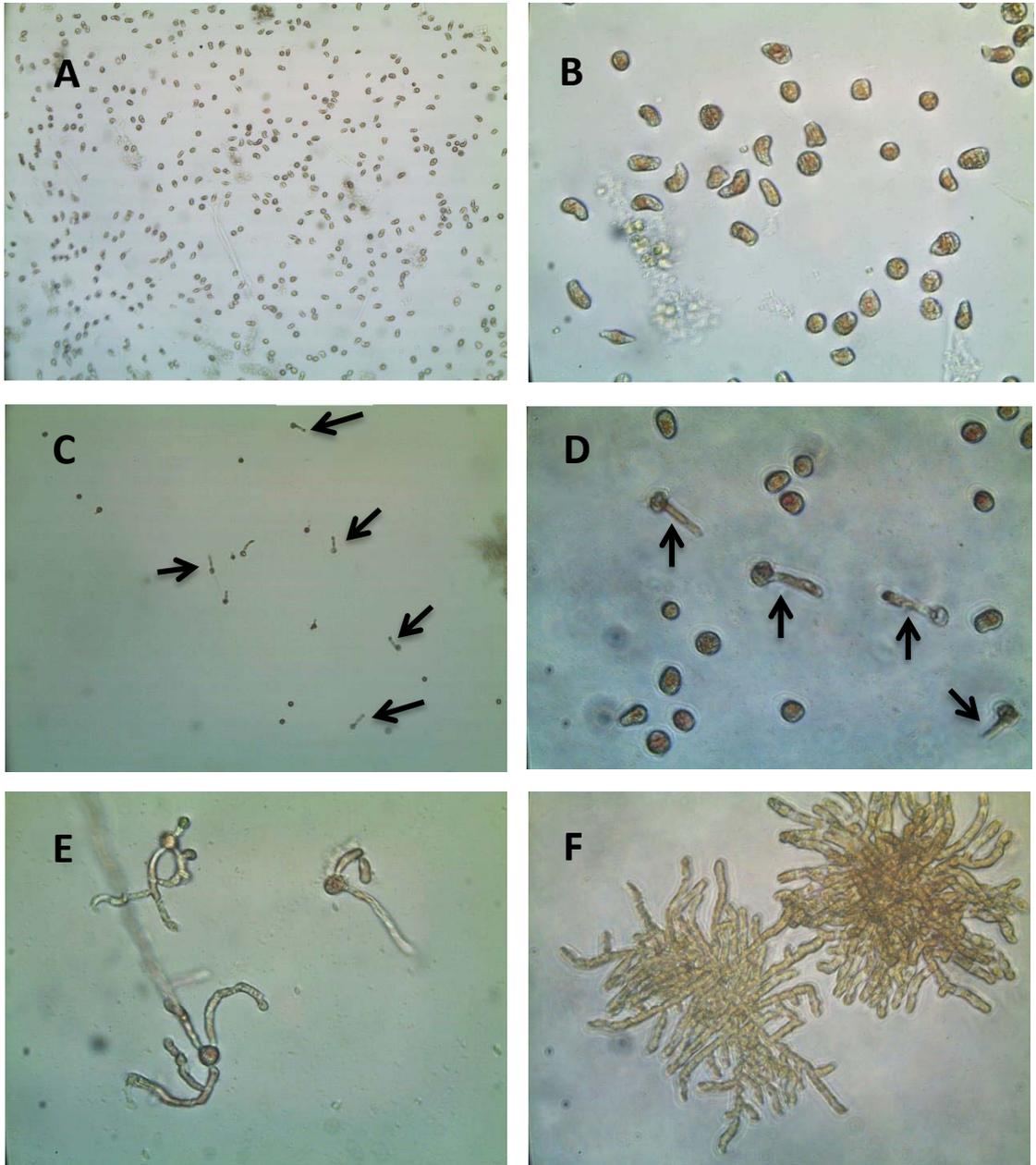


Figure 21. Examen microscopique de spores issues de frondes de *P. umbilicalis* récoltées le 6 juin 2020 sur les rochers de bord de plage à Pabos. A et B. Examen des spores 2 jours après leur libération dans un plat de Pétri. Les spores ont un diamètre de 12-15 microns (gross. 10 x 10, 10 x 40). C et D. Examen des spores 5 jours après leur libération. Les tubes de germination de certaines spores sont visibles (flèches noires; gross. 10 x 10, 10 x 40). E. Examen des spores 19 jours après leur libération (gross. 10x 40) F. Examen des spores 43 jours après leur libération (gross. 10 x 40).

### 3.2.5. Cinétique d'absorption de l'ammoniaque selon la méthode de conservation des algues

#### Sous objectif 2.5

Comparer la performance d'absorption de l'ammoniaque d'algues précongelées et d'algues conservées en bassins pour une durée de 7 mois.

Cette section a fait l'objet d'un rapport de stage (en annexe) de la part de l'étudiante madelinienne Laurie Boudreau.

### 3.3. Objectif 3

#### 3.3.1. Cinétique d'absorption de l'ammoniaque selon les types de supports d'algues

##### Sous-objectif 3.1

Comparer la cinétique d'absorption de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) par deux prototypes de biofiltres différents, le premier avec des algues immergées et le second avec des algues semi-immersées.

La réalisation de cet objectif, qui consistait à développer deux prototypes de biofiltres avec des frondes fixées ou libres de densités variables, a été effectuée lors de l'hiver 2020. Les tests ont été effectués aux Îles-de-la-Madeleine dans la salle des bassins de Merinov, du 5 mars au 13 mai 2020. Cet objectif a été réalisé par les étudiants du cours d'activité synthèse de programme du programme des Sciences de la nature (sous objectif 3.3.1), leur enseignante-chercheuse et une étudiante de l'option Recherche-Études (sous objectif 3.3.2).

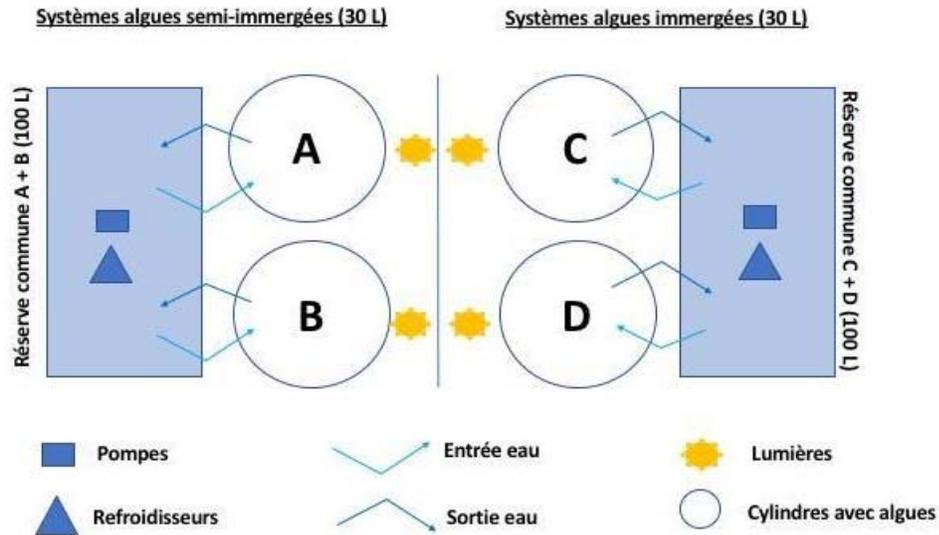
Les algues (*P. umbilicalis*) ont été prélevées manuellement au début du mois de novembre 2019 dans la marina (quai) de Cap-aux-Meules. L'excédent d'eau a été retiré en partie des algues à l'aide d'une essoreuse à salade (30 tours) puis elles ont été pesées avant leur immersion dans un bassin de stockage. L'intensité lumineuse à la surface de l'eau pendant la période de contention a été de 100-170  $\mu\text{moles de photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Les lumières utilisées étaient des tubes fluorescents type *cool white* et la photopériode était de 8:16 (Lum.:Obsc.). La température dans le bassin a été maintenue autour de 10 °C à l'aide d'un refroidisseur et le nombre de renouvellements d'eau dans le bassin a été fixé à 5 par jour. La densité d'algue était approximativement de 3 g/l afin que ces dernières puissent avoir un accès à la lumière de façon optimale. Finalement, une légère aération par le fond a été ajoutée dans le bassin afin de faire une culture en « tumble ». Cette technique assure un mouvement continu des frondes dans le bassin sans les briser. Si les frondes se retrouvaient dans des zones mortes ou flottaient à la surface, elles étaient réimmergées manuellement par les techniciens. Un suivi était fait tous les jours afin de s'assurer du maintien des paramètres dans le bassin. Comme les algues ont été maintenues sur une longue période, leur poids a été suivi pour s'assurer du bon maintien du stock sur la période de contention.

#### Matériel et méthodes

##### Montage

L'expérience pour, cet objectif, s'est déroulée du 12 au 19 mars 2020 à la salle des bassins de Merinov aux Îles-de-la-Madeleine. Un montage expérimental particulier a dû être réalisé afin de satisfaire les exigences de cet objectif (Figure 22). Ce montage a été fait durant le mois de février, c'est à dire quelques semaines précédant le début l'expérience. Quatre cylindres transparents d'une capacité de 30 litres chacun ont été installés en double pour chacun des deux traitements soit 1) le prototype de biofiltre percolateur, avec des algues semi-immersées posées sur des tamis superposés arrosés par l'eau, et 2) le prototype de biofiltre immergé à lit dynamique où les frondes ont été maintenues en mouvement permanent dans le caisson rempli d'eau. Chacun des cylindres était relié à une réserve commune de 100 litres où une pompe

et un refroidisseur y étaient immergés afin d'assurer une circulation constante de l'eau à l'intérieur des cylindres. L'eau en circulation dans les systèmes était maintenue à une température de 8-10 °C. Des lumières DEL de forme allongées ont été installées à côté de chaque cylindre produisant une intensité lumineuse variant entre 45 (pour le système semi-immergé) et 242  $\mu\text{moles de photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (pour le système immergé). Enfin, le débit à l'entrée des systèmes a été ajusté à 4-5 litres par minutes.



**Figure 22. Montage expérimental pour la réalisation de l'objectif 3.**

Dans les deux cylindres servant de biofiltres percolateurs, des algues ont été disposées horizontalement sur un support en PVC avec des étages de filet de type Nytex de faible maille (tamis) (Figure 23a). Les tamis en Nytex étaient perméables à l'eau, donc cette dernière coulait à un débit constant à partir d'une pomme de douche fixée au-dessus du cylindre puis dans chacun des montants disposés au-dessus des étages. 125 g d'algues ont donc été également répartis sur 8 étages pour chacun des biofiltres de ce traitement. Les 125 g d'algues du prototype de biofiltres immergés à lit dynamique ont été mises en suspension dans l'eau de chacun des deux cylindres, soit une biomasse de 250 g frais dans 160 L ou 1,56  $\text{g L}^{-1}$  (Figure 23b). Dans ces derniers, une ligne d'aération a été introduite dans chacun des deux cylindres pour faciliter le mouvement des algues dans les cylindres.



**Figure 23. A. Systèmes d’algues semi-immergées (biofiltre type percolateur). B. Système d’algues immergées (biofiltre immergé à lit dynamique).**

### Manipulations

Les manipulations ont été effectuées selon un horaire fixe tout au long de l’expérience étalée sur 72 h afin de tenir compte le plus possible de la réalité de la contention des homards vivant en viviers dans les usines. Durant cette période, la prise des données s’est faite quotidiennement soit à 0 h, 24 h, 48 h et 72 h (T0, T24, T48, T72) autant pour le témoin que pour le traitement. Le témoin a consisté en la réalisation de mesures dans les deux types de systèmes sans la présence d’algues pour ainsi voir les fluctuations de la concentration de l’ammoniaque sur ces 4 jours.

Du chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) a été initialement introduit dans les réservoirs d'eau des deux types de systèmes. Pour atteindre la concentration initiale de  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4$ ,  $0,0267 \text{ g}$  de chlorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) en poudre ont été ajoutés à l'eau salée dans les réserves des deux systèmes.

La concentration d'ammoniaque dans l'eau des systèmes a été déterminée par une méthode colorimétrique qui fournit un résultat exprimé en azote ammoniacal total (ppm de  $\text{N-NH}_3$ ). Les tests ont été réalisés avec le colorimètre SMART3 (LaMotte) et le kit de détection d'ammoniaque High range (Nesslerization method-code 3642-sc). Il a été nécessaire d'effectuer des dilutions, car le seuil de détection du test était limité ( $4 \text{ ppm}$ ). En effet, pour les premières 48 h du traitement,  $3 \text{ ml}$  d'eau prélevée des réserves ont été dilués dans  $9 \text{ ml}$  d'eau distillée (dilution  $4\times$ ). Par la suite, cette dilution a été modifiée selon la concentration d'ammoniaque restante dans les systèmes. Puisque la valeur de la concentration en ammoniaque après 72 h était plus faible, la dilution modifiée était plutôt de  $2 \times$  ( $6 \text{ ml}$  d'eau prélevée des réserves pour  $6 \text{ ml}$  d'eau distillée). Ensuite,  $10 \text{ ml}$  de ces solutions diluées ont été transférés dans des flacons désignés au test de colorimétrie à l'aide de micropipettes de  $10 \text{ ml}$ . Le protocole accompagnant ce kit préfabriqué a été utilisé afin de réaliser les suivis d'ammoniaque dans les systèmes en réalisant la lecture avec le colorimètre (Figure 24). Finalement, afin d'exprimer la concentration d'ammoniaque en poids moléculaire d'ion ammonium  $\text{NH}_4^+$  dans la solution, la valeur affichée par l'appareil (ppm de  $\text{N-NH}_3$ ) a été multipliée par un facteur  $1,3$  (LAMOTTE, <https://www.lamotte.com>; voir annexe).



**Figure 24. Fioles utilisées dans les tests de colorimétrie pour déterminer la concentration de  $\text{NH}_4^+$  dans les systèmes de biofiltre d'algues.**

Les algues *Porphyra sp* ont été essorées et pesées avant leur introduction dans les systèmes suivant la méthode décrite au début de la section 3.3 (Figure 25). Chacune des algues a également été inspectée afin de retirer toutes les salissures ou autres espèces non désirées dans le cadre de l'expérience.



**Figure 25. Frondes de *Porphyra sp.* essorées avant la pesée et avant leur introduction dans les systèmes expérimentaux.**

Finalement, la prise de données abiotiques (température, salinité, luminosité, pH) a été effectuée tout au long de l'expérimentation. Ces mesures ont été effectuées à l'aide de différentes sondes.

#### Résultats et discussion

Les algues ont été conservées en bassins de stockage plusieurs mois avant la réalisation des expériences. L'état des algues s'est beaucoup dégradé même si les paramètres de culture recommandés ont été respectés. Il y a eu perte de biomasse puisque la biomasse humide initiale des algues dans le bassin de stockage était de 2 551 g en novembre 2019 alors qu'au début de l'expérience en mars 2020, elle était seulement de 1 010 g.

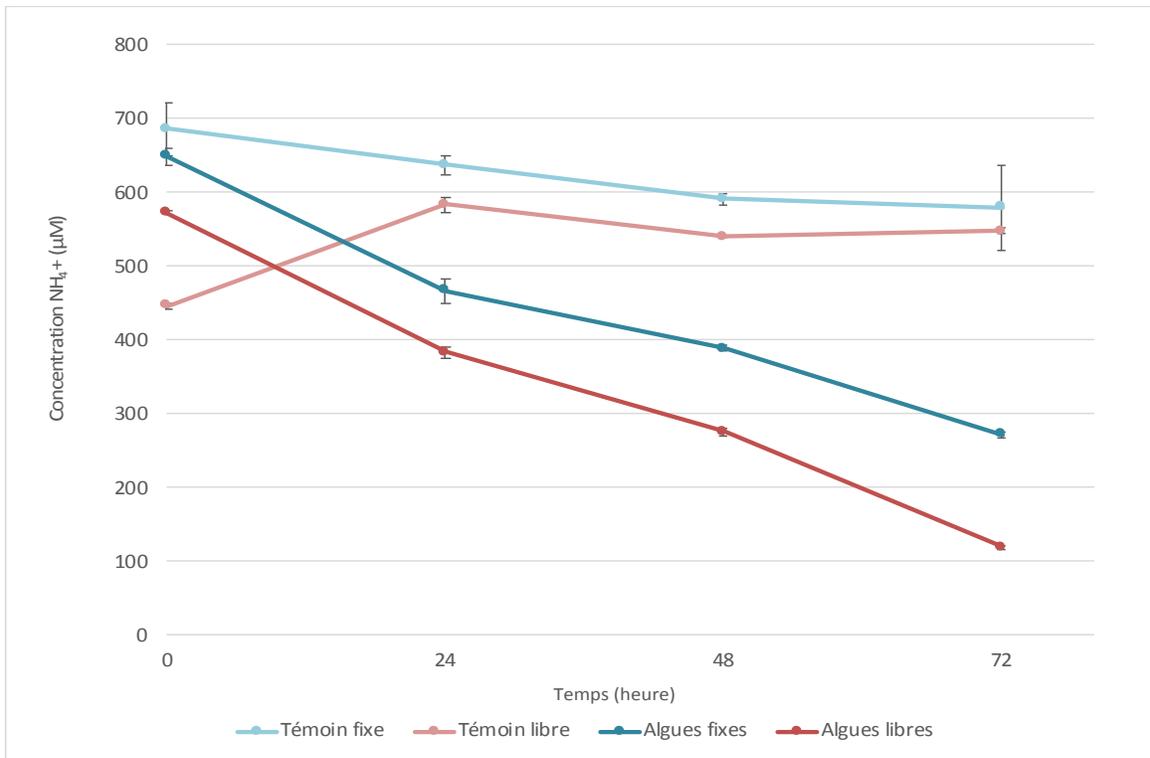
Les moyennes des valeurs de température, salinité et pH dans les témoins sans algues pour les biofiltres de type percolateur et biofiltre immergé à lit dynamique ont été respectivement de  $8,93 \pm 0,15$  °C et de  $9,5 \pm 1,86$  °C,  $34 \pm 0,29$  ‰ et de  $32,65 \pm 0,26$  ‰, et  $7,8 \pm 0,03$  et de  $7,75 \pm 0,18$ . Ces moyennes sont sensiblement les mêmes pour les traitements des algues semi-immergées (biofiltre type percolateur) et les algues immergées (biofiltre immergé à lit dynamique) avec  $8,68 \pm 0,39$  °C et de  $9 \pm 1,64$  °C pour la température,  $31,05 \pm 0,37$  ‰ et de  $31,35 \pm 0,17$  ‰ pour la salinité et  $7,87 \pm 0,08$  et de  $7,94 \pm 0,06$  pour le pH.

#### *Cinétique d'absorption de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans les deux types de biofiltres*

La figure 26 montre les résultats de la cinétique d'absorption du  $\text{NH}_4^+$  pour les témoins et les traitements expérimentaux dans les deux types de biofiltres. L'augmentation de l'ammoniaque entre 0 h et 24 h dans le « témoin libre » est due à un mauvais brassage de l'ammoniaque ajoutée initialement et la prise précipitée de l'échantillon afin d'en faire le dosage d'ammoniaque. Il est probable que la concentration initiale de  $\text{NH}_4^+$  ait été plutôt autour de 600  $\mu\text{M}$ .

En 72 h, les valeurs de  $\text{NH}_4^+$  dans les témoins ont baissé de  $15,74 \pm 3,93$  % pour le biofiltre type percolateur et de  $6,15 \pm 2,33$  % (en retirant le point initial) pour le biofiltre immergé à lit dynamique. Pour les algues semi-immergées (biofiltre de type percolateur), une baisse de  $58,10 \pm 1,26$  % a été observée et pour les algues immergées (biofiltre immergé à lit dynamique) une baisse de  $79,22 \pm 0,46$  % a été notée. À la lumière de ces résultats, le biofiltre à lit dynamique montre donc des résultats plus intéressants que le

biofiltre type percolateur. Il est à noter que les deux cylindres de chaque système expérimental ne représentent pas de vrais réplicats, puisqu'ils sont connectés au même bassin de 100 L servant de réserve d'eau.



**Figure 26.** Graphique illustrant l'évolution de la concentration en  $\text{NH}_4^+$  dans les traitements témoins (lignes pâles), et les traitements expérimentaux (lignes foncées) dans les deux systèmes de culture : algues semi-immergées (algues fixes) et algues immergées (algues fixes) et algues immergées (algues libres), durant 72 h.

### *Biomasse algale*

Le tableau 3 montre les résultats pour le suivi des biomasses algales dans les systèmes. Pour les biofiltres de type percolateur, une diminution de la biomasse est observée entre le poids initial et le poids final. En ce qui concerne les algues des deux biofiltres immergés à lit dynamique, seul le cylindre D a montré une augmentation de la biomasse. Les algues ont subi beaucoup de détérioration suite à leur contention sur une longue durée (voir début du paragraphe résultats et discussion de cette section), cette détérioration semble s'être poursuivie pendant les trois jours de l'expérimentation et pour les deux traitements.

**Tableau 3. Variation de la biomasse algale des deux types de systèmes sur une période de 72 h.**

Types de support	Cylindre	Biomasse initiale (T0) (± 0,01 g)	Biomasse finale (T72) (± 0,01 g)
Biofiltre type percolateur	A	125,88	115,32
	B	125,02	119,59
Biofiltre immergé à lit dynamique	C	125,33	110,58
	D	125,41	127,18

### 3.4. Objectif 4

**3.4.1. Mettre le prototype de biofiltre le plus performant à l'échelle pilote et vérifier la cinétique d'absorption de l'ammoniaque excrétée par des homards maintenus dans un vivier commercial.**

#### Sous-objectif 4.1

Comparer la performance d'absorption de l'ammoniaque ionisée, par des frondes de *Porphyra umbilicalis* fraîchement cueillies, exposées à des effluents issus de viviers commerciaux à homard avec le modèle de biofiltre le plus performant, tel qu'identifié à l'objectif 3.

#### Sous-objectif 4.2

Comparer deux types d'algues dans leurs performances d'absorption du  $\text{NH}_4^+$ , soit des algues fraîchement cueillies (identiques à celles du sous-objectif 3.1) et des algues conservées en bassin depuis 8 mois (figure 27) afin de voir si la réponse aurait été différente pour la première partie de l'objectif.

L'objectif 4 n'a été que partiellement atteint en raison de la pandémie Covid-19. Toutefois, même s'il n'a pas été possible de réaliser une expérience à l'échelle pilote, des échantillons d'eau provenant du vivier de l'entreprise La Renaissance ont été prélevés et utilisés dans le biofiltre identifié comme le plus performant.

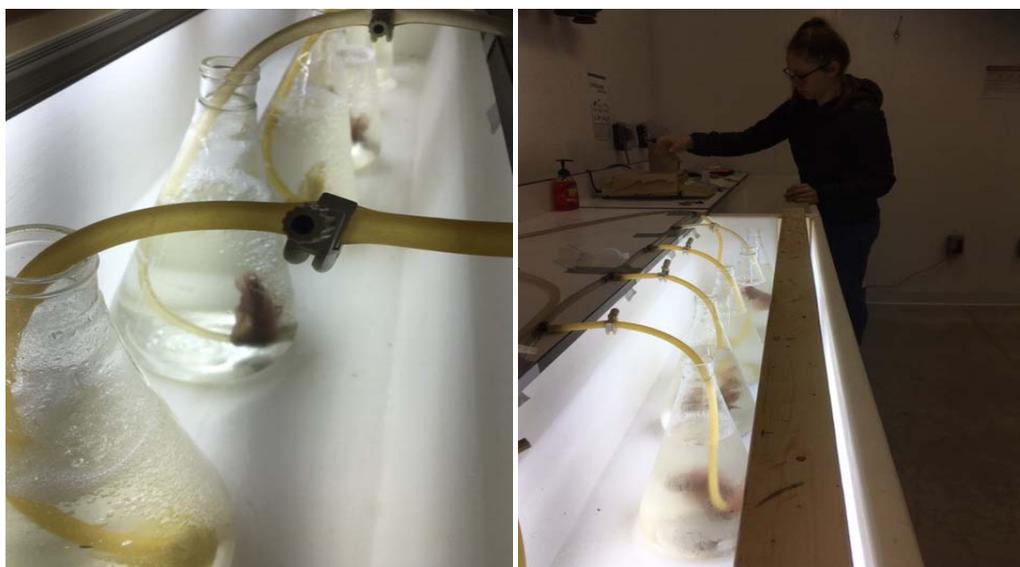


**Figure 27. Aperçu de l'état de *P. Umbilicalis* conservée pendant 8 mois dans des bassins à la salle des bassins de Merinov.**

## Matériel et méthodes

### Montage

La portion 4.1 de l'objectif 4 a été réalisée du 29 mai au 1 juin 2020 et la portion 4.2, du 2 au 5 juin 2020. Le montage et les manipulations ont été faits à la salle des bassins de Merinov aux Îles-de-la-Madeleine. Le montage du biofiltre immergé à lit dynamique (figure 23 B), où les frondes fraîches ont été maintenues en mouvement permanent dans deux cylindres remplis d'eau, a été utilisé pour le sous-objectif 4.1, tandis que des récipients de culture (Erlenmeyers de 2 litres, 3 par traitement) ont été utilisés pour le sous-objectif 4.2 (figure 28). Les conditions abiotiques (débit, intensité lumineuse, bullage, température, salinité, pH) ont été similaires à celles de l'expérience de l'objectif 3. La seule exception a été la provenance de l'eau et l'absence d'ajout artificiel de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Les frondes de *P. umbilicalis* ont été cueillies le 27 mai 2020 au même endroit et de la même façon que celles qui avaient été cueillies en novembre 2019 pour l'objectif 3. Les biomasses insérées dans les deux cylindres servant de biofiltres immergés à lit dynamique ont été les mêmes que pour l'expérience de l'objectif 3 (environ 125 g/cylindre) pour le sous-objectif 4.1, et d'environ 2 g dans chacun des triplicatas de l'expérience du sous-objectif 4.2. Les frondes utilisées dans le sous-objectif 4.2 étaient les mêmes que pour l'expérience sur les différents types de biofiltres (objectif 3) qui ont été gardées 8 mois dans des bassins chez Merinov et des frondes fraîches cueillies également le 27 mai 2020. Afin de simplifier le texte, elles seront identifiées comme algues 8 mois (ou « vieilles ») et algues fraîchement cueillies.



**Figure 28. Dispositif expérimental pour le sous-objectif 3.1 B.**

### Manipulations

Les mesures et les échantillonnages pour les sous-objectifs 4.1 et 4.2 ont été effectués selon un horaire similaire. Durant cette période, la prise des données s'est faite à 0 h, 24 h, 48 h et 72 h ( $T_0$ ,  $T_{24}$ ,  $T_{48}$ ,  $T_{72}$ ).

L'eau a été pompée directement dans un vivier à homard plein à l'usine puis rapportée chez Merinov. Elle a été utilisée pour remplir le système des deux cylindres des biofiltres immergés à lit dynamique. À la fin de l'expérience du sous-objectif 4.1, l'eau des cylindres qui contenait encore  $>300 \mu\text{M}$  d'ammoniaque a été utilisée pour les Erlenmeyers de l'expérience du sous-objectif 4.2.

La concentration d'ammoniaque dans l'eau a été déterminée par une méthode colorimétrique qui fournit un résultat exprimé en azote ammoniacal total (ppm de N-NH<sub>3</sub>). Les tests ont été réalisés avec le colorimètre SMART3 (LaMotte) et le kit de détection d'ammoniaque High range (Nesslerization method-code 3642-sc). Le facteur de dilution a été de 4 pour le sous-objectif 3.1. Aucune dilution n'a été nécessaire pour le sous-objectif 4.2. Afin d'exprimer la concentration d'ammoniaque en poids moléculaire d'ion ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dans la solution, la valeur affichée par l'appareil (ppm de N-NH<sub>3</sub>) a été multipliée par un facteur 1,3 (LAMOTTE, <https://www.lamotte.com>; voir l'annexe 1).

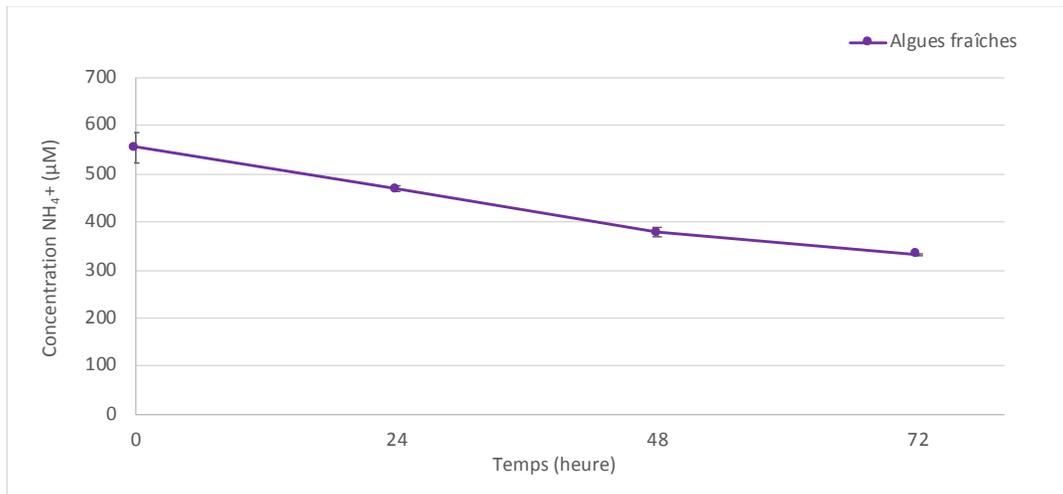
Les conditions abiotiques ont fait l'objet d'un suivi dans les deux sous-objectifs pour s'assurer de leur stabilité. La biomasse des frondes a été mesurée selon la méthode détaillée dans l'objectif 3.

## Résultats et discussion

### Sous-objectif 4.1

*Comparaison de la cinétique d'absorption de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dans un biofiltre immergé à lit dynamique rempli avec une eau issue des viviers à homard et contenant des frondes de *P. umbilicalis* fraîchement cueillies*

La figure 29 montre les résultats obtenus pour les 72 h d'expérimentation dans les biofiltres immergés à lit dynamique. En trois jours, la concentration d'ammonium est passée de 554,9 ± 30,6 μM à 332,9 ± 2,6 μM. Ceci représente une diminution de 39,9 ± 2,9 %. Cette diminution est nettement moins importante que ce qui avait été observé dans l'objectif 3 (79,22 ± 0,46 %) avec le même prototype de biofiltre et la même biomasse. Pourtant, comme les frondes utilisées dans l'expérience de l'objectif 4 étaient fraîchement cueillies, des résultats similaires ou meilleurs que ceux obtenus dans l'objectif 3 auraient pu être anticipés. Afin de creuser la question, le test du sous-objectif 4.2 a été réalisé.



**Figure 29.** Graphique illustrant l'évolution de la concentration en ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dans le biofiltre immergé à lit dynamique, contenant de l'eau des viviers d'une usine de homard, durant 72 h.

### *Biomasse algale*

Les résultats des mesures de la biomasse des algues sont similaires à ceux observés dans les travaux de l'objectif 3, c'est-à-dire aucun gain ou peu de gain en biomasse. Ainsi, la biomasse moyenne initiale était de  $125,52 \pm 0,65$  g, tandis que la biomasse finale était de  $126,44 \pm 7,74$  g. Les frondes se sont déchirées sous l'effet du bullage ce qui peut expliquer la perte de la biomasse observée dans un des deux cylindres du biofiltre (valeurs finales de 131,92 et 120,97 g). Les deux systèmes communiquant ensemble par la réserve, il est possible qu'une fraction des algues brisées dans un des duplicatas se soient retrouvées dans l'autre duplicata vu le gain en biomasse (131,9 g).

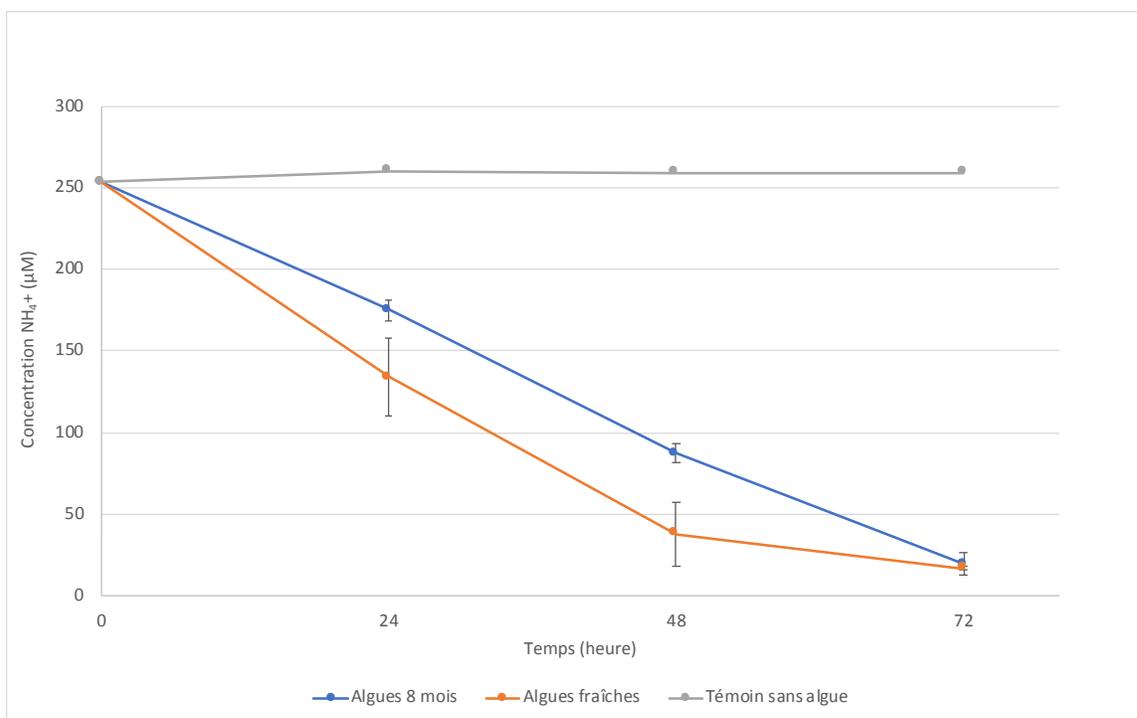
### Sous-objectif 4.2

Comparaison de la cinétique d'absorption de l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans des récipients remplis avec de l'eau issue des viviers à homards et contenant soit des frondes de *P. umbilicalis* fraîchement cueillies, soit des frondes conservées en bassins pendant 8 mois

La figure 30 montre l'évolution des concentrations en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) observées au cours des 72 h d'expérimentation. En trois jours, la moyenne des concentrations est passée de  $253,68 \pm 0,0$   $\mu\text{M}$  à  $19,46 \pm 6,95$   $\mu\text{M}$  pour les algues ayant été conservées 8 mois dans les bassins et de  $253,68 \pm 0,0$   $\mu\text{M}$  à  $16,82 \pm 1,10$   $\mu\text{M}$  pour les algues fraîchement cueillies. Ceci représente une diminution de  $92,3 \pm 2,7$  % et de  $94,7 \pm 0,4$  % respectivement pour les frondes de 8 mois et les frondes fraîchement cueillies. Les concentrations finales, après 72 h, sont très similaires et suggèrent donc une performance d'absorption des « vieilles » frondes similaire à celle des frondes fraîchement cueillies. Par contre, l'observation des résultats à 24 h et à 48 h, la cinétique d'absorption des frondes fraîches a été plus rapide.

### *Biomasse algale*

Les résultats de l'évolution de la biomasse des frondes dans les récipients expérimentaux ont donné des résultats similaires à ceux observés dans les travaux de l'objectif 3 puisque la biomasse moyenne initiale ( $2,05 \pm 0,06$  g pour les frondes 8 mois et  $2,16 \pm 0,02$  g frondes fraîchement cueillies) était similaire à la finale ( $1,88 \pm 0,11$ g pour les frondes 8 mois et  $2,13 \pm 0,06$  g frondes fraîchement cueillies). Encore une fois, les plus petits fragments de frondes se sont décomposés ou étaient trop petits pour être pesés, ce qui pourrait expliquer la diminution de la biomasse. Ces observations sont valables autant pour les frondes conservées 8 mois en bassins que pour les frondes fraîchement cueillies.



**Figure 30. Évolution de la concentration en ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) dans trois groupes d'Erlenmeyer remplis d'eau provenant des viviers d'une usine de homard et contenant des frondes de *P. Umbilicalis* conservées préalablement dans des bassins chez Merinov pendant 8 mois, des *P. Umbilicalis* fraîchement cueillies, ainsi qu'un témoin sans algue.**

## 4. Conclusion générale

### Rappel de l'objectif général du projet

Le présent projet visait à développer un biofiltre composé de *Porphyra sp.*, algue rouge indigène, et destiné à réduire significativement (de 500 à < 20  $\mu\text{M}$ ) la concentration d'azote total dans les effluents des viviers de homard, dans une eau de mer maintenue entre 2 et 10 °C.

### Une meilleure connaissance du potentiel de *P. umbilicalis* pour la bioremédiation

Mis à part les travaux de André Cardinal sur la distribution des espèces des macroalgues le long des côtes du Québec, il n'y a pas eu de travaux sur la taxonomie, la génétique, les cycles de vie et la physiologie des espèces de *Porphyra* de nos régions au Québec. Ce projet constituait donc une première tentative de collecter de l'information de base et d'accumuler de l'expérience sur les espèces présentes sur les côtes du Québec. Les objectifs du projet étaient nombreux et variés et plusieurs aspects reliés d'abord à la biologie de base, ensuite à l'absorption de l'ammoniaque et enfin à l'élaboration d'un biofiltre d'algues marines. Ils ont été couverts par les équipes des campus de Grande-Rivière et des Îles-de-la-Madeleine.

### Phénologie de *Porphyra sp.* en Gaspésie

Le genre *Porphyra* était relativement commun dans la zone intertidale de plusieurs zones rocheuses entre Percé et Port-Daniel. Les frondes qui se développent en milieu plus protégé atteignent une plus grande taille que les frondes en milieu exposé. La majorité des frondes échantillonnées avaient les caractéristiques morphologiques de *P. umbilicalis*, mais cette identification provisoire devra être confirmée par une analyse de *barcoding* moléculaire.

Il a été possible de maintenir un stock de frondes en bon état dans un bassin cylindrique entre septembre et novembre, mais ensuite les frondes se sont dégradées. Il serait probablement plus avantageux d'utiliser de l'eau de mer filtrée et désinfectée pour éviter le développement d'algues épiphytes et de diatomées, en particulier si l'ajout de nutriments dans le bassin est envisagé.

Les spécimens prélevés entre juin et septembre avaient souvent une bande de tissu décoloré autour de la marge de la fronde. Cela suggère que les frondes avaient déjà sporulé. Elles étaient peut-être aussi stressées par le manque de nutriments et la température élevée de l'eau de surface en été. L'observation de jeunes embryons et plantules en développement au mois d'avril semble confirmer que la reproduction a lieu en hiver.

Le fait que les spores obtenues aient germé à plusieurs reprises pour former des filaments semblables à des *conchocelis* au lieu de jeunes embryons de plantules signifierait soit que *P. umbilicalis* ne forme pas de neutrospores à ces périodes de l'année dans le golfe du Saint-Laurent, soit que les frondes utilisées appartenaient à une autre espèce.

#### **Cinétique d'absorption de l'azote sur une période de 24 h et de 3 semaines.**

Les premiers résultats des tests *in vitro* ont rapidement permis de statuer que les performances de bioremédiation de l'ammoniaque par *P. umbilicalis* sur une période de 24 h étaient supérieures à celles des autres espèces de *Porphyra sp* présentes en Gaspésie. *P. umbilicalis* absorbe  $22,6 \pm 18,5$  % de l'ammoniaque totale lorsque cultivée à  $500 \mu\text{M}$ , bien que son taux de croissance soit légèrement négatif, et  $95,0 \pm 4,3$  % de l'ammoniaque, lorsque cultivée à  $50 \mu\text{M}$  tout en conservant un taux de croissance positif.

Sur une période de 7 jours, elle est également la meilleure candidate pour réduire les fortes concentrations d'ammoniaque ( $500 \mu\text{M}$ ). Toutefois, les tests de cinétique en ballon sur une plus longue période de temps, soit 3 semaines, ont donné des résultats plus mitigés. En effet, avec une concentration de départ de  $150 \mu\text{M}$ , bien que l'algue absorbe plus de 55 % de l'ammoniaque à la semaine 1, cette capacité d'absorption tend à diminuer au fil des semaines et des taux de croissance négatifs ont même été obtenus à partir de la semaine 2. À  $500 \mu\text{M}$ , le taux de croissance ainsi que la capacité d'absorption diminuent également au fil des semaines, ce qui ne permet plus d'atteindre la cible désirée de  $< 150 \mu\text{M}$  comme à la semaine 1.

Quatre pistes d'explication sont suggérées. D'abord le maintien des frondes dans des ballons de culture de petit volume, en eau stagnante, pendant plusieurs semaines ne semble pas convenir aux algues qui, dans ce type de système, se détériorent progressivement. Des ajouts de micronutriments seraient donc à considérer pour les travaux futurs. Ensuite, il est probable que, sur une longue durée, un effet de saturation des processus de stockage de l'azote dans les tissus se traduit par un ralentissement de l'absorption d'ammoniaque par les frondes. Une stratégie d'alternance entre l'utilisation de frondes saturées et non saturées a donc été suggérée pour la suite des travaux. Finalement, l'utilisation de grandes frondes récoltées à la fin de l'été/début de l'automne pourrait peut-être avoir limité l'efficacité d'absorption de l'azote, puisqu'à cette période de l'année, la croissance végétative ralentit.

#### **Type de support de culture**

Les résultats de l'objectif 3, qui visait à évaluer la cinétique d'absorption de l'ammoniaque selon les types de supports d'algues, montrent qu'un type de support a été plus performant que l'autre. Le biofiltre immergé à lit dynamique, avec des algues complètement immergées dans une colonne d'eau, a montré

une meilleure cinétique d'absorption de l'ammoniaque que le biofiltre de type percolateur. Dans ce dernier type de support les algues sont semi-immergées par l'eau qui coule à travers divers tamis où sont disposées également les algues sur plusieurs étages.

Si la cinétique d'absorption a été meilleure pour un des deux supports, il n'y a cependant pas eu de différence au niveau du gain en biomasse. Pour les types deux supports, il y eut une baisse de biomasse suggérant la dégradation des algues ou le bris de ces dernières. Une expérience sur une plus longue période (> 72h) serait nécessaire afin de voir si le type de support peut avoir un impact sur le gain en biomasse.

#### **Meilleur support testé avec les conditions d'un vivier homard en saison de pêche.**

Malheureusement, l'objectif 4 n'a pu être réalisé tel que prévu dans l'intention de projet. Par contre, le meilleur modèle de biofiltre identifié dans l'objectif 3, soit le biofiltre immergé à lit dynamique, a été réutilisé avec de l'eau provenant d'un vivier en opération aux Îles-de-la-Madeleine. Les conditions abiotiques étaient représentatives des conditions dans un vivier. La performance de la cinétique d'absorption de l'ammoniaque des algues *P. Umbilicalis* fraîchement cueillies a été inférieure à celle observée préalablement dans l'expérience des types de supports, pour le même type de support.

Suivant cette observation, un deuxième essai a été réalisé pour comparer la cinétique d'absorption de « vieilles » algues conservées 8 mois à la salle des bassins (les mêmes que pour l'expérience sur les différents types supports) et des algues fraîchement cueillies (les mêmes que pour l'expérimentation avec le biofiltre immergé à lit dynamique avec de l'eau provenant des viviers). Après 72 h d'expérience, les résultats sont très similaires pour les deux traitements. Par contre, entre 0 et 72 h les algues fraîchement cueillies montrent des résultats plus intéressants pour la diminution de la concentration d'ammoniaque. Encore une fois, il n'y a eu aucun gain en biomasse des frondes durant ces deux expériences.

#### **Établir la valeur nutritionnelle et organoleptique des frondes de *Porphyra* produites dans le biofiltre.**

Cet objectif n'a pas pu être complété pendant le projet. Toutefois, il existe de l'information qui peut être mentionnée ici. Sur les emballages de la compagnie *Un océan de saveurs*, l'algue nori de l'Atlantique cueillie près du Parc national Forillon contient 53 g de protéines par 100 g d'algues. Ce produit est également une bonne source de fibres (40 % de l'apport quotidien pour 100 g d'algues), fer (357 %), vitamine B12 (1125 %), magnésium (136 %) et autres nutriment tels le sélénium et le manganèse. Sur site Internet (<https://oceandesaveurs.ca>), la compagnie présente les propriétés organoleptiques de l'algue nori en mettant de l'avant son « *goût végétal délicat, parfumé, boisé, légèrement fumé (lorsque grillée)* » rappelant le « *thé ou champignons séchés avec des notes aromatiques de fruits de mer* ».

Partant de la prémisse que les conditions de cultures influencent la physiologie des algues comme cela a déjà été démontré pour *Palmaria palmata* (Cooke et Kelly, 2007; Beaulieu et collab., 2016), les frondes cultivées dans une eau enrichie en azote dissous provenant de viviers de homard, n'auront peut-être pas les mêmes valeurs nutritionnelles ou caractéristiques organoleptiques que les algues nori sauvages gaspésiennes. Des analyses microbiologiques, nutritionnelles et organoleptiques des algues Noris cultivées dans l'eau des viviers de homard devront par conséquent être incluses dans les prochains travaux sur ce thème.

## 5. Recommandations et perspectives

- ✓ Utiliser les techniques de taxonomie moléculaire pour déterminer précisément quelles sont les espèces présentes sur les sites de récolte dans les différentes régions.
- ✓ Réaliser un suivi annuel du cycle de croissance et de reproduction pour déterminer si et quand *P. umbilicalis* développe des neutrospores ou d'autres types de spores.
- ✓ Améliorer les systèmes de culture et de conservation des frondes en bassins, à la fois pour réduire la prolifération des espèces compétitives, mais aussi pour soutenir la croissance végétative des frondes de *P. umbilicalis*.
- ✓ Poursuivre les travaux sur la congélation des tissus et des spores ainsi que ceux sur la culture de cette espèce, à partir de neutrospores ou de conchospores, afin de pouvoir fournir une réserve de matériel biologique aux caractéristiques connues pour les travaux sur la bioremédiation. Un stage dans un centre de recherche qui travaille sur ce sujet pourrait permettre de gagner du temps et d'acquérir les connaissances et les expertises techniques manquantes.
- ✓ Réaliser les tests d'absorption de l'ammoniaque *in vitro* avec des algues cueillies tôt au printemps ou avec de jeunes frondes issues de spores germées en laboratoire pour travailler avec des spécimens qui sont en croissance végétative rapide.
- ✓ Tester pour la première fois un biofiltre sur le long terme en utilisant une alternance entre frondes saturées en azote et frondes non saturées.
- ✓ Utiliser l'analyse d'image en complément du poids humide pour mesurer la croissance des frondes, surtout dans les expériences à petite échelle dans des ballons en verre.
- ✓ Vérifier si l'ajout de microéléments peut stimuler l'absorption de l'azote.
- ✓ Réaliser une mise à l'échelle et un essai des biofiltres connectés à un vivier de homard et faire une évaluation des performances et des coûts de fonctionnement sur une période de plusieurs semaines.
- ✓ Comparer la composition biochimique (nutritionnelle) finale des frondes du biofiltre à celle des frondes du milieu naturel.
- ✓ Faire une analyse de l'innocuité ainsi que des caractéristiques organoleptiques des algues utilisées dans les essais pilotes afin d'évaluer la possibilité de commercialisation pour consommation humaine.

### Équipe du projet et contributions pour les différents objectifs atteints

Objectif 1 : I. Gendron-Lemieux, A. Tremblay-Gratton, M. Boudreau, M.-P. Turcotte, É. Tamigneaux

Objectif 2 : É. Tamigneaux, I. Gendron-Lemieux, M. Boudreau, A. Tremblay-Gratton

Objectif 3 et 4 : L. Gilmore Solomon, L. Boudreau stagiaire, option Recherche-études, groupe du cours « Activité synthèse de programme » hiver 2020, A. Tremblay-Gratton et É. Tamigneaux.

## 6. Bibliographie

- Abed-Rahman M.H.M. (2005). Control of conchospores formation in *Porphyra leucosticta*, a genuine short-day response. *International Journal of Agriculture & Biology*. Vol. 7, No. 1, pages 1-4.
- Beard, T.W., et McGregor, D. (2004) Storage and care of live lobsters. Laboratory Leaflet number 66. Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS). Ministry of agriculture, fisheries and food. Lowestoft.
- Blouin N.A., Fei X.G., Peng J., Yarish C. et Brawley S.H. (2007). Seeding nets with neutral spores of the red alga *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützinger for use in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Aquaculture*. 270: 77-91.
- Brawley S. H. (2014). *Porphyra* hatchery and grow-out techniques. BIM, Ireland's Seafoods development agency. URL: [www.bim.ie/media/bim/content/downloads/Susan,Brawley.pdf](http://www.bim.ie/media/bim/content/downloads/Susan,Brawley.pdf). Document consulté le 15 avril 2020.
- Britto D. T. et Kronzucker H. J. (2002). NH<sub>4</sub><sup>+</sup> toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of Plant Physiology*, 159, 567–584.
- Carmona R., Kraemer G.P. et Yarish C. (2016). Exploring Northeast American and Asian species of *Porphyra* for use in an integrated finfish–algal aquaculture system. *Aquaculture* 252, 54–65.
- Chabot, R. (2018). Communication avec Robert Chabot, ancien chargé de cours en biologie à l'UQAR et auteur du livre Algues et Faunes du littoral du Saint-Laurent, au sujet des caractéristiques permettant d'identifier les différentes espèces de *Porphyra* sp. au Québec.
- Chartois, H., Latrouite, D., Le Carré P. (1994) Stockage et transport des crustacés vivants. Rapports Internes de la Direction des Ressources Vivantes de l'Ifremer. RI DRV 94 – 09 RA – RH / Brest.
- Crane C. et Ramsay A. (2012). 2011 sea lettuce harvest pilot project report. PEI Department of Environment, Labour and Justice and PEI Department of Fisheries. *Aquacult. Rural Dev.*, 70 pages.
- Curtis B.A. (1997). A morphological and phylogenetic investigation of *Porphyra linearis* Greville and *Porphyra purpurea* (Roth) C. Agardh forms from Nova-Scotia. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science (Biology), Acadia University, 176 pages.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome, 244 pages. URL: <https://doi.org/10.4060/ca9229en> Document consulté le 18 octobre 2020.
- Food ingredients first (2010). Ireland leads the way with innovative seaweed research project. URL: <https://www.foodingredientsfirst.com/news/ireland-leads-the-way-with-innovative-seaweed-research-project.html>. Document consulté le 18 octobre 2020.
- Gendron-Lemieux I., Lemoine M. et Tamigneaux É. (2018). OPTIMAL. Optimisation de la maturation de lames de laminaires sucrées en bassins cylindriques translucides. Merinov, rapport projet N°18-31, 13 pages.
- Gomez Pinchetti J.L., Del Campo Fernández E., Moreno Díez P. et García Reina G. (1998). Nitrogen availability influences the biochemical composition and photosynthesis of tank-cultivated *Ulva rigida* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 10(4): 383–389.
- Green L.A. et Neefus C.D. (2015). Effects of temperature, light level, photoperiod, and ammonium concentration on *Pyropia leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta) from the Northwest Atlantic. *Journal of Applied Phycology* volume 27, pages 1253–1261.
- Grote B. (2016). Bioremediation of aquaculture wastewater: evaluating the prospects of the red alga *Palmaria palmata* (Rhodophyta) for nitrogen uptake. *Journal of Applied Phycology*, 1–8.
- Hafting J.T. (1999). A novel technique for propagation of *Porphyra yezoensis* Ueda blades in suspension cultures via monospores. *J Appl Phycol* 11:361–367.
- Harrison P.J. et Hurd, C.L. (2001). Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cahiers de Biologie Marine* 42(1-2): 71–82.

- He P.M. et Yarish C. (2006). The developmental regulation of mass cultures of free-living conchocelis for commercial net seeding of *Porphyra leucosticta* from Northeast America. *Aquaculture* 257, 373-381.
- Kim, J.K., C. Yarish, E.K. Hwang, M.S. Park et Kim Y.D. (2017). Seaweed aquaculture: cultivation technologies, challenges and its ecosystem services. *Algae* 32: 1–13.
- Kim J. K., Kraemer G. P., Neefus C. D., Chung I. K. et Yarish C. (2007). Effects of temperature and ammonium on growth, pigment production and nitrogen uptake by four species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) native to the New England coast. *Journal of Applied Phycology*, 19(5), 431–440.
- Kraemer GP et Yarish C. (1999). A preliminary comparison of the mariculture potential of *Porphyra purpurea* and *Porphyra umbilicalis*. *J Appl Phycol* 11:473–477.
- Lavik A.K. (2016). Developing a laboratory cultivation protocol for local species of *Porphyra* spp. NTNU MSc Thesis. Norwegian University of Science and Technology, 62 pages.
- Lobban C.S. et Harrison P.J. (1997). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 366p.
- MAPAQ (2012). Monographie de l'industrie québécoise du homard d'Amérique. 64 p. URL:<http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/md/Publications/Pages/Details-Publication.aspx?guid=%7Be5edb311-d0b0-4f14-bf6e-e9e44eae497f%7D> Document consulté le 9 avril 2020.
- MPO (2018). Pêches maritimes, valeur des débarquements par province. [En ligne]. URL: <https://www.dfo-mpo.gc.ca/stats/commercial/land-debarq/sea-maritimes/s2018pv-fra.htm> Document consulté le 9 avril 2020.
- Nielsen M. M., Bruhn A., Rasmussen M. B., Olesen B., Larsen M. M. et Møller H. B. (2012). Cultivation of *Ulva lactuca* with manure for simultaneous bioremediation and biomass production. *Journal of Applied Phycology*, 24(3), 449–458.
- Paulot F., Jacob D. J., Johnson M. T., Bell T. G., Baker A. R., Keene W. C., Lima I. D., Doney S. C. et Stock C. A. (2015). Global oceanic emission of ammonia: Constraints from seawater and atmospheric observations, *Global Biogeochem. Cycles*, 29 : 1165–1178.
- Pereira R., Yarish C. et Sousa-Pinto I. (2006). The influence of stocking density, light and temperature on the growth, production and nutrient removal capacity of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) from Portugal. *Aquaculture*, 252: 66–78.
- Redmond S., Green L., Yarish C., Kim J. et Neefus C. (2014). *New England Seaweed Culture Handbook- Nursery Systems*. Connecticut Sea Grant CTSG-14-01. 92 pages. PDF file. URL: <http://seagrant.uconn.edu/publications/aquaculture/handbook.pdf> Document consulté le 9 avril 2020.
- Royer C. (2017). Advancing development of *Porphyra umbilicalis* as a red algal model system and aquaculture crop. *Electronic theses and dissertations*. 2683, 105 pages. URL: <http://digitalcommons.library.umaine.edu/etd/2683> Document consulté le 9 avril 2020.
- Royer C.J., Blouin N.A. et Brawley S. (2018). More than meets the eye: regional specialisation and microbial cover of the blade of *Porphyra umbilicalis* (Bangioophyceae, Rhodophyta). *Botanica Marina* 61(5): 459–465.
- Saunders G. (2020). Seaweed of Canada. *Porphyra umbilicalis* Kützing (A). URL : <https://seaweedcanada.wordpress.com/porphyra-umbilicalis-linnaeus-kutzing-a/> Document consulté le 8 avril 2020.
- Sears J.R. (1998). NEAS keys to the benthic marine algae of the northeastern coast of North America from Long Island Sound to the Strait of Belle Isle. *Northeast Algal Society contribution N°1*, 163 pages.

- Tremblay-Gratton A., Boussin J.-C., Tamigneaux É., Vandenberg G.W. et Le François N.R. (2018). Bioremediation efficiency of *Palmaria palmata* and *Ulva lactuca* for use in a fully recirculated cold-seawater naturalistic exhibit: effect of high NO<sub>3</sub> and PO<sub>4</sub> concentrations and temperature on growth and nutrient uptake. *Journal of Applied Phycology*, 30 (2), 1295-1304.
- Tremblay-Gratton A. (2017). Évaluation de l'efficacité d'un biofiltre à macroalgues marines pour la réduction des nitrates et phosphates dans les bassins d'exposition du Biodôme de Montréal. Thèse de maîtrise. Université Laval, 186 pages.
- Van der Eerden L.J.M. (1982). Toxicity of ammonia to plants. *Agriculture and Environment*, 7(3-4), 223-235.
- Watson L. (2019). Growth trials on *Alaria esculenta* off the coast of Ireland. Pembroke-shire coastal forum 2019. URL: <http://www.pembrokeshirecoastalforum.org.uk/wp-content/uploads/2019/01/Lucy-Watson.pdf> Document consulté le 9 avril 2020.
- Zhang Y., He P., Li H., Li G., Liu J., Jiao F., Zhang J., Huo Y., et collab. (2019). *Ulva prolifera* green-tide outbreaks and their environmental impact in the Yellow Sea, China. *National Science Review*, Volume 6, Issue 4, July 2019, Pages 825–838. URL : <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz026> Document consulté le 18 octobre 2020.

**Annexe.** Rapport *Les effets de la congélation de Porphyra umbilicalis sur sa capacité d'absorption d'ammoniaque et sur sa croissance.*

# Les effets de la congélation de *Porphyra umbilicalis* sur sa capacité d'absorption d'ammoniaque et sur sa croissance

Rapport de stage de Laurie Boudreau, étudiante en Sciences de la nature, Cégep de la Gaspésie et des Îles, campus des Îles-de-la-Madeleine.

## Résumé

Pour survivre à la saison hivernale, *P. umbilicalis* doit avoir la capacité de résister à un grave stress de gel à marée basse. Dans le cadre de ce projet de recherche, cette capacité a été mise à l'épreuve dans le but d'analyser l'effet de la congélation de l'algue sur sa capacité d'absorption d'ammoniaque et sa croissance. Pour ce faire, trois algues *Porphyra umbilicalis* ont été congelées pendant 9 semaines à une température de -20 °C. De façon générale, les algues ont toutes survécu à la congélation. Cependant, leur capacité à absorber l'ammoniaque a été altérée. Pour ce qui est de la biomasse, elle était supérieure à celle des algues non congelées. En conclusion, la congélation peut être une solution pour conserver les algues pour l'aquaculture, mais pas pour sa capacité à absorber l'ammoniaque.

**Mots clés** *Porphyra umbilicalis* · Congélation · Absorption d'ammoniaque · Croissance

## Introduction

L'algue *Porphyra* (Bangiales) est une algue rouge distribuée dans le monde entier dans les eaux marines chaudes et froides (Wang *et al.*, 2011). *P. umbilicalis* habite naturellement la zone intertidale moyenne à supérieure dans les régions tempérées et subarctiques de l'Atlantique Nord (Brodie et Irvine, 2003). Pendant la saison hivernale, les organismes comme *P. umbilicalis* sont soumis à un grave stress de gel à marée basse. Les dommages observables causés par le gel résultent de la formation de glace intracellulaire qui peut notamment engendrer la détérioration des membranes cellulaires et la réduction du transfert d'énergie des antennes au centre de réaction dans l'appareil photosynthétique (Dudgeon *et al.*, 1989). Pendant la congélation, les thalles sont également soumis à un stress de déshydratation (Wang *et al.*, 2011). Or, *P. umbilicalis* possède une tolérance au gel qui lui permet de survivre pendant les mois d'hiver. Cette tolérance dépend de plusieurs facteurs tels que la vitesse de congélation et la teneur intracellulaire en eau de l'organisme (Chen *et al.* 2007 ; Pearson et Davison, 1993). La survie de

*Porphyra* au stress dû au gel tient également aux taux de gel et de dégel (Kuwano *et al.*, 1993, 1996). Une congélation lente a tendance à favoriser la formation de cristaux de glace extracellulaires, tandis qu'une congélation rapide entraîne la formation de cristaux de glace en majeure partie à l'intérieur de la cellule (Meryman, 1956). La formation de glace intracellulaire chez les algues est considérée comme universellement mortelle (Guy, 1990). Pour ce qui a trait au taux de décongélation, une décongélation rapide empêche la croissance des cristaux de glace et minimise les dommages cellulaires (Lin *et al.*, 2010). D'autre part, il a été observé que différentes espèces de *Porphyra*, et même différents tissus dans chaque thalle, peuvent réagir différemment à une condition identique de stress (Lin *et al.* 2009 ; Lipkin *et al.* 1993 ; Smith *et al.* 1986).

Dans l'aquaculture de *Porphyra*, une technique de congélation est utilisée afin de prolonger la saison de croissance des algues (Lobban et Harrison, 1994). Cette technique connue sous le nom de « filets congelés » [frozen nets] a été mise au point en 1965. Elle consiste en

l'entreposage à basse température des filets contenant les jeunes thalles de *Porphyra*. Cette méthode est entre autres utilisée par les aquaculteurs du Japon afin de déjouer les conditions climatiques marines défavorables et ainsi permettre d'éviter de lourds dommages à la production (Oohusa, 1984 ; Miura, 1992). Elle s'est aussi révélée utile pour son homologue chinois plus récemment (Zhang, 1988 ; Chen, 1994 ; Ma *et al.* 1998).

Des études ont montré que *P. umbilicalis* peut survivre à la congélation et reprendre par la suite une croissance normale (Wang *et al.*, 2011 ; Green et Neefus, 2014 ; Lin *et al.* 2010). Cela suggère que l'algue *Porphyra* possède véritablement une tolérance élevée au stress de gel. Par ailleurs, il est plausible de croire que des mécanismes de tolérance à la sécheresse jouent un rôle dans la tolérance au gel puisque de nombreux gènes régulés par le froid dans certaines plantes réagissent aussi au stress de la sécheresse (Guy 2003). De plus, la survie au gel est fortement liée à la teneur en eau des algues et donc, à la tolérance à la sécheresse (Chen *et al.*, 2007 ; Lin *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2011).

Selon les résultats obtenus de l'expérience de Green et de Neefus, 100 % des algues ont survécu et ont continué à grandir après une période de congélation de 1, 3, 6, ou 12 mois à -80 °C ou -20 °C. Suite à la congélation, le taux de croissance moyen des algues qui a été observé se situe entre 7,06 et 8,03 ± 0,16 % par jour. De façon générale, les différences entre chacune des conditions sont moindres. Cependant, les algues qui ont été congelées pendant 6 mois ont montré un meilleur résultat que celles congelées pendant 12 mois (Green et Neefus, 2014).

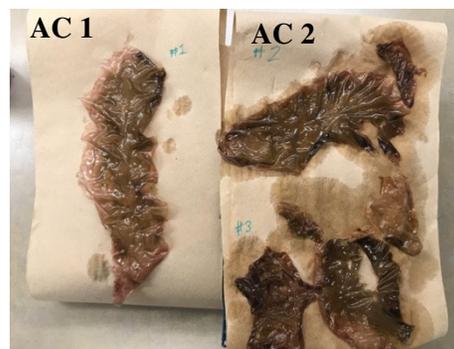
Les algues absorbent entre autres l'azote, le phosphore et le dioxyde de carbone pour assurer leur croissance et leur stockage d'énergie. Lorsque les algues sont récoltées, les nutriments qu'elles ont absorbés sont également retirés de l'eau (Kim *et al.* 2017). C'est la morphologie de l'algue *Porphyra* qui lui permet d'absorber très rapidement les nutriments. En fait, la lame mince du gamétophyte est composée d'une ou deux couches de cellules qui

sont toutes impliquées dans l'absorption des nutriments (Kraemer *et al.* 2004). Puisque le rapport surface-volume de cette algue est élevé, cela donne une réponse rapide quant à la disponibilité des nutriments contenus dans son environnement (Neori *et al.*, 2014). Selon l'expérience de Kraemer *et al.* (2004), *P. umbilicalis* absorbe le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> plus rapidement à une température de 15 °C (15 °C > 10 °C = 5 °C) (Kraemer *et al.* 2004). Il a aussi été conclu que *Porphyra* pouvait assimiler les deux formes de N inorganique lorsqu'elles sont présentées simultanément. Elle retirait le NH<sub>4</sub><sup>+</sup> six fois plus rapidement que le NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

L'objectif de ce projet de recherche était d'analyser l'effet de la congélation de l'algue *Porphyra umbilicalis* sur sa capacité d'absorption d'ammoniaque et sa croissance dans le but d'améliorer la technique de culture et la conservation de cette algue rouge.

## Matériel et méthodes

Des algues *Porphyra umbilicalis* ont été récoltées à l'intérieur du quai de Cap-aux-Meules au début du mois de novembre 2019. Elles ont été entreposées jusqu'au début de l'expérience (5 mars) dans un bassin d'eau de mer maintenue à environ 10 °C par un refroidisseur. Les algues étaient sous une luminosité moyenne de 100 μmol photons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> et à une photopériode correspondant à 14 :10-h, alimentée par des tubes fluorescents.



**Figure 1.** Phase de déshydratation des algues qui seront congelées.

Trois algues ont été sélectionnées au hasard pour la réalisation de l'expérience. Elles ont été retirées du bassin et séchées à l'aide d'une essoreuse à salade et de papier. La masse de chacune a été mesurée. Ensuite, les algues ont subi une déshydratation à l'air à la température de la pièce (environ 20,9 °C) pendant 30 minutes (Green et Neefus, 2014).

Après déshydratation, la masse de chaque algue a été recueillie. Elles ont été transférées dans des contenants individuels et immédiatement placées au congélateur à une température de -20 °C.

Suite à une période de congélation de 9 semaines, la masse de chaque algue a été notée. Elles ont été coupées afin d'obtenir une biomasse initiale semblable pour chacune, soit d'environ 1,31 g. Elles ont ensuite été placées individuellement dans des erlenmeyers de 2 litres contenant une solution d'ammoniaque concentrée à 11,96 ppm. Afin de comparer la capacité d'absorption d'ammoniaque par les algues congelées à celle des algues non congelées, trois algues sélectionnées au hasard ont également été placées dans des erlenmeyers sous les mêmes conditions. Des diffuseurs d'air procuraient une aération à l'intérieur de ces erlenmeyers et deux tubes de lumière à DEL fournissaient une luminosité variant de 120 à 230  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La photopériode correspondait à environ 14 :10-h et était programmée par un minuteur.

## L'effet de la congélation sur l'absorption d'ammoniac

Afin de répondre au but de l'expérience qui est de tester la capacité des algues congelées à absorber l'ammoniaque contenue dans l'eau, un suivi du taux d'ammoniaque de chaque erlenmeyer a été effectué sur une période de 6 jours (144 h). La prise de données s'est fait toutes les 48 h.

Premièrement, une solution mère d'ammoniaque a été fabriquée à partir d'une poudre de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et a été préparée dans un bassin contenant 100 litres d'eau de mer brute. La valeur de la concentration initiale de  $\text{NH}_4^+$  fixée pour cette expérience était d'environ 2,67 ppm. Il a été possible de déterminer la masse de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nécessaire à l'aide du calcul suivant :

$$\frac{500 \mu\text{mol NH}_4^+}{\text{L}} \times \frac{10^{-6} \text{ mol NH}_4^+}{\mu\text{mol}} \times \frac{1 \text{ mol NH}_4\text{Cl}}{1 \text{ mol NH}_4^+} \times \frac{53,491 \text{ g NH}_4\text{Cl}}{\text{mol NH}_4\text{Cl}} = 0,0267 \text{ g NH}_4\text{Cl}$$

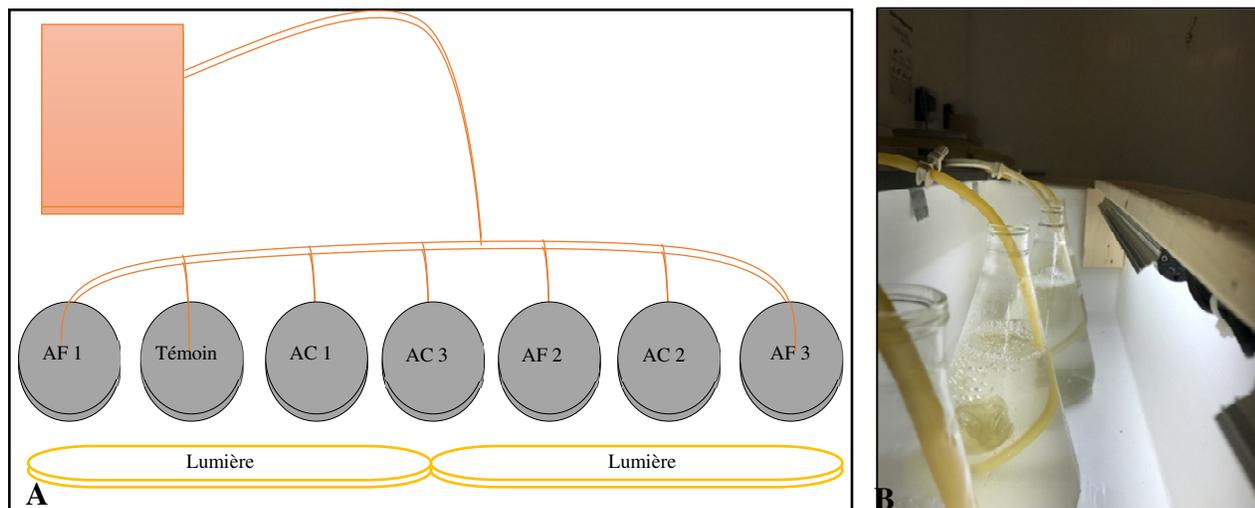


Figure 2. Le design expérimental

La concentration d'ammoniaque dans l'eau des erlenmeyers a été déterminée à l'aide de la méthode colorimétrique. Ces tests ont été réalisés avec le SMART3 Colorimeter (LaMotte) et son kit de détection d'ammoniaque *high range*. Puisque la concentration maximale d'ammoniaque qui peut être détectée par l'appareil est de 4 ppm, une dilution de 30 % a été effectuée. En effet, 3 ml d'eau prélevés des erlenmeyers étaient dilués dans 9 ml d'eau distillée. Étant donné que la valeur de la concentration en ammoniaque pour l'erlenmeyer noté AC 2 était faible à 196 h, la dilution effectuée était de 50 % (6 ml d'eau prélevée de l'erlenmeyer pour 6 ml d'eau distillée). Pour réaliser le test de colorimétrie, un volume de 10 ml a été prélevé de chacun des erlenmeyers à l'aide de micropipettes de 10 ml pour être transféré dans un flacon désigné au test de colorimétrie. Ensuite, 2,0 ml du réactif Salicylate ont été ajoutés au flacon, puis 0,30 g du deuxième réactif. Après un temps d'attente d'une minute (chronomètre), une quantité de 0,3 g de réactif no. 3 a été ajoutée. Enfin, le flacon a été déposé à l'intérieur du colorimètre pour déterminer la valeur de la concentration en NH<sub>3</sub>-N. Afin d'exprimer la concentration de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de la solution, il a fallu multiplier la valeur affichée par le colorimètre (ppm de NH<sub>3</sub>-N) par 1,3 (LaMotte, s.d.). Les réactifs utilisés pour ce test sont dangereux, alors le matériel a été manipulé avec des gants. Le port du sarrau et des lunettes était également obligatoire.

### L'effet de la congélation sur la croissance

Afin de vérifier la croissance de chacune des algues, celles-ci ont été pesées au début et à la fin de l'expérience. La biomasse algale initiale était fixée à environ 1,31 g. Pour la pesée, les algues ont été retirées de leur erlenmeyer et séchées. En effet, elles ont été essorées en appliquant une pression à la main et par la suite à l'aide d'uneessoreuse à la salade pendant trente tours complets. Les algues ont été pesées individuellement avec une balance d'une précision de deux chiffres après la virgule

(± 0,01 g). Les biomasses initiales et finales ont été notées afin de tracer leur croissance.

Des tests secondaires ont également été effectués toutes les 48 h de la période expérimentale. Ils avaient pour but de valider la stabilité et le bon déroulement de l'expérience. La température et la salinité ont été mesurées à l'aide d'un thermosalinomètre.

### Résultats et discussion

Lorsque les algues ont été retirées du congélateur, elles étaient presque identiques à leur apparence avant leur congélation. Cependant, les algues qui n'ont pas été congelées ont complètement changé d'apparence. Elles ont pris une couleur verdâtre et semblaient plus épaisses et résistantes (Figure 3). La couleur des algues rouges (*Rhodophytas*) varie naturellement du vert olive au brun rougeâtre. Elle est déterminée par différentes proportions de pigments comme la chlorophylle a, les carotènes a et b, les xanthophylles, les phycoérythrine et les phycocyanines (Jensen et Salisbury, 1988). Le pouvoir des algues à être coloré est affecté par le pH, la teneur en eau et la température (Araki *et al.* 1985). En ce qui concerne l'épaisseur de l'algue, il semble qu'elle peut être influencée par des conditions environnementales et l'âge (Niwa *et al.* 2005). En effet, les algues fraîchement recueillies étaient plus fines.

### L'effet de la congélation sur l'absorption d'ammoniac



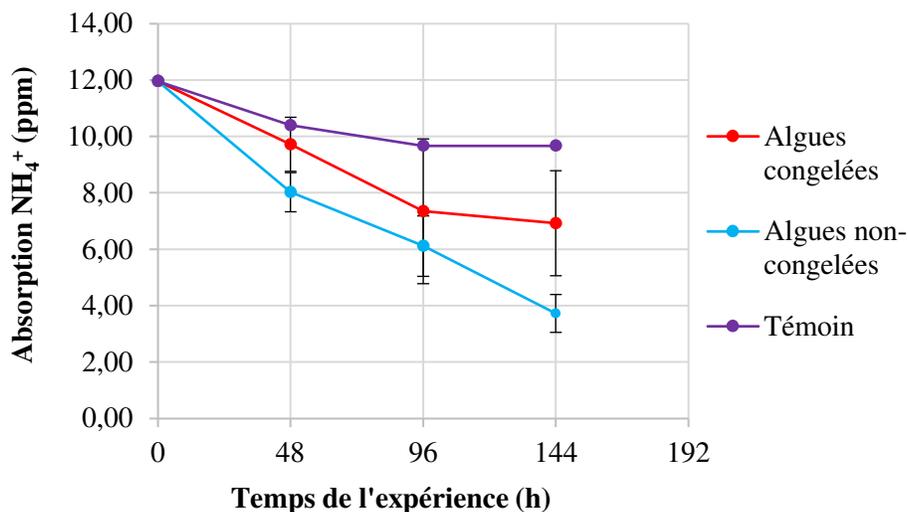
**Figure 3.** Comparaison de l'apparence des algues après congélation avec des algues qui n'ont pas été congelées.

Afin de valider la capacité des algues congelées à absorber l'ammoniaque en solution, un suivi a été effectué toutes les 48 h de l'expérience qui a duré 144 h. Les valeurs mesurées se retrouvent dans le Tableau 1.

De plus, un graphique de la concentration d'ammoniaque en fonction du temps a été tracé afin de représenter et comparer la capacité d'absorption des algues congelées et non congelées ainsi que le témoin (Figure 4). En fin de compte, tous les types de traitement ont connu une diminution du taux d'ammoniaque. En ce qui a trait aux barres d'erreurs affichées sur la Figure 4, il est possible de constater

**Tableau 1.** Variation des valeurs mesurées de concentrations d'ammoniaque dans chaque type de traitement sur une période de 144 h.

Type de traitement	Temps de l'expérience (h)	Absorption de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm)	Écart-type (ppm)
Algues congelées	0	11,96	0
	48	9,72	0,96
	96	7,35	2,57
	144	6,92	1,86
Algues non congelées	0	11,96	0,00
	48	8,03	0,69
	96	6,12	1,07
	144	3,73	0,67
Témoin	0	11,96	x
	48	10,40	
	96	9,67	
	144	9,67	



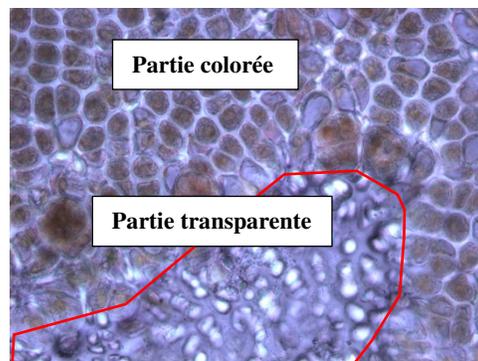
**Figure 4.** Comparaison de l'absorption d'ammoniaque par les algues congelées et non congelées ainsi qu'un témoin

que celles sur la courbe des algues congelées sont plus importantes que les autres. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à partir de 48 h, les algues congelées ont connu une absorption d'ammoniaque très différente les unes des autres. En effet, parmi les valeurs observées du taux d'ammoniaque à la fin de l'expérience, celui-ci était de 8,48 ppm pour l'algue 1, 4,86 ppm pour l'algue 2 et 7,44 ppm pour l'algue 3. Il est juste de croire que certaines cellules des algues congelées qui sont impliquées dans l'absorption de l'ammoniaque ont été endommagées lors de la congélation. De plus, selon les résultats de l'expérience menée par Green et Neefus (2014), une période de réhydratation des algues congelées était indiquée. Ils recommandaient d'immerger les algues dans l'eau de mer pendant 3 h immédiatement après les avoir sorties du congélateur (Green et Neefus, 2014 ; Wang *et al.* 2011). Cette étape n'a pas été effectuée lors de cette expérience et cela a pu avoir des répercussions négatives sur l'état de santé des algues et leur efficacité après la congélation. Il est aussi possible que l'étape du déchirement ait tué des parties des algues. À ce sujet, certaines parties d'algues congelées se sont décolorées pendant l'expérience. Ainsi, il y avait un nombre plus faible de cellules capables d'absorber l'ammoniaque de l'eau. Ce phénomène est observable sur l'algue congelée 1, comme le montre la Figure 5.



**Figure 5.** Algue congelée qui a perdu sa coloration

Les cellules de la partie transparente et celles de la partie colorée sont différentes. Il est possible de les comparer à l'aide de la Figure 6.



**Figure 6.** Photo des cellules d'une algue congelée prise au microscope (40x)

Cela coïncide également avec les résultats obtenus du test de l'absorption d'ammoniaque. En fait, l'algue 1 a eu le taux d'absorption moyen le plus bas, soit de 1,16 ppm de  $\text{NH}_4^+$  par 48 heures. Tout au long de l'expérience, elle a réussi à retirer 29,1 % de l'ammoniaque contenue dans l'eau. Quant aux algues congelées 2 et 3, leur solution a connu une diminution d'ammoniaque respective d'environ 2,37 et 1,51 ppm par 48 h. Elles ont donc en fin de compte absorbé 59,4 % et 37,8 % de l'ammoniaque de la solution initiale. En moyenne, les algues congelées ont réduit de 5,04 ppm la concentration d'ammoniaque de l'eau.

Bien que les algues congelées semblent tout de même avoir une bonne capacité d'absorption d'ammoniaque, si on les compare aux algues non congelées, on en convient que ce n'est plus ou moins le cas. Effectivement, les algues non congelées 1, 2 et 3 sont parvenues à absorber 62,6 %, 70,4 % et 73,5 % de l'ammoniaque de leur solution. Les taux d'ammoniaque retirés par jour étaient également supérieurs à ceux des algues congelées. Le taux d'ammoniaque de la solution qui contenait l'algue 1 a diminué à raison d'environ 2,50 ppm par 48 h, celle de l'algue 2 d'environ 2,81 ppm et finalement celle de l'algue 3 d'environ 2,93 ppm. En moyenne, les algues non congelées ont réduit de 8,23 ppm la concentration d'ammoniaque de l'eau.

En bref, il est juste d'affirmer que toutes les algues ont absorbé l'ammoniaque dans l'eau, puisque les barres d'erreurs des deux traitements ne chevauchaient pas les valeurs du témoin à la fin de

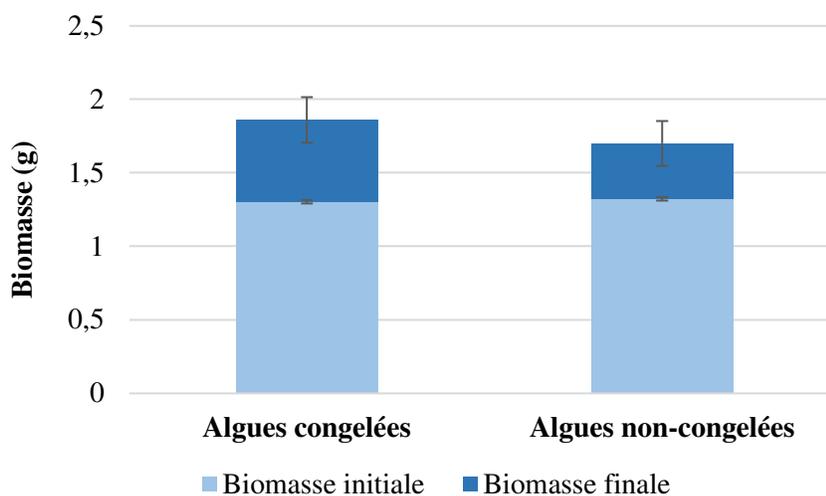
l'expérience. Ainsi, l'absorption de  $\text{NH}_4^+$  par les algues était significative. Le témoin a absorbé au total environ 19,1 % de l'ammoniaque contenue dans l'eau.

### L'effet de la congélation sur la croissance

Dans le but de vérifier l'effet de la congélation des algues sur leur croissance, la biomasse de chacune des algues a été notée au début et à la fin de l'expérience. Sur une période de 144 h, toutes les algues ont connu une croissance. Ces résultats sont illustrés par le Tableau 2 et la Figure 7.

**Tableau 2.** Biomasses moyennes initiales et finales des algues congelées et non congelées

Type d'algues	Temps de l'expérience (h)	Biomasse (g)	Écart-type (g)
Algues congelées	0 h	1,30	0,01
	144 h	1,86	0,17
Algues non congelées	0 h	1,32	0,01
	144 h	1,70	0,16



**Figure 7.** Croissance moyenne des algues congelées et non congelées sur une période de 144 h.

Selon les résultats obtenus concernant la biomasse algale, il est possible de confirmer que les algues congelées ont repris une croissance normale après une période de congélation. Ce résultat était attendu, car cette donnée avait été validée par différents projets de recherche à ce sujet (Green et Neefus, 2014 ; Wang *et al.* 2011). Étonnamment, les algues congelées ont connu une croissance supérieure à celle des algues non congelées. Comme les algues congelées étaient très minces et translucides comparativement aux algues non congelées, il était attendu que les algues non congelées aient une biomasse supérieure. Dans les faits, la biomasse moyenne des algues congelées a augmenté de 0,56 g, tandis que celle des algues non congelées de 0,38 g. Les barres d'erreur des deux types d'algues ne se chevauchent pas, ce qui signifie que ce résultat est significatif.

## Conclusion

En conclusion, l'algue *Porphyra umbilicalis* peut généralement survivre à une période de congélation de 9 semaines à -20 °C. Toutefois, les résultats montrent que la capacité des algues congelées à absorber l'ammoniaque n'est pas supérieure ni même comparable à celle des algues non congelées. Seule l'algue congelée 2 a absorbé une quantité d'ammoniaque qui se rapproche de celle observée chez les algues non congelées. En ce qui concerne la croissance, l'effet de la congélation sur les algues est positif. En effet, les algues congelées ont eu une augmentation de biomasse supérieure à celles non congelées. Il serait pertinent dans le cadre d'une expérience future d'utiliser des algues fraîches et de comparer différentes températures et durées de congélation.

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement Lisandre Gilmore-Solomon pour la supervision de ce projet de recherche, Robert Villeneuve pour le montage expérimental ainsi que Francine Aucoin pour l'approvisionnement en algues *Porphyra*.

Évidemment, je suis très reconnaissante de cette opportunité de projet offerte par l'option Recherche-Études du Cégep de la Gaspésie et des Îles en collaboration avec le centre de recherche Merinov.

## Références

- Araki, S., Ma, J., Ogawa, H., Oohusa, T., & Kayama, M. (1985). Influences of water activity and temperature on water sorption and pigment stability of toasted and dried laver "yaki nori" *Porphyra yezoensis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51, 1109–1114.
- Blouin NA, Brodie JA, Grossman AC, Xu P, Brawley SH (2011) *Porphyra* : a marine crop shaped by stress. *Trends Plant Sci* 16:29– 37.
- Brodie, J., Irvine, L.M., 2003. Seaweeds of the British Isles, Volume 1 Rhodophyta, Part 3B Bangiophycidae. The National History Museum, London.
- Chen CS, Weng L, Wang L, Ji DH, Xie CT, Xu Y (2007) Influence of desiccation and cold preservation on the survival and growth of *Porphyra haitanensis* and unwanted alga. *Acta Oceanol Sin* 29 (2):131–136.
- Chen, B. R. 1994. The study on the application of refrigerated- net technique for *Porphyra yezoensis*. *J. Aquacult.* 3:18–20 (in Chinese with English abstract).
- Dudgeon, S.R., Davison, I.R., Vadas, R.L., 1989. Effect of freezing on photosynthesis of intertidal macroalgae: relative tolerance of *Chondrus crispus* and *Mastocarpus stellatus* (Rhodophyta). *Mar. Biol.* 101 (1), 107–114.
- Fritsch, F.E. (1945) *The Structure and Reproduction of the Algae* Vol. II Phaeophyceae, Rhodophyceae, Myxophyceae and a Foreword, Cambridge University Press.
- Green, L.A., Neefus, C.D., 2014. The effect of short- and long-term freezing on *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Bangiales, Rhodophyta) blade viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 46:499–503.
- Guy, C.L., 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 187–223.
- Guy CL (2003) Freezing tolerance of plants: current understanding and selected emerging concepts. *Can J Bot* 81:1216–1223.

- Israel, A., 2010. The extreme environments of *Porphyra*, a fast growing and edible red marine macroalga. In: Seckbach, J., Chapman, D.J. (Eds.), Red Algae in the Genomic Age, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology, vol.13. Springer Science + Business Media B.V., pp. 61–75.
- Jensen, W. A., & Salisbury, F. B. (1988). Reino Plantae: algas. In *Botánica* (2nd ed.) (pp. 487–508). Mexico : McGraw-Hill.
- Kim, J.K., Yarish, C., Hwang, E.K., Park, M. et Kim, Y., 2017. Seaweed aquaculture : cultivation technologies, challenges and its ecosystem services. *Algae*. 8, 6.
- Kramer, G.P., Carmona, R., Chopin, T., Neefus, C., Xiaorong, T. et Yarish, C. (2004) Evaluation of the bioremediatory potential of several species of the red alga *Porphyra* using short-term measurements of nitrogen uptake as a rapid bioassay. *Journal of Applied Phycology* 16: 489-497.
- Kuwano, K., Aruga, Y., Saga, N., 1993. Cryopreservation of the conchocelis of the marine alga *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta) in liquid nitrogen. *Plant Sci*. 94, 215–225.
- Kuwano, K., Aruga, Y., Saga, N., 1996. Cryopreservation of clonal gametophytic thalli of *Porphyra* (Rhodophyta). *Plant Sci*. 116, 117–124.
- Lin, A.P., Wang, G.C., Shen, S.D., Yang, F., Pan, G.H., 2010. Two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycle of young thalli of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Phycol*. 46, 773–779.
- Lin AP, Wang GC, Yang F, Pan GH (2009) Photosynthetic parameters of sexually different parts of *Porphyra katadai* var. *hemiphylla* (Bangiales, Rhodophyta) during dehydration and rehydration. *Planta* 229:803–810.
- Lipkin Y, Beer S, Eshel A (1993) The ability of *Porphyra linearis* (Rhodophyta) to tolerate prolonged periods of desiccation. *Bot Mar* 36:517–523.
- Lobban, C. S. & Harrison, P. J. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 366 pp.
- Ma, J. H., Zhang, L. M., Ji, C. L., Yuan, M., Chen, S. G., Wang, H. Q., Shen, W., et al. 1998. On the refrigerated nets of *Porphyra yezoensis* and quality analysis of produce. *J. Fish. China* 22(Suppl.):65–71 (in Chinese).
- Miura, A. 1992. *Cultivation of Edible Algae in Japan*. Koseisha- koseikaku, Tokyo, 15 pp (in Japanese).
- Neori, A., Troell, M., Chopin, T., Yarish, C., Critchley, A. & Buschmann, AH. 2007. The need for a balanced ecosystem approach to blue revolution aquaculture. *Environment*. 49:36–43.
- Niwa, K., Kikuchi, N., & Aruga, Y. (2005). Morphological and molecular analysis of the endangered species *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta)1. *Journal of Phycology*, 41(2), 294–304.
- Notoya, M. (1997) Diversity of life history in the genus *Porphyra*. *Nat. Hist. Res.* 3, 47–56.
- Oohusa, T. 1984. Technical aspects of nori (*Porphyra*) cultivation and quality preservation of nori products in Japan today. *Hydrobiologia* 116/117:95–114.
- Pearson GA, Davison IR (1993) Freezing rate and duration determine the physiological response of intertidal fucoids to freezing. *Mar Biol* 115:353–362.
- Sahoo, D.B., Tang, X., Yarish, C., 2002. *Porphyra*-the economic seaweed as a new experimental system. *Curr. Sci.* 11 (83), 1313–1316.
- Smith CM, Satoh K, Fork DC (1986) The effects of osmotic tissue dehydration and air drying on morphology and energy transfer in two species of *Porphyra*. *Plant Physiol* 80:843–847.
- Wang, W.J., Wang, F.J., Zhu, J.Y., Sun, X.T., Yao, C.Y., Xu, P., 2011. Freezing tolerance of *Porphyra yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) gametophyte assessed by chlorophyll fluorescence. *J. Appl. Phycol.* 23, 1017–1022.
- Zhang, Y. J. 1988. *Cultivation of Porphyra*. Agricultural Press, Beijing, 178. pp. (in Chinese).

## AMMONIA NITROGEN - HIGH RANGE NESSLERIZATION METHOD • CODE 3642-SC

QUANTITY	CONTENTS	CODE
30 mL	Ammonia Nitrogen Reagent #1	V-4797-G
2 x 30 mL	*Ammonia Nitrogen Reagent #2	*V-4798-G
1	Pipet, 1 mL, plastic	0354

**\*WARNING:** Reagents marked with an \* are considered to be potential health hazards. To view or print a Material Safety Data Sheet (MSDS) for these reagents go to [www.lamotte.com](http://www.lamotte.com). To obtain a printed copy, contact LaMotte by e-mail, phone or fax.

Ammonia nitrogen is present in various concentrations in many surface and ground water supplies. Any sudden change in the concentration of ammonia nitrogen in a water supply is cause for suspicion. A product of microbiological activity, ammonia nitrogen is sometimes accepted as chemical evidence of pollution when encountered in natural waters.

Ammonia is rapidly oxidized in natural water systems by special bacterial groups that produce nitrite and nitrate. This oxidation requires that dissolved oxygen be available in the water. Ammonia is an additional source of nitrogen as a nutrient which may contribute to the expanded growth of undesirable algae and other forms of plant growth that overload the natural system and cause pollution.

### Test Procedures

APPLICATION:	Drinking, surface, and saline waters; domestic and industrial wastes.
RANGE:	0.00–4.00 ppm Ammonia Nitrogen
MDL:	0.05 ppm
METHOD:	Ammonia forms a colored complex with Nessler's Reagent in proportion to the amount of ammonia present in the sample. Rochelle salt is added to prevent precipitation of calcium or magnesium in undistilled samples.
SAMPLE HANDLING & PRESERVATION:	Ammonia solutions tend to be unstable and should be analyzed immediately. Sample may be stored for 24 hours at 4°C or 28 days at –20°C.
INTERFERENCES:	Sample turbidity and color may interfere. Turbidity may be removed by a filtration procedure. Color interference may be eliminated by blanking the instrument with a sample blank.

---

## PROCEDURE

1. Press and hold  until colorimeter turns on.
2. Press  to select **TESTING MENU**.
3. Scroll to and select **ALL TESTS** (or another sequence containing **005 Ammonia-N HR**) from **TESTING MENU**.
4. Scroll to and select **005 Ammonia-N HR** from menu.
5. Rinse a clean tube (0290) with sample water. Fill to the 10 mL line with sample.
6. Insert tube into chamber, close lid and select **SCAN BLANK**. (See Note)
7. Remove tube from colorimeter. Add 8 drops of Ammonia Nitrogen Reagent #1 (V-4797). Cap and mix. Wait 1 minute.
8. Use the 1.0 mL pipet (0354) to add 1.0 mL of \*Ammonia Nitrogen Reagent #2 (V-4798). Cap and mix. Allow 5 minutes for maximum color development.
9. At end of the 5 minute waiting period, immediately mix, insert tube into chamber, close lid and select **SCAN SAMPLE**. Record result.
10. Press  to turn the colorimeter off or press the  exit to a previous menu or make another menu selection.

### CALCULATIONS:

To express results as Unionized Ammonia (NH<sub>3</sub>):

$$\text{ppm Unionized Ammonia (NH}_3\text{)} = \text{ppm Ammonia-Nitrogen (NH}_3\text{-N)} \times 1.2$$

To express results as Ionized Ammonia (NH<sub>4</sub>):

$$\text{ppm Ionized Ammonia (NH}_4^+\text{)} = \text{ppm Ammonia-Nitrogen (NH}_3\text{-N)} \times 1.3$$

To determine the percentages of Unionized and Ionized Ammonia-Nitrogen, consult the Appendix.

NOTE: It is strongly suggested that a reagent blank be determined to account for any contribution to the test result by the reagent system. To determine the reagent blank, follow the above test procedure to scan a distilled or deionized water blank. Then follow the above procedure to perform the test on a distilled or deionized water sample. This test result is the reagent blank. Subtract the reagent blank from all subsequent test results of unknown samples. It is necessary to determine the reagent blank only when a new lot number of reagents is obtained.

**Figure 8.** Protocole de détermination de la concentration d'ammoniaque (Source : LAMOTTE, s.d.)

**Tableau 3.** Valeurs des masses des algues à chaque étape de l'expérience

# algue	Masse avant séchage	Masse après séchage	Masse après congélation	Masse expérience	Concentration algale	Biomasse finale
	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01	± 0,01
	g	g	g	g	g/L	g
AC1	2,63	1,45	1,31	1,31	2,62	2,02
AC2	2,23	1,87	1,77	1,29	2,58	1,69
AC3	3,15	2,37	2,20	1,31	2,62	1,87
AF1				1,31	2,62	1,52
AF2				1,33	2,66	1,74
AF3				1,33	2,66	1,84

**Tableau 4.** Résultats des tests de suivi des paramètres abiotiques

Temps de l'expérience (h)	Test	
0	Température de l'eau	9,4 °C
	Salinité	31,4
	Luminosité	120-230 µE
48	Température de l'eau	19,9 °C
	Salinité	31
96	Température de l'eau	19,3 °C
	Salinité	31,2
144	Température de l'eau	19,7 °C
	Salinité	31,4