



**Institut Universitaire Européen de la Mer**

Maîtrise de biologie des populations et  
des écosystèmes  
mention milieu marin

*année 1998-1999*

**APPROCHE BIOLOGIQUE  
ET CHIMIQUE DES BILANS EN  
SILICIUM  
DE CULTURE DE DIATOMÉES**

*Mémoire présenté par*  
**Josquin DEBAZ**

*Stage effectué au sein du laboratoire*  
**« flux de matière et réponse du vivant »**  
U.M.R. 6539 du CNRS

*Sous la direction de*  
**Véronique Martin-Jézéquel**

## ❧ REMERCIEMENTS ❧

Je tiens à remercier le laboratoire « flux de matière et réponse du vivant » de m'avoir accueilli, en particulier les chimistes qui m'ont entourés, durant ce stage, et surtout Nicolas pour ses conseils avisés, mais également les biologistes, dont Pascal pour sa collaboration.

Je tiens à saluer Annick et Rudolph qui m'ont supportés dans leurs lieux de travail et prêté assistance chaque fois que cela fut nécessaire.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Véronique Martin-Jézéquel pour son accueil, pour son soutien patient ainsi que ses conseils judicieux, et pour m'avoir permis de collaborer à ses recherches.

## ☞ S O M M A I R E ☞

Introduction et problématique	page 1
Matériel et méthode	page 3
Résultats	page 6
Discussion et interprétation	page 11
Applications	page 13
Conclusions	page 14
Bibliographie	page 15
Annexes	page 17

**INTRODUCTION  
ET  
PROBLEMATIQUE**

Engendré par fusion de l'oxygène au cœur d'une supergéante rouge, aggloméré avec les autres composants de notre planète dans la matière protoplanétaire, le silicium est devenu le deuxième élément en abondance de la croûte terrestre.

Or cette silice minérale est faiblement soluble dans l'eau, sous une forme dissoute, l'acide orthosilicique, couramment dénommé « silicates » :  $\text{Si(OH)}_4$ , présent dans des teneurs allant de 10  $\mu\text{M}$  dans l'océan à 100  $\mu\text{M}$  dans les eaux douces (Ragueneau, 1994).

Cette silice peut alors être utilisée par certains organismes aquatiques :

Les diatomées, algues unicellulaires planctoniques, sont à la base de la production primaire nouvelle, caractérisées par des vitesses de croissance très élevées et une floraison printanière (encore appelée *bloom*) ayant des conséquences importantes au niveau de l'écosystème côtier.

Elles possèdent une particularité morphologique intéressante : une paroi cellulaire constituée d'une couche organique associée à de la silice : le frustule. Ce frustule, composé de deux valves imbriquées, est synthétisé par la cellule après assimilation de molécules d'acide orthosilicique dissous. Il constitue la silice biogénique et représente la quasi totalité ( 95% ) de la silice cellulaire, le reste étant constitué par de la silice libre : le *pool* libre intracellulaire.

Afin de d'étudier la physiologie des diatomées et de connaître les différentes étapes de leur métabolisme, il est nécessaire de pouvoir les cultiver, et de pouvoir établir les bilans en silicates de ces cultures. C'est à dire la différence entre les silicates disparus du milieu de culture et la silice biogénique apparue.

Or, les bilans précédemment effectués n'étaient pas satisfaisant, en effet, les pertes en silicium total entre deux bilans étaient de l'ordre de 10 à 20% (10  $\mu\text{M}$  apparues pour 12 consommées) (Daoud, 1999).

Différentes hypothèses ont donc été posées afin d'expliquer les décalages entre les valeurs obtenues :

- ☛ Hypothèse 1 : pendant la culture, une partie des silicates du milieu sont transformés en éléments chimiquement non dosés, oligomères ou polymères de silicium ( hypothèse établie d'après Shuttle, 1986 ).
- ☛ Hypothèse 2 : le protocole de dosage de la BSi n'est pas performant :
  - Hypothèse 2.a : soit pour la digestion de la BSi
  - Hypothèse 2.b : soit pour le dosage du silicium extrait.

Le but de mon stage a donc été de tenter de corriger le protocole utilisé pour établir ces bilans, afin de les clarifier et d'obtenir des valeurs cohérentes. Mais également d'essayer d'appréhender les implications biologiques, si implication il y avait, dans les problèmes survenus.

Pour ce faire, lectures et discussions nous ont amenés à suivre la tactique suivante :

- ☛ vérifier les étapes méthodologiques
- ☛ trouver la ou les causes d'erreur
- ☛ en tirer les conclusions biologiques et pratiques qui s'imposent.

MATERIEL  
ET  
METHODE

## Cultures

Trois souches ont été cultivées dans le but d'être utilisées pour les manipulations :

- ☛ clone n°343 : *Cylindrotheca fusiformis*
- ☛ clone n°1015 : *Thalassiosira pseudonana*
- ☛ clone n°1049 : *Thalassiosira weissflogii*

## Filtration

Le bilan en silicium se faisant entre les silicates dosés dans le milieu et la BSi formée par les diatomées, on a donc procédé à la séparation des deux phases grâce au protocole suivant :

De 10 à 100 mL de culture sont filtrées sur des filtre de 47mm de diamètre, en polycarbonates (les filtres en acétate de cellulose et en chlorure de polyvinyle sont déconseillés pour la digestion HF, Krausse 1983), et dont les pores ont des diamètres de 0,6 et 2µm.

Les filtres sont alors séchés en étuve 24 heures, puis conservés au congélateur, tandis que les filtrats sont stockés au réfrigérateur.

## Dosage des silicates

### Protocole de référence

La méthode de référence est celle de J.B. Mullin et J.P. Riley (1965), modifiée par K.A. Fanning et E.Q. Pilson (1973) :

Les silicates dissous dans l'eau de mer sous forme d'acide orthosilicique monomérique ou dimérique réagissent en milieu acide (pH ∈ [1 ; 2]) avec les ions molybdates pour former un hétéropolyacide : l'acide silico-molybdique (réaction 1, temps conseillé dix minutes) :



Ce complexe jaune est réduit par un mélange de métol (sulfate de méthyl-amino-4-phénol), de sulfite de sodium, et d'acide sulfurique pour former un bleu de molybdène (réaction 2, temps conseillé deux heures) :

L'interférence avec les phospho- et arséniomolybdates est évitée en opérant à pH convenable et en ajoutant de l'acide oxalique.

La densité optique du complexe formé est mesurée à 810 nm en cuve de 5 ou 10 cm, et la concentration de l'échantillon est déterminée par une gamme étalon.

La précision du dosage est de  $0,25/\sqrt{n}$  µmol./L avec n déterminations

#### Remarque :

Il existe une méthode de routine par analyseur automatique qui arrête la réaction 1 au bout de trois minutes environs et utilise comme agent réducteur le chlorure d'étain, mais elle ne peut être utilisée ici, à cause d'une incompatibilité avec l'acide utilisé pour la digestion des filtres.

### Cinétiques des réactions

Pour tester les hypothèses 1 et 2.b :

- La réaction 1 a été suivie dans le temps en opérant sur les filtrats de plusieurs espèces (dont une fois après congélation du filtrat), les filtres de plusieurs espèces, la gamme étalon, ainsi que sur l'eau de mer synthétique ayant servi à la préparation des cultures.
- La réaction 2 a été suivie dans le temps sur un filtrat de culture de *Cylindrotheca fusiformis* (clone n°343).

### Digestion

#### Protocole de référence

Les filtres sont laissés dans l'acide fluorhydrique HF (0,2 mL de 2,9 M) pendant 40 min pour digérer la silice biogénique, et 48 heures pour digérer la silice lithogénique (pour des échantillons naturels mais celle-ci est absente des milieux de culture), puis 7 mL d'eau distillée sont ajoutés afin de stopper la digestion.

On amène alors la concentration dans la gamme de 0 à 15  $\mu$ M, sachant qu'il faut diluer au minimum 300 fois l'acide fluorhydrique, pour supprimer les interférences qu'il occasionne lors du dosage.

Un blanc est effectué par digestion identique d'un filtre vierge.

#### Cinétique de la digestion

Afin de tester l'hypothèse 2.a, 10 mL de deux souches (*Cylindrotheca fusiformis* et *Thalassiosira pseudonana*) ont été filtrés. Puis pendant 10 jours, deux filtres de *Thalassiosira pseudonana* et trois de *Cylindrotheca fusiformis* ont été mis à digérer chaque jour.

Ceci permettant de suivre la cinétique de la digestion de jour en jour, et ce pour les deux espèces conjointement.

## Bilans

On filtre deux fois 50 mL de deux cultures (une de clone n°343, l'autre de clone n°1015), une fois par jour pendant trois jours.

Les filtres digérés cinq jours ( selon les résultats obtenus, voir le paragraphe correspondant ) permettent d'obtenir la concentration en silice biogénique.

Les filtrats dosés avec un temps de développement de la réaction 1 de 60 minutes ( selon les résultats obtenus, voir le paragraphe correspondant ) permettent d'obtenir la concentration en silicates restant dans le milieu de culture.

Les bilans sont obtenus par la sommation des concentrations mesurées des filtres et des filtrats.

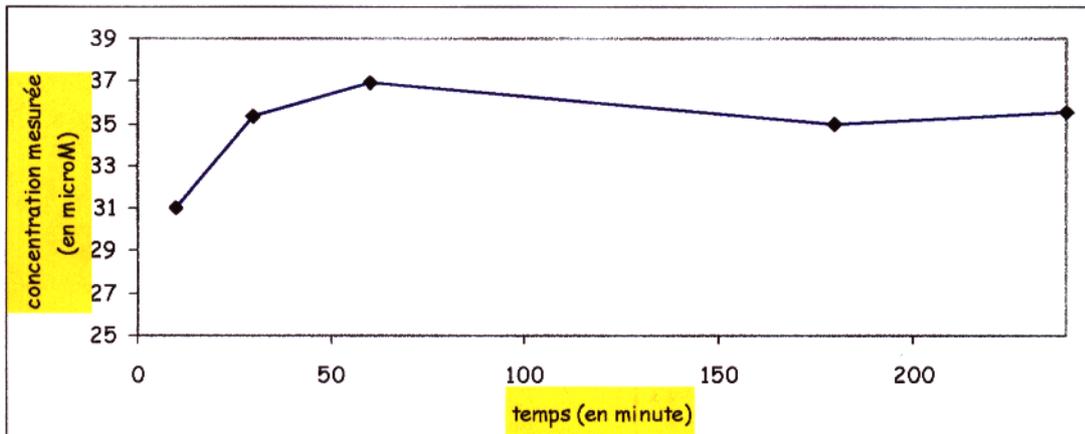
Il seront étudiés et comparés sur trois jours de culture et deux souches différentes. Le but étant de retrouver les silicates consommés dans la silice biogénique construite par les diatomées.

**RESULTATS**

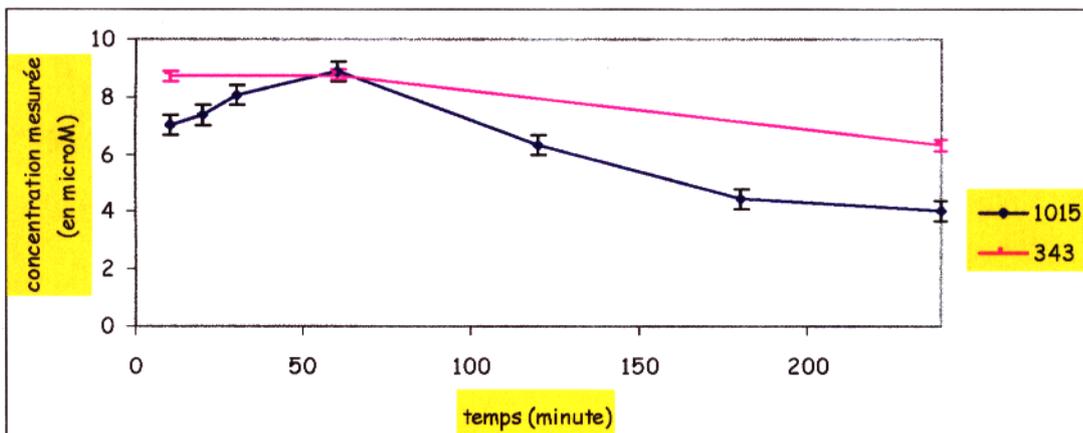
## Cinétiques du dosage

### Réaction 1

La concentration dosée des filtrats augmente sensiblement avec le temps de développement de la réaction 1, jusqu'à 60 minutes, puis décroît progressivement (graphiques 2), et ce sur plusieurs espèces et de manière répétable (graphiques 2 et 3). Pour une même espèce (*Cylindrotheca fusiformis*), lors de la première manipulation, le dosage a suivi le phénomène constaté (graphique 1), mais lors de la deuxième manipulation, il est resté relativement stable jusqu'à 60 minutes puis a commencé à décroître (graphique 2).

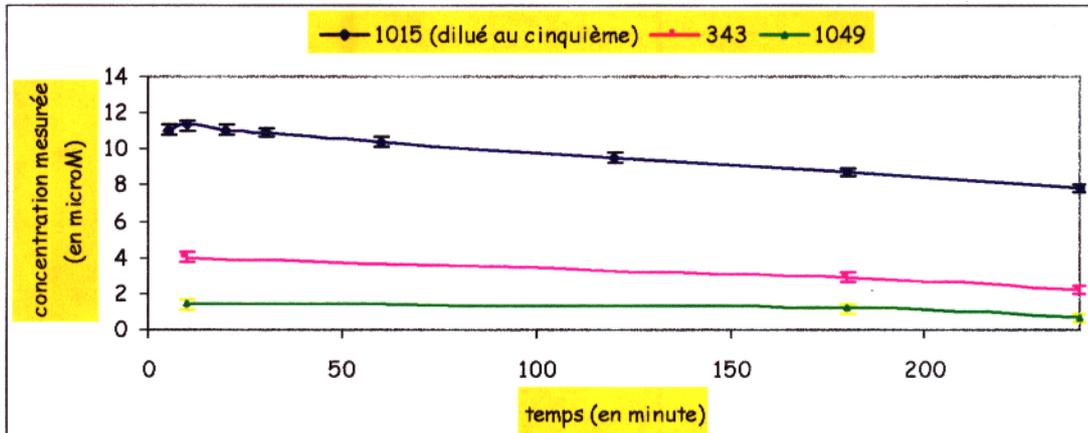


graphique 1 : cinétique de la première réaction du dosage des silicates des filtrats sur une souche de *Cylindrotheca fusiformis* (343)



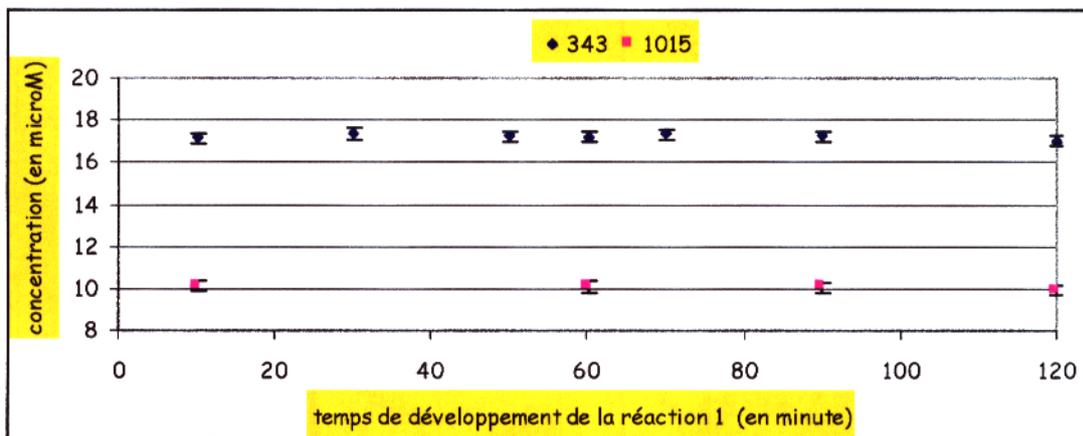
graphique 2 : cinétique de la première réaction du dosage des silicates des filtrats (répétabilité) avec les barres de précision du dosage

Cependant, lorsque le filtrat a été congelé au préalable, on n'assiste qu'à une décroissance de cette mesure avec le temps de développement de la réaction 1 (graphique 3).



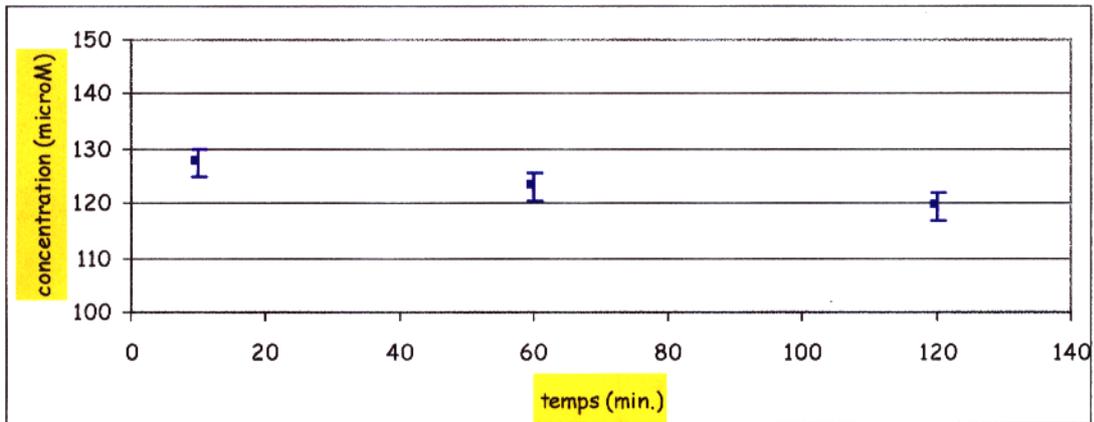
graphique 3 : cinétique de la première réaction après congélation des filtrats avec les barres de précision du dosage

Le dosage des filtres digérés ( graphique 4 ) ne semble pas subir de modification avec le temps de développement de la réaction 1.



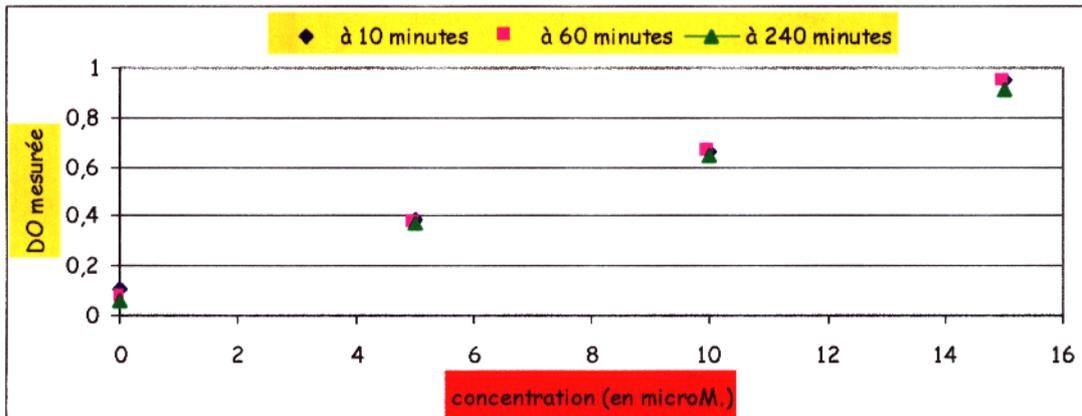
graphique 4 : cinétique de la première réaction du dosage sur digestion de filtres avec les barres de précision du dosage

Le dosage de l'eau de mer synthétique utilisée pour la culture des cellules (graphique 5) ne semble pas subir de modification avec le temps de développement de la réaction 1.



**graphique 5 :**  
cinétique de la première réaction du dosage des silicates sur l'eau de mer synthétique utilisée pour les cultures avec les barres de précision du dosage

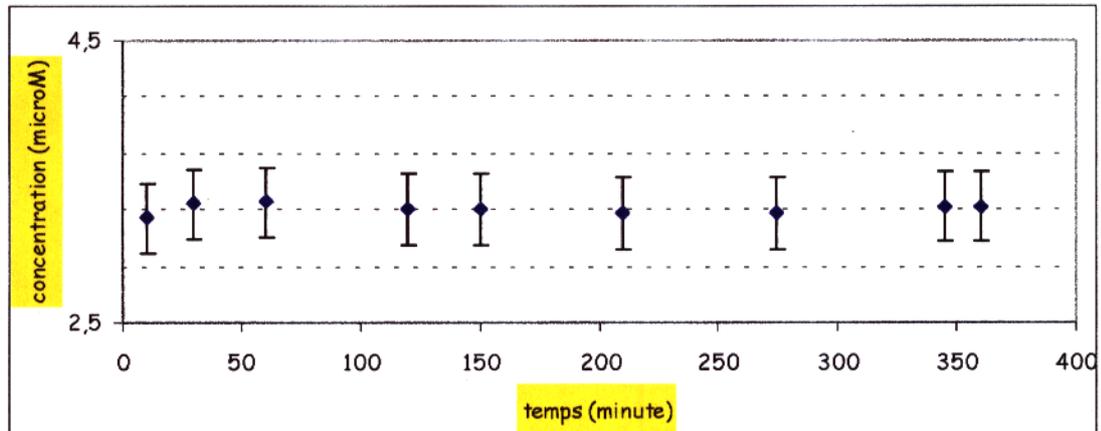
Le dosage de la gamme étalon ( graphique 6 ) ne semble pas subir de modification avec le temps de développement de la réaction 1. On observe en effet qu'à une même concentration en silicates connue correspond toujours la même mesure en spectrophotométrie, et ce pour plusieurs temps de développement de la réaction 1.



**graphique 6 :** gamme étalon effectuée pour trois temps de développement de la réaction 1

## Réaction 2

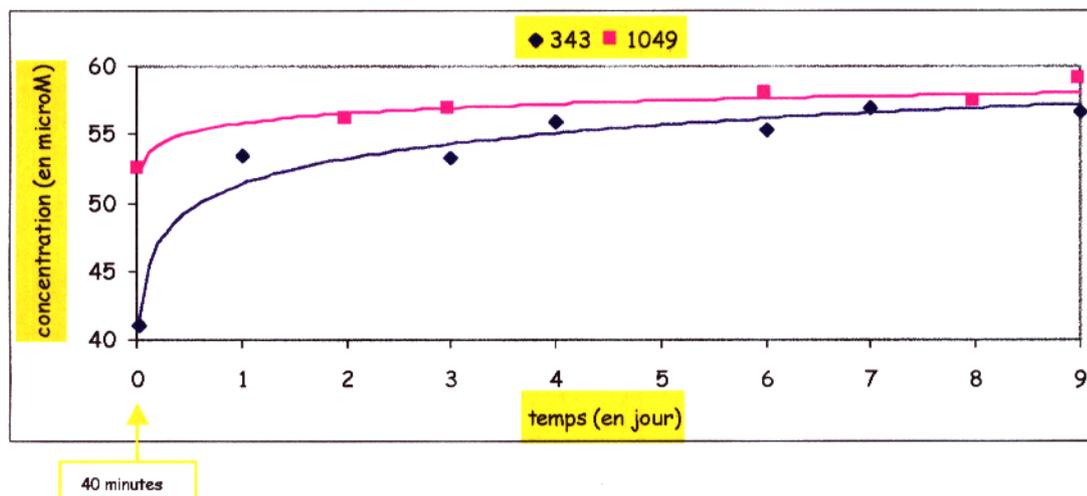
Le temps de développement de la réaction 2 ne semble pas modifier le dosage du silicium dans les filtrats (graphique 7).



graphique 7 : cinétique du développement de la deuxième réaction du dosage des filtrats avec les barres de précision du dosage

## Cinétique de la digestion

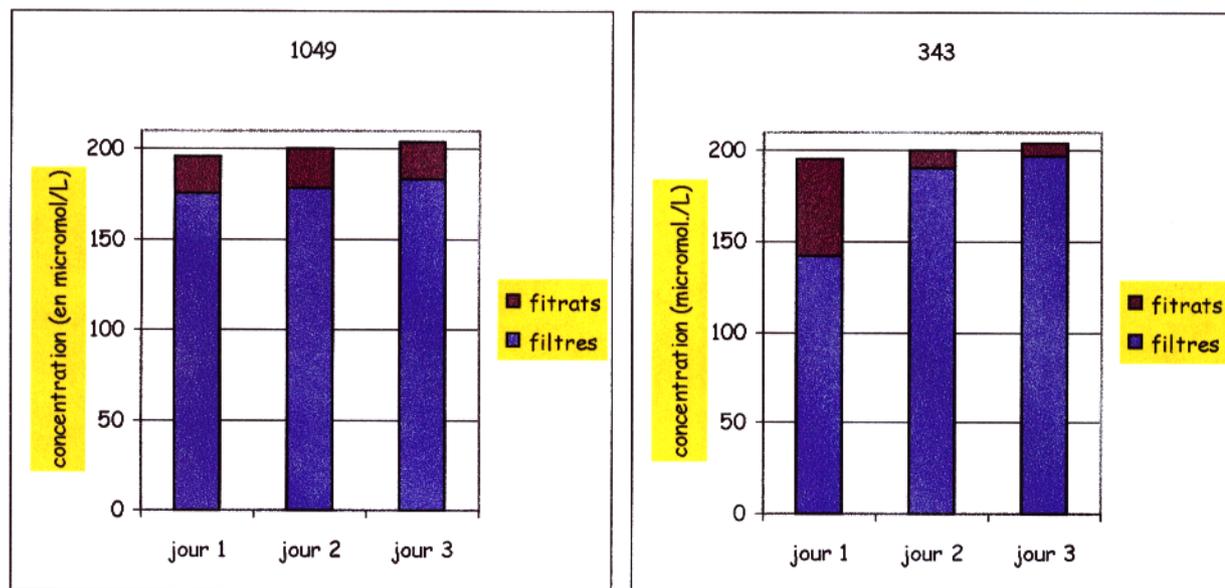
La concentration en silicates dosée augmente rapidement avec le temps de digestion pour atteindre un plateau vers cinq jours environ (graphique 8).



graphique 8 : cinétique de la digestion HF des filtres

## Bilans

Les bilans effectués semblent rester dans les mêmes concentrations totales (filtre + filtrat = silice biogénique + silicates dissous), sur plusieurs jours, pour plusieurs cultures sur des milieux identiques, et pour plusieurs souches (graphique 9).



**graphique 9 : bilans en silicium établis sur trois jours de culture**

la concentration des filtrats correspond à la concentration en silicates dissous

la concentration des filtres correspond à la concentration en silice biogénique

Les variations constatées d'un jour sur l'autre sont de l'ordre de 2 % ( $4\mu\text{M}$ ) et s'expliquent par la sensibilité de la méthode ( $\pm 2,8\mu\text{M}$  pour toutes les concentrations totales, sauf celle du premier jour pour la souche 343 :  $\pm 5,05\mu\text{M}$ ) et par la manipulation.

DISCUSSION  
ET  
INTERPRETATION

## Cinétiques du dosage

### Réaction 1

Les tests cinétiques de développement de la première réaction du dosage des silicates sur les filtrats indiquent que le temps requis (10 minutes) est trop faible. Cette réaction doit en effet se développer environ 60 minutes pour obtenir un dosage total. Après 60 minutes, il semblerait que l'acide silico-molybdique ait tendance à se dégrader (graphiques 2, 3, 4, et 6).

### Réaction 2

Le test cinétique de développement de la deuxième réaction du dosage des silicates sur filtrats indique que le temps requis (deux heures) est adéquat pour obtenir une coloration stabilisée.

## Cinétique de la digestion

Le test cinétique de la digestion des filtres de culture indique clairement que temps conseillé (40 minute) est largement insuffisant pour dissoudre la totalité de la silice biogénique, c'est à dire le frustule. Cet aspect est plus ou moins net selon l'espèce testée, ce qui pourrait s'expliquer par la différence morphologique qui existe entre les souches n°343 (pennée) et n°1049 (centrique), ceci pouvant amener une différence dans le rapport surface/volume, et/ou dans la microporosité du frustule qui sont déterminant dans la vitesse de dissolution du frustule (Parker *et al*, 1994).

Cependant une même tendance a été constatée sur des filtration de terrain, l'explication alors présentée concernait une phase amorphe mais non biogénique (del Amo *et al*). Il serait cependant difficile d'associer cette explication à des milieux de culture ne contenant pas de silice lithogénique. De plus, ce problème de bilan a déjà été trouvé en culture, mais n'avais pas été résolu (V. Martin-Jézéquel, communication personnelle).

Le temps de digestion minimal correspond donc au début du plateau constaté dans le graphique 1, c'est à dire environ cinq jours.

## Bilans

Les bilans réalisés avec les temps de réaction et de digestion optimisés semblent corrects d'un jour sur l'autre et entre les différentes cultures (cultivées sur milieu identique, ce qui apparaît sur le graphique 9).

Les problèmes de bilan étaient dus d'une part aux temps, trop courts, de digestion de la silice biogénique, et d'autre part à un problème de dosage des silicates dans le milieu de culture. Ces problèmes ayant été résolus, mes bilans établis sont satisfaisants, il semblerait donc que le but du stage ait été réalisé.

## Interprétation du problème de cinétique du dosage des silicates dans les filtrats

Le problème de développement de la première réaction du dosage des silicates sur les filtrats est intéressant.

En effet, les graphiques 5, 6 et 7 montrent que le temps de réaction de 10 minutes est suffisant pour les silicates dissous des digestats de filtre de culture, de l'eau de mer synthétique utilisée pour les cultures, et des gammes étalons.

Le graphique 4 indique qu'en cas de congélation des filtrats, la réaction 1 ne se développe pas plus après le temps requis. Or la congélation provoque la polymérisation des silicates dissous (Claquin 1998).

Il semblerait donc que le problème rencontré s'efface après polymérisation.

De plus, la méthode utilisée permet de détecter le silicate dissous sous forme monomérique (forme extrêmement majoritaire) ou dimérique (temps de réaction 1 = 10 minutes), mais aussi pour des formes oligomériques, en augmentant le temps de réaction à 60 minutes (Suttle *et al*, 1986).

Les résultats de ce stage interviennent donc en faveur de l'hypothèse 1, présentant la cause de notre problème sur les filtrats sous la forme d'oligomères de silicium.

En outre, la diversité des réponses obtenues, tant d'un point de vue interspécifique qu'au sein d'une même souche, peut laisser penser que ces oligomères seraient d'origine biologique.

Plusieurs questions d'ordre physiologique se posent alors : s'agit-il d'une excrétion métabolique, physiologique ou due à la culture *in vitro*, ou d'une dissolution partielle du frustule, physiologique ou due à la culture *in vitro* ?

**APPLICATIONS**

## Implications biologiques

Il était indispensable pour poursuivre des expérimentations de physiologie en laboratoire, de pouvoir effectuer des bilans surs.

Les tests et mises au point effectués au cours de ce stage ont permis de résoudre ces questions méthodologiques. Ils ouvrent, de plus, le champ à une étude physiologique sur la présence de ces polymères dans la culture.

## Applications méthodologiques

Il découle directement de ce stage que les utilisateurs de la méthode étudiée doivent prendre garde au temps de digestion de la silice biogénique, qui est de loin plus long que les 40 minutes prescrites. Ces utilisateurs devront également prévoir le temps de développement de réaction du dosage des silicates si ils travaillent sur du filtrat de culture.

Il serait également intéressant de poursuivre cette prospection méthodologique sur les méthodes automatiques de dosage, ainsi que sur les échantillons naturels.

## CONCLUSION

D'un point de vue personnel, ce stage m'a permis de m'intégrer dans une équipe de recherche et un laboratoire, de m'imprégner de cette ambiance et de développer des outils personnels d'analyse de résultats mais aussi de communication.

Durant ce stage, j'ai pu mener personnellement l'ensemble de la recherche, en étant toujours soutenu par les conseils avisés d'une équipe multidisciplinaire. J'ai pu, à cette occasion, constater l'importance du fonctionnement pluridisciplinaire du laboratoire « flux de matière et réponse du vivant ».

Toujours d'un point de vue personnel, le fait d'avoir mené, lors d'un stage d'initiation, une recherche méthodologique originale, et d'avoir atteint le but fixé est extrêmement valorisant. En outre, j'espère avoir réussi à exprimer mes résultats très empreints de chimie en restant biologiste dans mes conclusions.

Sur un plan scientifique, ce stage se justifie par les applications de ses résultats, tant pour les chercheurs ayant à manipuler les dosages étudiés, que pour les physiologistes intéressés par les bilans en silicium chez les diatomées et/ou l'hypothèse d'existence d'un polymère excrété par ces cellules.

**BIBLIOGRAPHIE**

Philip Barker, Jean-Charles Foutes, Françoise Gasse, Jean-Claude Druart, 1994  
Experimental dissolution of diatom silica in concentrated salt solutions and implication for paleoenvironmental reconstruction  
*Limnology Oceanography* 39(1), 99-110

Peter G. Brewer, Joel C. Goldman , 1976  
Alkalinity changes generated by phytoplankton growth  
*Limnology and Oceanography*, V.21(1), 108-117

Mark A. Brzezinski, David M. Nelson, 1989  
Seasonal changes in the silicon cycle within a Gulf-Stream warm-core ring  
*Deep sea research* vol.00, N°0, 0-88

J.D. Burton, T.M. Leatherland, P.S. Liss, 1970  
The reactivity of dissolved silicon in some natural waters  
*Limnol. Oceanogr.* 15, 473-476

Pascal Claquin, 1998  
Mise au point d'une méthode d'extraction du pool de silice soluble intracellulaire chez les diatomées.  
Rapport de stage de maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes, mention milieu marin

Daniel J. Conley , 1998  
An interlaboratory comparison for the measurement of biogenic silica in sediments  
*Marine Chemistry* 63, 39-48

Daoud Nedim, 1999  
Study of silicon assimilation by marine diatoms, application to eutrophicated environments  
Rapport de stage

Yolanda del Amo, Olivier Ragueneau, Akiyoshi Kamatani, Joseph Cotten, Paul Treguer, 1996  
Towards true biogenic silica ?  
Opaleo : On the use of opal as a paleo-productivity proxy, 85-91  
Workshop, Brest. O. Ragueneau, A. Leynaert, P. Treguer (eds).

Kamatani, 1971  
Physical and chemical characteristics of biogenous silica  
*Marine Biology* 8, 89-95

Gerald L. Krausse, Claire L. Schelske, Curtiss O. Davis, 1983  
Comparison of three wet-alkaline methods of digestion of biogenic silica in water  
*Freshwater Biology* 13, 73-91

Olivier Ragueneau, 1994

La dynamique du phytoplancton en écosystèmes côtiers macrotidaux : couplage avec l'hydrodynamique et le cycle biogéochimique du silicium.

Thèse de chimie marine

Olivier Ragueneau, Paul Treguer, 1994

Determination of biogenic silica in coastal waters : applicability and limits of the alkaline digestion method

Marine Chemistry 45, 43-51

Curtis A. Shuttle, Neil M. Price, Paul J. Harisson, Peter A. Thompson, 1986

Polymerization of silica in acidic solutions : a note of caution to phycologists

Journal of phycology 22, 234-237

ANNEXES

**ANNEXE 1**  
**Composition du milieu de culture utilisé**

**Eau de mer artificielle**

	Milieu g / l	Pour 10 litres en g
NaCl	24,1	241
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,2	32
MgCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	8,7	87
KCl	0,54	5,4
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1,6	16

10 litres d'eau milliQ, l'ensemble est autoclavé

**Milieu Complet**

	Milieu g / l	Stock g / l	Pour 10 litres vol stock
NaHCO <sub>3</sub>	0,270	27	100 ml
NaNO <sub>3</sub>	0,076	76	10 ml
NaSiO <sub>3</sub> , 9 H <sub>2</sub> O	0,170	62,5	27 ml
KBr	0,040	58	7 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,019	27	7 ml
HBO <sub>3</sub>	0,011	16	7 ml
SrCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,010	15	7 ml
Fe-NH <sub>4</sub> -Citrate	2,35.10 <sup>-4</sup>	0,336	7 ml
NaSeO <sub>3</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	1,60.10 <sup>-9</sup>	2,4.10 <sup>-5</sup>	0,7 ml
Metal Mix Stock II	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-2</sup>	1 ml
Vitamine Mix			1 ml

**Metal Mix**

	Milieu g / l	Stock I g / l	Stock II g / l
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	9,8.10 <sup>-6</sup>	9,8	9,8.10 <sup>-2</sup>
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	22.10 <sup>-6</sup>	22	22.10 <sup>-2</sup>
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	10.10 <sup>-6</sup>	10	10.10 <sup>-2</sup>
MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	18.10 <sup>-6</sup>	18	18.10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	6,3.10 <sup>-6</sup>	6,3	6,3.10 <sup>-2</sup>

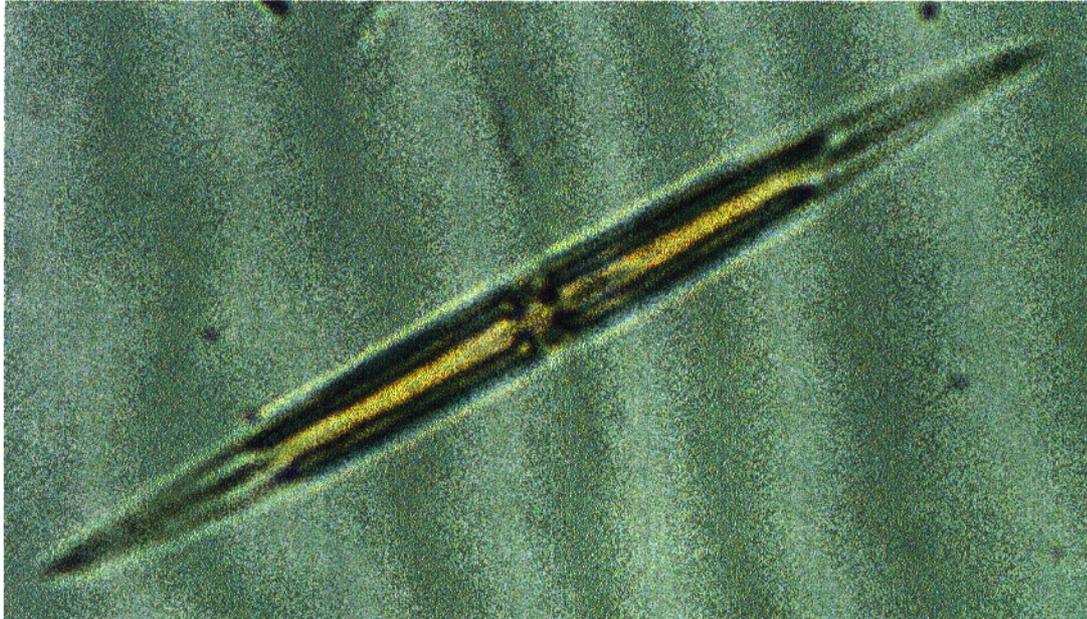
**Vitamine Mix**

	Milieu g / l	Stock I g / l	Stock II g / l
Thiamine-HCl (vit B1)	1,25.10 <sup>-4</sup>	0,125	0,125
d-biotin (vit H)*	6,25.10 <sup>-8</sup>	0,625	6,25.10 <sup>-5</sup>
Cyanobalamin (vit B12)	6,25.10 <sup>-8</sup>	0,625	6,25.10 <sup>-5</sup>

\* 0,0625 g d-biotin est dissous dans 1 ml de NaOH 2M, puis 99 ml d'H<sub>2</sub>O sont ajoutés

**ANNEXE 2**  
**Différence entre diatomées pennée et centrique**

**Exemple de diatomée pennée :**  
*Nitzschia sp*



**Exemple de diatomée centrique :**  
*Thalassiosira sp*

