

Influence of inorganic Phosphorus on phosphatase activity in stationary phase culture of *Nannochloropsis gaditana*

J. BLASCO and L.M. LUBIAN

Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, C.S.I.C., CADIZ (Spain)

Some microalgae species are able to grow with glycerophosphate as the only source of phosphorus (LUBIAN, 1981), which implies the presence of phosphatases in the algae. This presence has been widely studied in both freshwater and marine microalgae (KUENZLER & PERRAS, 1965; LIEN & KNUTSEN, 1973; CARPENE & WYNNE, 1986). The phosphatase activity was also detected in *Nannochloropsis gaditana*, this microalgae show only a maximum at pH 5.5 for whole cell and soluble and particulate fraction (LUBIAN *et al.*, 1992). The regulatory role of phosphorus in the synthesis of acid and alkaline phosphatases was shown for several algal species (KNUTSEN, 1968; VAN BOEKEL & VELDTHUIS, 1990). In this paper, we have studied the effect of inorganic phosphorus on phosphatase activity in stationary phase culture of *Nannochloropsis gaditana*.

Continuous culture of *Nannochloropsis gaditana* was carried out in a reactor of 1.5 l with f/2 medium enriched (GUILLARD & RYTHER, 1962), natural sea-water (36‰ salinity) containing a double amount of nitrate and phosphate at constant temperature of 20°C and continuous lighting (100 µE.m⁻².s⁻¹) with day light fluorescent lamps. When the phosphorus was omitted from medium the composition of this was the same but without phosphate.

Phosphatase activity was estimated by the liberation of p-nitrophenol from p-nitrophenyl orthophosphate (disodium salt, Merck) at saturating concentrations. Buffer was 100 mM citric acid/sodium citrate. When analyzing whole cell, buffer was made up with sea-water. For whole cell phosphatase activity, the reaction mixture contained 0.5 ml buffer, 0.5 ml microalgae culture and 50 µl substrate. Final concentration was 20 mM. For cell fractionation, the culture was centrifuged at 1600 g for 15 minutes, the supernatant discharged and the pellet washed twice in 0.6 M NaCl, 2 ml of 100 mM Tris-HCl at pH 7.0 were finally added and sonicated for 20 minutes in two steps. The extract was centrifuged for 15 minutes at 1600 g and the supernatant employed as enzyme source for the determination of phosphatase activity in soluble fraction. To the pellet resulting from the second centrifugation was added 2 ml of 100 mM Tris-HCl at pH 7.0 and sonicated for 5 minutes to resuspend it. The reaction mixture contained 1.0 ml buffer, 0.1 ml substrate and 0.1 ml extract or 0.1 ml of suspension depending on whether the soluble or the particulate fraction was analyzed. Final concentration was 50 mM. For all determinations of phosphatase activity a blank was run in parallel. The assay temperature was 30°C and incubation time was 60 minutes. The reaction was stopped by adding 100 mM NaOH to the reaction mixture. Phosphatase activities were calculated using a molar extinction coefficient of 18.5 cm².µmol⁻¹ at 405 nm (WALTER & SCHUTT, 1974). Results are expressed as U.(10¹²cell)⁻¹ (1U=1µmol p-nitrophenol.min⁻¹). For determining of cell phosphorus, 15 ml of culture was centrifuged at 1600 g for 15 minutes, and the pellet resulting was washed with 0.6 M NaCl twice. The pellet was digested with potassium persulphate at 130°C for 60 minutes. Inorganic phosphorus was determined with an autoanalyzer Technicon TRAACS 800. The analytical method was a modification of GRASHOFF *et al.*, (1983).

Cell density showed a weakly increase in the period 0-72.5 hours (range 19.0-28.0 10⁶ cell.ml⁻¹) (Fig. 1A), thus inorganic phosphorus flux was eliminated at 25.5 hours. For this reason, a fast decrease was observed for it (15.6 µg-at P.l⁻¹ at 25.0 hours and 0.09 µg-at P.l⁻¹ at 195.5 hours) (Fig. 1B). Thus at 193 hours an inorganic flux was newly added, inorganic phosphorus concentration only showed a little increase (2.5 µg-at P.l⁻¹). Notwithstanding cell phosphorus was increased at 1.8 µg-at P.l⁻¹ (Fig. 1A). Whole cell phosphatase activity (Fig. 1B) showed an increasing with time, ranging between 200 U.(10¹² cell)⁻¹ at initial period (0-72.5 hours) and 450 U.(10¹² cell)⁻¹ at last period (192-245 hours). A similar evolution for soluble fraction phosphatase activity was observed. In the case of particulate fraction a decrease was observed at final period.

Increase of whole cell phosphatase activity and the decrease of external inorganic phosphorus may reflect a dependence relation between them. The role of cell phosphorus in the regulation of phosphatase synthesis is likely important, however a gap period was observed in the response of phosphatase activity at the variation of cell phosphorus.

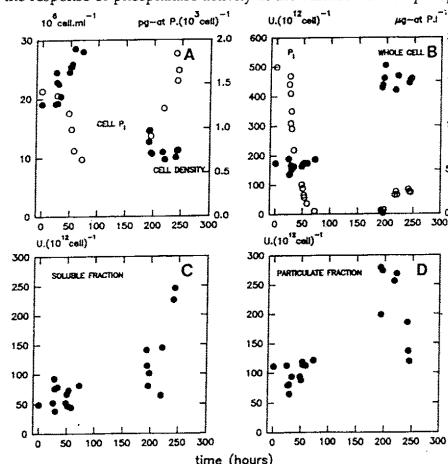


Fig. 1- A) Cell density and cell phosphorus, B) Pi culture concentration and whole cell phosphatase activity C) and D) soluble and particulate fraction phosphatase activity, respectively.

REFERENCES

CARPENE E. & WYNNE D., 1986.- *Comp. Biochem. Physiol.*, 83:163-167.
 GRASHOFF K., EHRHARDT M. & KREMLING K., 1983.- *Methods of Seawater Analysis*. Verlag-Chemie.
 GUILLARD R.R.L. & RYTHER J.H., 1962.- *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
 KNUTSEN G., 1968.- *Biochem. biophys. Acta*, 161: 205-214.
 KUENZLER E.J. & PERRAS J.P., 1965.- *Biol. Bull.*, 128: 271-284.
 LIEN T. & KNUTSEN G., 1973.- *Physiologia Pl.*, 28: 291-298.
 LUBIAN L.M., 1981.- Ph. D. Thesis, Univ. de Sevilla.
 LUBIAN L.M., BLASCO J. & ESTABLIER R., 1992.- *Br. Phyc. J.*, 27 (in press).
 VAN BOEKEL W.H.M. & VELDTHUIS M.J.W., 1990.- *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 61:281-290.
 WALTER K. & SCHUTT C., 1974.- In "Methods of Enzymatic Analysis", vol 2, Academic Press.

Relations entre le développement phytoplanctonique et le taux d'ammonification dans les sédiments de la Mer Ligurienne

BOISSON M.^o, BRACONNOT J.C.*^o, FERNEX F.*^o, MARMENEAU C.^o, MOITIE M.*^o et PUCCI R.^o

^o Office Monégasque de l'Environnement, MONACO (Principauté de Monaco)
^{*} Observatoire Océanologique, VILLEFRANCHE SUR MER (France)

Dans les régions côtières, comme celles de la Côte d'Azur, les concentrations en sels azotés dans les sédiments marins superficiels varient au cours du temps. Fréquemment, les concentrations sont élevées au printemps et parfois aussi en automne (FERNEX *et al.*, 1989). Ces variations ont été mises en parallèle avec les apports de matière organique dans les sédiments superficiels (BOISSON M. *et al.*, 1988). Au cours de l'année, la matière organique est transportée vers les sédiments principalement par les pelotes fécales du zooplancton. Parmi ces organismes les salpes produisent le plus grand volume de pelotes fécales (NIVAL *et al.*, 1985). Le but de ce travail est de déterminer l'importance du flux de matière organique dû à l'action des salpes pour la production des sels nutritifs azotés dans les sédiments superficiels. Pour ce faire une formulation mathématique simple du fonctionnement du système est présentée et appliquée aux observations faites durant le premier semestre de 1988.

Matériel et méthodes

Le site étudié, la sortie de la rade de Villefranche sur Mer (prof. 80 m), est en zone côtière exempte d'influence fluviale directe. Les salpes (*Thalassidroma*, *Salpa fusiformis*) ont été collectées plusieurs fois par mois à l'aide d'un filet de 1mm de vide de maille tiré verticalement à partir d'une profondeur de 70m. Ainsi, 60m³ d'eau ont chaque fois été filtrés. Les salpes ont été dénombrées à la loupe binoculaire. La biomasse phytoplanctonique est exprimée en µatg N en multipliant les teneurs en chlorophylle "a" (µg l⁻¹) mesurée par fluorescence (NEVEUX, 1976) par 0.65. Les sédiments ont été prélevés avec une benne Flucha à section carrée ne perturbant pratiquement pas les sédiments superficiels. Une épaisseur de deux centimètres du sédiment superficiel est prélevée et transvasée dans deux flacons de centrifugation. Immédiatement le premier flacon est centrifugé et l'eau surnageante filtrée à 0.2 µm après le retour au laboratoire. Le deuxième est mis en incubation dans l'obscurité à 13°C pendant 24 à 36 heures puis traité de la même façon que le premier. La différence des concentrations en sels azotés entre les deux flacons permet d'évaluer la production globale en sels nutritifs azotés du sédiment superficiel, qui est calculée en tenant compte de la teneur en eau; la production des sels nutritifs est exprimée en µatgN cm⁻³ s⁻¹. La même opération est effectuée sur les deux niveaux suivants (2-4 cm, 4-6 cm); la somme des trois valeurs permettra d'exprimer la productivité par unité de surface. Les sels nutritifs sont dosés suivant la technique de TREGUER et LE CORRE, (1975).

Résultats

Au premier semestre 1988, la biomasse phytoplanctonique augmente de mars jusqu'à mi-avril puis diminue jusqu'au début juin où elle se stabilise vers 0.15 ou 0.16 µg Chl "a" l⁻¹, soit environ 0.07 µatg N l⁻¹. A la mi-mars le nombre de salpes pêchées en un trait de filet est d'une dizaine, ce qui correspond à une concentration zooplanctonique (salpes s.l.) d'environ 0.3 10³ µatg N l⁻¹. Cette concentration augmente rapidement pour atteindre 800 individus à la mi-mai, puis décroît pour devenir pratiquement nulle à la fin juillet.

On constate que le taux de production des sels nutritifs azotés dans les sédiments superficiels suit l'évolution du nombre de salpes.

Discussion et conclusion

Pour préciser les relations entre les concentrations en sels nutritifs azotés (N) dans l'eau de mer, la biomasse phytoplanctonique (P), la concentration de salpes (S), le taux de transformation de l'azote organique (particulaire) A en sels nutritifs dans les sédiments superficiels, on utilise les formules ci-dessous adaptées de ANDERSEN *et al.* (1987). La première décrit les variations de concentrations du phytoplancton; la deuxième décrit la variation de la quantité de salpes. Les concentrations sont exprimées en µatg N l⁻¹, en estimant que le poids sec moyen d'une salpe = 0.5 mg, et que la biomasse de salpes dans un volume donné = le nombre de salpes dans ce volume multiplié par 2 µatg N.

$$(1) \frac{dP}{dt} = L \frac{N}{B+N} P - mP - I (1 - \exp(-K(P-P_0))) S$$

$$(2) \frac{dS}{dt} = aI (1 - \exp(-K(P-P_0))) S - (n+E)S$$

$$(3) \frac{dA}{dt} = I (1 - a) \delta 104S - KA$$

avec: t= temps, L= coefficient dépendant de la luminosité et de la température, il est maximum en juin (L_{max}= 0.63 j⁻¹); B= la moitié de la concentration optimale en sels azotés (B= 1.5 µatg N l⁻¹); P= quantité minimum de phytoplancton au dessous de laquelle les salpes ne peuvent pas survivre (= 0.055 µatg N l⁻¹); m= coefficient de mortalité qui tient compte du rôle des autres herbivores, il est minimum au mois de mai (= 0.05 j⁻¹); I= maximum d'ingestion des salpes; k= coefficient d'ajustement; E= coefficient représentant l'excrétion par les salpes (0.1 j⁻¹; ANDERSEN *et al.*, 1987) n= mortalité des salpes (= 0.05 j⁻¹ jusqu'au début juillet, 0.08 après).

Il faut noter que le terme L*N*P/(B+N) représente la production primaire, qui dans la région atteint son maximum entre la fin avril et la mi-juin (BROUARDEL et RINK, 1963; RODRIGUEZ-PRADA, 1973). Il s'agit de déterminer les valeurs des coefficients: a, I et K qui permettent d'ajuster les courbes des concentrations calculées aux valeurs mesurées. On trouve ainsi a= 0.14, I= 2 j⁻¹ et K= 28.

Ainsi les salpes ingèrent chaque jour une quantité de nourriture équivalente à 2 fois leur poids (sec) et rejettent 1.72 fois leur poids sous forme de pelotes fécales. Le taux maximum d'apport sur le fond qui a lieu en mai serait voisin de 2000 µatgN m⁻² j⁻¹. Le maximum du taux de transformation de l'azote organique (ammonification) dans les sédiments a eu lieu, en 1988, en juin; il n'est que de 1000 µatgN m⁻² j⁻¹, ce qui implique une augmentation des concentrations en azote organique particulaire dans les sédiments.

REFERENCES

ANDERSEN V., NIVAL P. and HARRIS R., 1987.- *J.mar.Biol.Ass.U.K.*, 67; 407.
 BOISSON M., BRACONNOT J.C., FERNEX F. et PUCCI R., 1988.- *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 31,2; 181.
 BROUARDEL J. and RINK E., 1963.- *Ann.Inst.ocean.*, XL; 109-164
 FERNEX F., BARATIE R., SPAN D. and FERNANDES L.V., 1989.- *Cont.Shelf Res.*, 9, 9; 767-794.
 NEVEUX J., 1976.- *Ann.Inst.ocean.*, 2, 2; 165-174.
 NIVAL P., BRACONNOT J.C., ANDERSEN V., OBERDORFF T., CHOE S.M. and LAVAL Ph., 1985.- *Rapp.Comm.int. Mer Médit.*, 29, 9; 283-286.
 RODRIGUEZ-PRADA F., 1973.- Thèse 3e, Univ. Paris VI, Stat. Zool.; 86 p.
 TREGUER P. et LE CORRE P., 1975.- Univ. Bretagne occid., Brest; 110 p.