

A. PENNA<sup>1</sup>, V. SCOCCIANTI<sup>2</sup> AND M. MAGNANI<sup>1</sup><sup>1</sup> Centro Biologia Ambientale, <sup>2</sup> Istituto di Botanica  
University of Urbino, 61029 Urbino, Italy

*Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve is a cosmopolitan marine diatom. Its main distribution is in coastal waters where it occurs frequently and often as the dominant species. Because of its ubiquitous nature and its ability to reach bloom densities, *S. costatum* has been subject of many physiological and ecological investigations. In the present paper we investigated the *in vitro* responses of *S. costatum* under conditions of temperature stress. Among the several cellular responses to stress conditions in plants and animal cells there is the synthesis of heat-shock proteins (HSPs) (NAGAO *et al.*, 1986), the activation of ATP and ubiquitin dependent degradation of damaged or unfolded proteins (RECHSTEINER, 1988), and the early changes in polyamine content (GALSTON, 1989). The results here reported show that *S. costatum* is able to activate all these responses. Furthermore, due to the importance of the production of extracellular polysaccharide in the Adriatic sea and since *S. costatum* accumulates large amounts of  $\beta$ -1,3-D-glucan (VÁRUM and MYKLESTAD, 1984), we also investigated the variation of polysaccharide content in *S. costatum* under temperature stress conditions.

*S. costatum* was cultured in the f/2 medium of Guillard and Ryther at 18°C, in a day:night cycle of 12h:12h. Polysaccharide content and polyamine content were determined according to DUBOIS *et al.* (1956) and SMITH and BES (1977) respectively. Protein pattern was analyzed by SDS-PAGE, the presence of ubiquitin and ubiquitin conjugates was revealed by western blotting. Ornithine and arginine decarboxylase activities were determined by measuring the <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> evolution from L-[1-<sup>14</sup>C] ornithine and DL-[1-<sup>14</sup>C] arginine as described by TORRIGIANI *et al.*, 1987.

*S. costatum* cells, usually grown at 18°C, were exposed to higher temperatures for 40 min. In cells at 25°C, 30°C and 35°C respectively, total cellular and extracellular carbohydrate content was determined. No variations in total carbohydrate content were observed; however extracellular carbohydrates increased after 40 min of 35°C stress. This production is probably not due to new synthesis but to cell disruption as supported by a corresponding decrease of the intracellular carbohydrates. At 35°C in fact a drastic decrease in cell number and viability was observed.

The temperature shift from 18°C to 30°C induced the appearance of new polypeptides typical of the heat shock response. At 35°C the protein electrophoretic pattern was similar to that observed at 18°C, suggesting that the cell protein machinery is no longer active at this temperature. Western blotting experiments performed with an anti-ubiquitin antibody revealed that *S. costatum* cells contained free ubiquitin and ubiquitin conjugates. The heat stress increased the number of ubiquitin conjugate, particularly those of high molecular weight. Thus the heat stress in *S. costatum* cells is associated with the conjugation of ubiquitin to endogenous proteins.

The polyamines putrescine, spermidine and spermine were present in *S. costatum* cells. Heat shock (40 min of 30°C stress) caused a marked increase in free putrescine and spermidine and in putrescine biosynthetic enzymes activities. A possible role for these different metabolic events in the adaptive response of *S. costatum* to rapid temperature shifts has been hypothesized.

## REFERENCES

- BONIN D.J., DROPP M.R., MAESTRINI S.Y. and BONIN M.C., 1986. Physiological features of six micro-algal to be use as indicators of seawater quality. *Cryptogamie, Algologie*, 7: 23.  
DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. and SMITH F., 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analyst. Chem.* 18: 350-356.  
GALSTON A.W., 1989. Polyamines and plant response to stress. In: Bachrach, U., Heimer, Y.M. (eds.) *The Physiology of Polyamines*. CRC Press, Boca Raton, Florida.  
NAGAO R.T., KIMPEL J.A., VIERLING E. and KEY J.L., 1986. The heat shock response: a comparative analysis. In Miflin, B.J. (ed.) *Oxford surveys of plant molecular and cell biology*. Oxford Univ. Press, Oxford.  
RECHSTEINER M., 1988. *Ubiquitin*. Plenum Press, New York.  
SMITH T. A. and BEST G.R., 1977. Polyamines in barley seedlings. *Phytochemistry*, 16: 841-843.  
TORRIGIANI P., SERAFINI-FRACASSINI D. and BAGNI N., 1987. Polyamines biosynthesis and effect of dicyclohexylamine during the cell cycle of *Helianthus tuberosus tuber*. *Plant. Physiol.*, 84: 148-152.  
VÁRUM K.M. and MYKLESTAD S., 1984. Effect of light, salinity and nutrient limitation on the production of  $\beta$ -1,3-D-glucan and exo-D-glucanase activity in *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 83: 13-25.

EXPÉRIMENTATION EN CAPTEUR À MEMBRANE.  
RÉSISTANCE AU CUIVRE D'*ESCHERICHIA COLI* DANS LES  
EAUX INTERSTITIELLES DE SÉDIMENTS MARINS :  
RÔLE DES PROTÉINESM. RICHOU<sup>1</sup>, C. LE POUPON<sup>1</sup>, D. FEVRIER<sup>1</sup>, C. MIRRE<sup>2</sup>, J. BENAÏM<sup>1</sup><sup>1</sup> Laboratoire de Chimie Marine des Organométalliques, Université de Toulon et du  
Var, 83957 La Garde, France<sup>2</sup> Laboratoire de Biologie de la différenciation cellulaire L.A. CNRS n°179, case  
901, 13288 Marseille cedex 9, France

Dans les eaux naturelles, les métaux Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> sous leur forme libre sont reconnus toxiques pour les systèmes biologiques (HART, 1981).

Ainsi pour les bactéries, les ions Cu<sup>2+</sup> sont indispensables dans leur métabolisme mais peuvent causer des effets cellulaires toxiques si le niveau des ions libres Cu<sup>2+</sup> n'est pas contrôlé. Plusieurs types de mécanismes de résistance au Cu<sup>2+</sup> ont été recensés (TREVORS, 1987; SILVER et WALDERHAUG, 1992).

L'accumulation - séquestration du cuivre par des protéines membranaires externes et péripasmiques a été proposée comme mécanisme de résistance pour un certain nombre de souches bactériennes afin d'abaisser le niveau intracellulaire d'un grand flux de Cu<sup>2+</sup>. Le plasmide portant l'opéron résistant au cuivre consiste en quatre gènes cop ABCD, opérant sous le contrôle d'un promoteur cuivre (MELLANO et COOKSEY, 1988).

La présence de formes bactériennes hautement résistantes à des concentrations élevées de métaux lourds est commune dans la nature au voisinage de déchets industriels. Ces souches contiennent des mégaplasmides. *Alcaligenes eutrophus* CH 34 contient le plasmide pMOL 30 (238 Kb) qui dirige la résistance aux métaux lourds Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>. L'intérêt de ces plasmides est de pouvoir se transmettre facilement d'une souche à l'autre (MERGEAY et NIES, 1985).

Nous avons montré (RICHOU *et al.*, 1992) les possibilités de survie en capteur à membrane d'*Escherichia coli*, dans les eaux interstitielles de sédiments marins d'un port contenant des taux très élevés de métaux lourds.

Le but de ce travail a été de déterminer si la forme de résistance aux métaux Cu<sup>2+</sup> d'*Escherichia coli* est due essentiellement à un mécanisme d'accumulation qui lui est propre ou/et si la possibilité de transmission de plasmide de bactéries du sédiment marin d'une souche à l'autre existe, ce qui augmenterait sa résistance.

Pour cela, les bactéries *Escherichia coli* sont placées dans un capteur à membrane. Des expériences en écosystème contrôlé sont effectuées dans des sédiments marins méditerranéens chargés en métaux lourds.

La résistance au cuivre d'*Escherichia coli* est testée. Pour cette étude, nous avons effectué des cultures cellulaires d'*Escherichia coli* témoins et après expérimentation *in situ*. Ces cultures se déroulent en absence et en présence de cuivre jusqu'à 4 mM pendant 20 heures.

A partir de cellules entières, de cellules lysées et de cellules fractionnées, les protéines totales, solubles et insolubles sont identifiées par leur masse molaire par électrophorèse de type LAEMMLI et quantifiées par la méthode de BRADFORD. Le dosage du Cu<sup>2+</sup> libre, complexé et/ou accumulé par les différents types de protéines est effectué par Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (D.P.A.S.V.) par la méthode des ajouts dosés. Le nombre de sites de fixation du Cu<sup>2+</sup> des différents types de protéines est ainsi déterminé en  $\mu$ moles d'équivalent Cu<sup>2+</sup> par  $\mu$ g de protéines en solution.

L'ensemble de ces résultats semble prouver l'existence chez *Escherichia coli* d'un mode de résistance au Cu<sup>2+</sup> par accumulation par les protéines qui lui est propre et une augmentation de cette résistance après contact avec le milieu naturel.

## REFERENCES

- HART B.T., 1981. Trace metal complexing capacity of natural waters: a review. *Environmental Technology letters*, 2: 95-110.  
MELLANO M.A. et COOKSEY D.A., 1988. Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.*, 170: 4399-4401.  
MERGEAY M. et NIES D., 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.*, 162: 328-334.  
RICHOU M., MIRRE C., BENAMOU C., MOUREAU Z., BENAÏM J., 1992. Expérimentation en capteur à membrane. Taux de survie d'*Escherichia coli* dans les eaux interstitielles de sédiments marins. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 33: 201.  
SILVER S. et WALDERHAUG M., 1992. Gene regulation of plasmid-and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 56: 125-228.  
TREVORS J.T., 1987. Copper resistance in bacteria. *Microbiol. Sci.*, 4: 29-31.

M