



**HAL**  
open science

# Mise au point d'un bioessai avec algues planctoniques d'eau douce destiné à mettre en évidence l'effet fertilisant d'une substance chimique

Sophie Gauthier-Clerc

► **To cite this version:**

Sophie Gauthier-Clerc. Mise au point d'un bioessai avec algues planctoniques d'eau douce destiné à mettre en évidence l'effet fertilisant d'une substance chimique. [Stage] Université de Metz. 1995, 29 p. hal-03797322

**HAL Id: hal-03797322**

**<https://hal.inrae.fr/hal-03797322>**

Submitted on 4 Oct 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



CEMAGREF

BX00013061

UNIVERSITE DE METZ  
U.F.R. Sci. F.A.

Maîtrise Mesure et Contrôle en Chimie-Biochimie-Biologie-Toxicologie

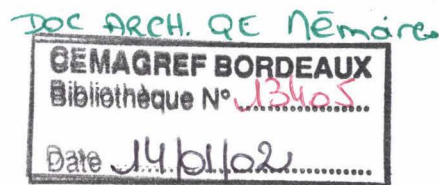
Mise au point d'un bioessai avec algues planctoniques d'eau douce  
destiné à mettre en évidence  
l'effet fertilisant d'une substance chimique

Rapport de stage effectué par Sophie GAUTHIER-CLERC  
soutenu le 27 Juin 1995

Maître de stage : Henri BEUFFE  
CEMAGREF-Groupement de BORDEAUX  
Division Qualité des Eaux

## REMERCIEMENTS

---



Je voudrais tout d'abord remercier messieurs Bernard ROUSSEAU Directeur du groupement de BORDEAUX ainsi que mon maître de stage Henri BEUFFE pour m'avoir accueillie au sein de la division Qualité des Eaux du CEMAGREF où ces trois mois de stage ont été riches en enseignements.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mathieu TORRE, ingénieur d'étude à la division "Qualité des eaux" pour sa disponibilité ainsi que ses conseils.

Je tiens également à remercier Michel COSTE et Alain DUTARTRE, respectivement chargé de recherche et ingénieur d'étude, pour l'aide qu'ils m'ont apportée ainsi que tout le personnel du laboratoire de chimie.

Que tous les stagiaires avec lesquels j'ai passé ces trois mois reçoivent un salut amical pour les remercier de leur bonne humeur et de leur collaboration.

## RESUME

---

L'intérêt de la mise au point d'un test avec algues planctoniques carencées en phosphore destiné à évaluer la fertilité de substances chimiques ou formulations lessiviellles (en partie responsables du phénomène d'eutrophisation accélérée des écosystèmes aquatiques), réside dans le fait que seule la présence de phosphore biodisponible relargué par la substance dans le milieu permettra aux algues carencées de croître.

Pour ce test, le milieu de culture est en effet exempt de phosphore lors de sa préparation (aucune source de phosphore extérieure pour les algues). Par ailleurs, les algues en conditions normales sont capables de constituer des réserves en phosphore alors appelé "phosphore de luxe". Grâce à ce stock intracellulaire de phosphore, les algues peuvent croître dans un milieu sans phosphore. Ainsi la croissance des algues mises en contact avec la substance étudiée ne serait pas directement synonyme d'effet fertilisant pour cette dernière (seule source potentielle de phosphore durant le test) si celles-ci ne sont pas préalablement carencées en phosphore afin que leurs réserves soient épuisées.

Pour la mise au point de ce test, nous avons choisi *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* assez représentatives du phytoplancton des eaux douces et utilisées pour le test d'inhibition de croissance de la norme ISO 8692 (1989). Le test ISO constitue en fait un test préalable afin de détecter les substances toxiques qui ne donneront pas lieu à de plus amples investigations.

Nous avons, entre autres, suivi la carence en phosphore de ces souches pour une période de 12 jours grâce à l'activité phosphatase alcaline qu'elles expriment afin de puiser dans leurs réserves en phosphore. Il s'agissait en effet d'estimer la durée de carence nécessaire pour que leurs réserves soient épuisées. Nos expérimentations avec lesquelles nous avons, certes, observé des différences interspécifiques, ne nous ont pas encore permis de quantifier le quota minimum de phosphore intracellulaire correspondant aux constituants cellulaires. Il est important que la carence des algues n'affecte pas ce quota minimum, car les conséquences physiologiques pour les algues seraient irréversibles.

De futures expérimentations nous permettront de suivre l'A.P.A. exprimée par les deux souches pour une période supérieure à 12 jours et il s'agira en second lieu d'effectuer un étalonnage des souches carencées avec des concentrations connues en phosphore. Ainsi, pour une biomasse maximale produite à partir des souches carencées mises en contact avec une substance-test correspondra une quantité de phosphore biodisponible relargué par cette substance en solution.

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I PHOSPHORE ET EUTROPHISATION .....</b>	<b>2</b>
1-1-Le phénomène d'eutrophisation accélérée.....	2
1-2-Origine des rejets de phosphore en milieu naturel .....	2
<b>II BIODISPONIBILITE ET ASSIMILATION DU PHOSPHORE PAR LE PHYTOPLANCTON .....</b>	<b>4</b>
2-1-Assimilation du phosphore par le phytoplancton.....	4
2-2-L'activité phosphatasique (A.P.).....	5
<b>III INTERET D'UN BIOESSAI AVEC ALGUES PLANCTONIQUES DESTINE A METTRE EN EVIDENCE L'EFFET FERTILISANT D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE</b>	
3-1-Bioessais avec algues planctoniques et biodisponibilité du phosphore.....	7
3-2-Principe du test .....	8
3-3-Mise en forme de ce test.....	8
<b>IV ETUDES PRELIMINAIRES .....</b>	<b>11</b>
4-1-Mode de culture des algues.....	11
4-2-Méthodes d'évaluation de la biomasse.....	13
4-3-Correlation entre les méthodes d'évaluation de la biomasse.....	14
<b>V EXPERIMENTATIONS.....</b>	<b>16</b>
5-1- Mises au point pour la mesure de l'Activité Phosphatase Alcaline.....	16
5-2-Recherche du pic d'absorption du pNP dans les conditions expérimentales et réalisation d'une gamme étalon du pNP.....	19
<b>VI STARVATION DE <i>SCENEDESMUS SUBSPICATUS</i> ET <i>RAPHIDOCELIS SUBCAPITATA</i>.....</b>	<b>20</b>
6-1-Suivi de la starvation des algues .....	20
6-2-Etude enzymologique .....	25
<b>VII CONCLUSION .....</b>	<b>28</b>
<b>VIII PERSPECTIVES .....</b>	<b>29</b>

# INTRODUCTION

---

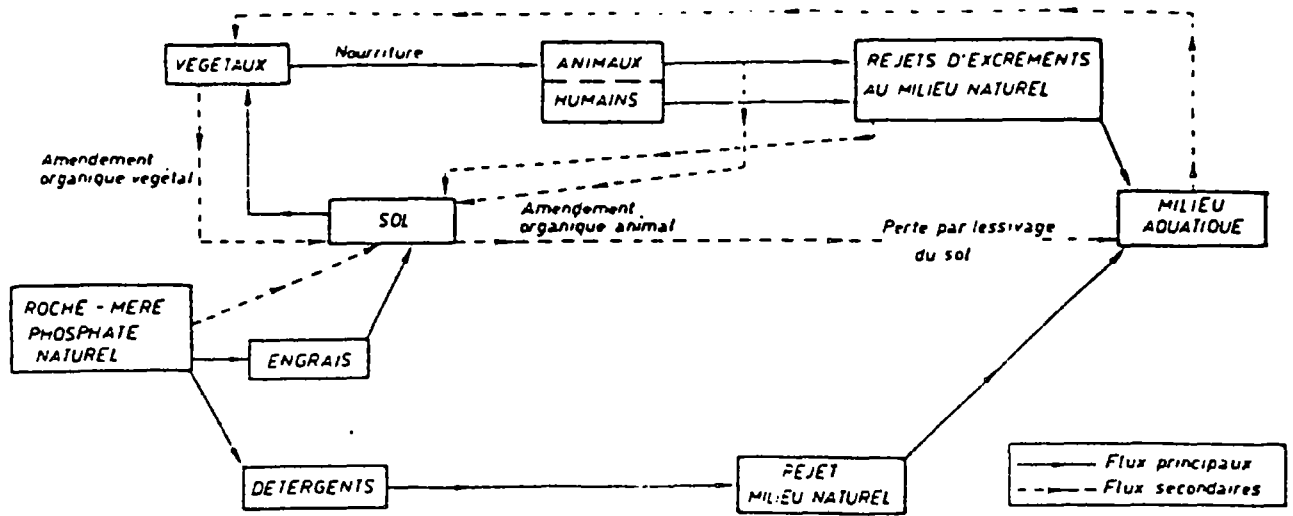
Les résultats acquis par Roland CARBIENER, professeur à l'université Louis PASTEUR de STRASBOURG, au sujet de l'impact des phosphates sur l'environnement (étude commandée par Brice LALONDE alors secrétaire d'état à l'environnement), ont entraîné en Mai 1990 la mise en place d'un programme national d'action pour limiter l'impact des détergents.

La conclusion du professeur CARBIENER était en effet que le phosphore est trop abondant dans notre environnement, que sa présence favorise la prolifération des algues et de ce fait une accélération de l'eutrophisation des eaux. Aussi dans le cadre de ce programme national, un comité Environnement-Détergents a été créé, dans lequel la commission Ecotoxicologie Aquatique Algues de l'AFNOR s'est impliquée.

Dans ce contexte, la participation de la division Qualité des Eaux du CEMAGREF relève de la mise au point d'un bioessai avec algues planctoniques qui s'inscrit dans la volonté du programme Environnement-Détergent de disposer de méthodes normalisées permettant de prévoir les effets fertilisants de substances chimiques contenant du phosphore.

Durant ces trois mois de stage, il s'agissait donc pour moi de mettre au point la mesure de l'activité phosphatase alcaline des algues carencées en phosphore afin de connaître leur degré de carence en cet élément pour la mise au point d'un test avec algues en état de starvation (ou carence).

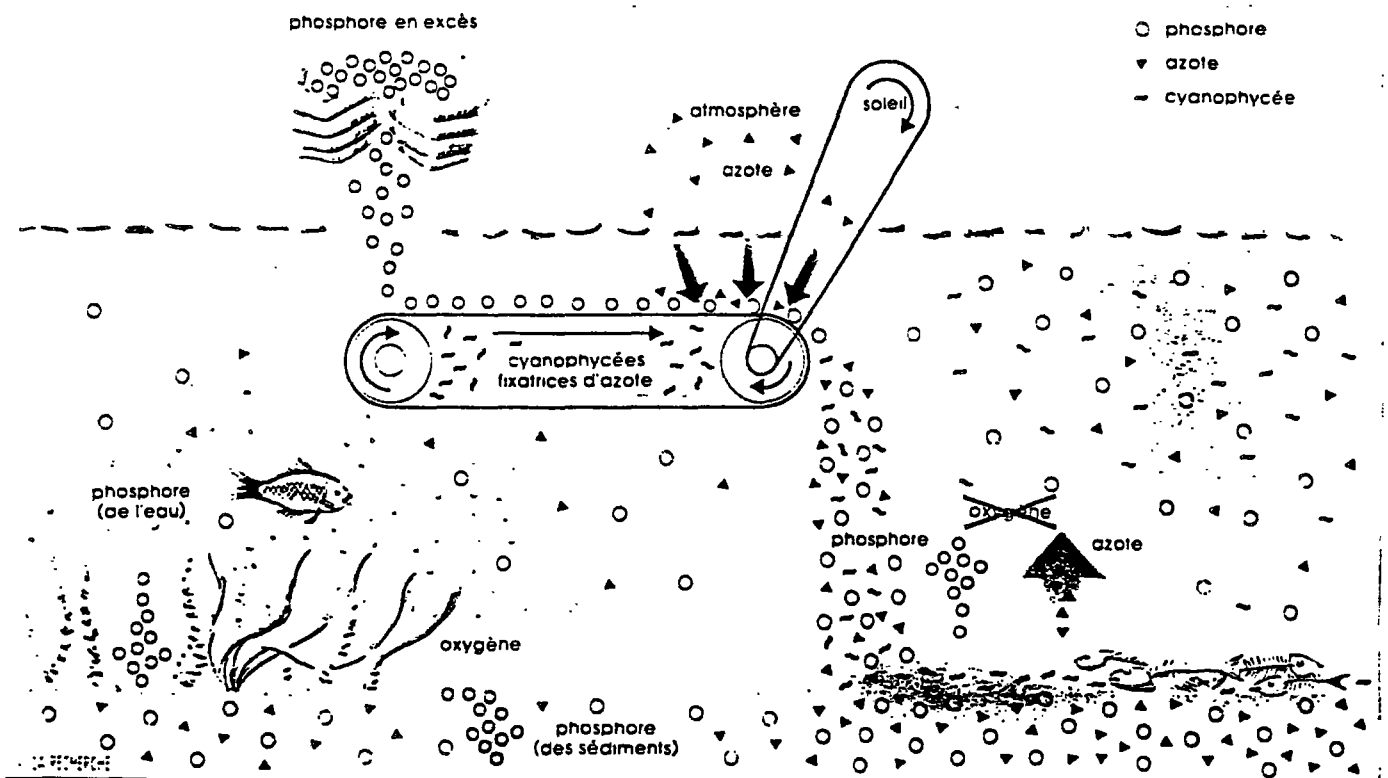
La prolongation de mon stage au-delà du mois de juin consistera à réaliser un étalonnage de souches carencées en phosphore (durant une durée préalablement déterminée) pour des concentrations en phosphore croissantes. Enfin des essais pourront être réalisés sur les souches carencées mises en présence de substances chimiques contenant du phosphore dont l'effet fertilisant sera alors évalué grâce à l'étalonnage préétabli.



extrait de BENNETON (1986)

Elément	Z dans le tissu végétal = demande	Z dans l'eau naturelle = apport.	Rapport
			Demande / Apport
Phosphore	0,08	0,000001	80 000
Azote	0,7	0,000023	30 000
Carbone	6,5	0,0012	5 000
Silice	1,3	0,00065	2 000
Potassium	0,3	0,00023	1 300
Autres			1 000

extrait de BENNETON (1986)



extrait de RABROIN (1991)

# **I PHOSPHORE ET EUTROPHISATION**

---

## **1-1-Le phénomène d'eutrophisation accélérée**

Le phosphore est le moteur de l'eutrophisation des hydrosystèmes d'eau douce. Naturellement présent à de très faibles concentrations (de l'ordre du  $\mu\text{g/l}$ ), c'est un élément qui migre peu comparativement à l'azote et dont le cycle est plus simple notamment en l'absence d'échange avec l'atmosphère (voir schéma ci-contre extrait de BENNETON, 1986). Facilement adsorbable sur la matière organique il ne peut naturellement que faiblement enrichir les eaux de surface. Ces faibles apports naturels de phosphore font d'ailleurs de cet élément celui qui satisfait le moins la demande des végétaux aquatiques dans l'eau comme le montre le tableau ci-contre extrait de BENNETON (1986).

Le phénomène d'eutrophisation, certes naturel, subit une accélération et une amplification du fait de l'excès de phosphore d'origine anthropique rejeté dans les milieux aquatiques. Cet enrichissement excessif des eaux en phosphore provoque alors un déséquilibre des écosystèmes aquatiques.

Ce déséquilibre se traduit tout d'abord par une prolifération algale excessive, suivie d'un appauvrissement en oxygène de l'eau lié à la dégradation des matières organiques par les bactéries. La dominance des Cyanophycées, souvent fréquente dans ces cas là, aggrave le processus d'eutrophisation et peut même entraîner une rupture de la chaîne alimentaire. Ces dernières ne sont pas consommées par le zooplancton.

La prolifération des bactéries et la diminution de la teneur en oxygène participent pour beaucoup à la dégradation des caractéristiques tant physico-chimiques qu'organoleptiques de l'eau. Les usages de cette dernière deviennent alors limités (eau potable, baignade,...).

En système limnique, cette dégradation peut atteindre une situation extrême pour laquelle la désoxygénation des zones hypolimniques génère un relargage du phosphore des sédiments. Le système "s'auto-enrichit" en phosphore et la boucle est bouclée comme le montre la figure ci-contre extrait de BARROIN (1991).

## **1-2-Origine des rejets de phosphore en milieu naturel**

Parmi les différentes sources de pollutions des eaux par le phosphore responsables du déséquilibre du cycle du phosphore, la pollution par les phosphates a trois origines principales : industrielle, agricole et domestique (voir tableau au verso extrait de BARROIN, 1991).

Il est à noter le faible pourcentage de phosphore transféré par les engrais agricoles. A contrario, les apports de phosphore par l'industrie et les activités domestiques restent préoccupants. En France, selon l'estimation de phosphates



Origine du phosphore	Tonnage mis en jeu	% transféré	Quantités déversées	
			tonnes	%
Industrielle	40 000	< 100	< 40.000	< 29,3
Agricole	Ingrais 620 000	1	6.200	4,5
	Élevage 240 000	10	24.000	17,5
Domestique	Détergent 42.000	> 90	> 37.800	> 27,6
	Métabolisme 32.000		> 28.800	> 21,1
			Total 136.800	100

extrait de BARROIN (1991)

rejetés dans les eaux usées, 40% proviennent des différents produits de lessive ou de nettoyage (CHENEVAL, 1993). Les lessives et détergents contiennent en effet des tripolyphosphates dont le rôle d'adjuvant s'explique par leurs propriétés complexantes qui permettent de diminuer la dureté de l'eau en fixant les ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ .

Pour remédier à cette pollution, le seul traitement du phosphore en station d'épuration s'avère insuffisant d'après certaines modélisations (GILLEN, 1994). Il faut donc agir à la source de cette pollution, c'est à dire lors de l'élaboration des formulations lessivielles.

P - Total				
P dissous		P en suspension		
Orthophosphate ( $PO_4^{3-}$ )	Colloïdes organiques ou phosphore absorbé à un colloïde absorbant	Sels inorg. et complexes absorbants tel que	Organismes	Absorbé à des détritus ou combiné en forme organique.
Polyphosphates		$Fe(OH)_3$ + ion orthophosphate		
Phosphore minéral	Phosphore organique			
Dosage dans le filtrat, du P Total des $PO_4^{3-}$ avant et après hydrolyse.				
← Dosage de P dans l'eau brute. →				

extrait de BENNETON (1986)

## II BIODISPONIBILITE ET ASSIMILATION DU PHOSPHORE PAR LE PHYTOPLANCTON

---

### 2-1-Assimilation du phosphore par le phytoplancton

Les modalités de transfert du phosphore de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule végétale font appel à des phénomènes de diffusion et de transport passif ainsi qu'à des mécanismes de transport actif à travers la membrane sous forme d'orthophosphates.

Parmi les différentes formes du phosphore dans l'eau (voir figure ci-contre extraite de BENNETON, 1986), seul l'ion orthophosphate de faible encombrement stérique peut-être directement assimilé par le phytoplancton.

Toutefois, doté de mécanismes de régulation, le phytoplancton peut faire face à des fluctuations de la teneur en phosphore du milieu en stockant des quantités importantes de phosphore dès que celui-ci est disponible grâce à une activité phosphatasique.

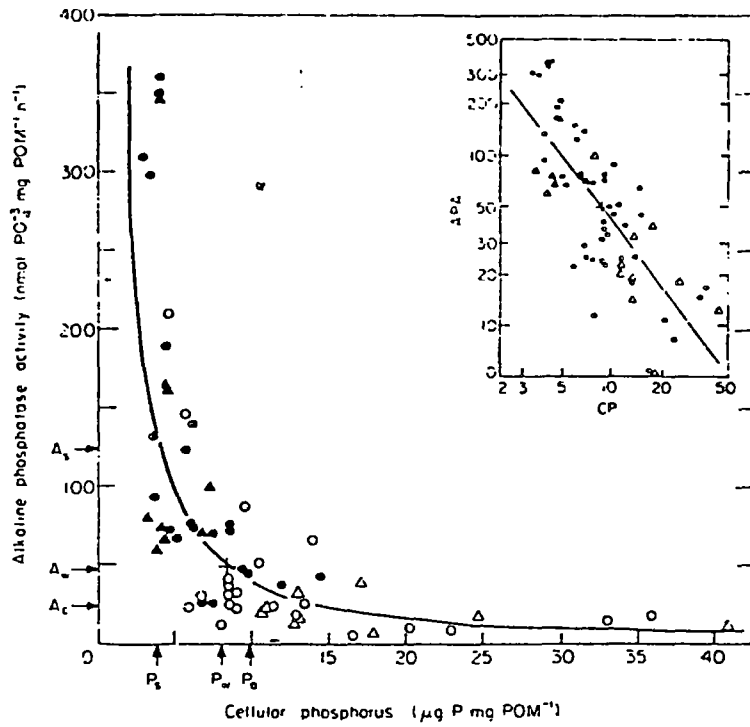
Ce phosphore stocké est appelé "phosphore de luxe". AZAD & BORCHARDT (1970) ont montré que les cellules de *Scenedesmus* et *Chlorella* peuvent accumuler jusqu'à 10 % de phosphore par rapport au poids sec tandis que le seuil critique ne représente que 3 % du poids sec.

FITZGERALD & NELSON (1966) ont observé qu'au fur et à mesure que le matériel algal est produit, les orthophosphates stockés sont convertis en des formes solubles ou insolubles. De plus, ils ont établi que quelque soit l'âge de la culture, le phosphore stocké peut toujours être extrait expérimentalement sous forme d'orthophosphate.

Le taux de phosphates et de polyphosphates stockés à l'intérieur des cellules algales régule la synthèse des phosphatases alcalines intra et extracellulaires. Celles-ci sont inhibées ou induites en dessus ou en dessous d'un certain seuil (FITZGERALD & NELSON, 1966; TAFT et al, 1977). La synthèse de l'enzyme sera donc provoquée dans un premier lieu non pas directement par un état de déficience en phosphore du milieu, mais par la prévention de cette déficience. Ceci explique bien le fait que la cellule stocke au-delà de ses besoins.

Une déficience en phosphore dans le milieu active également l'induction de l'activité phosphatasique par le phytoplancton (voir les figures au verso extraites de BERMAN (1980) et GAGE & GORHAM (1985)).

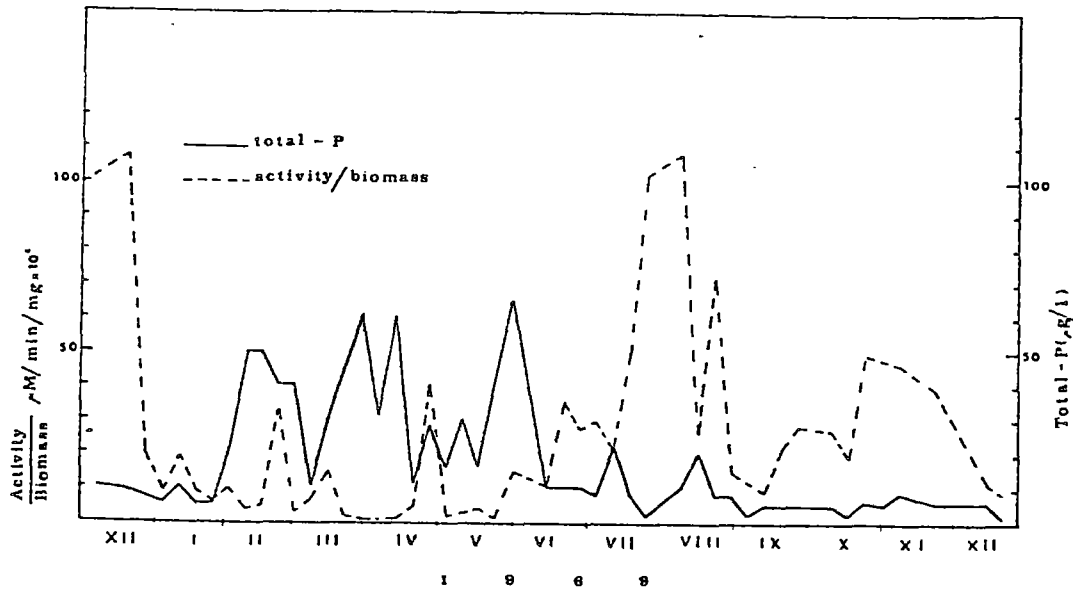
L'A.P.A. (Activité Phosphatase Alcaline) est souvent utilisée comme indicateur de déficience en phosphore du milieu parmi d'autres indicateurs physiologiques (HEALEY & HENDZEL, 1980; SMITH & KALFF, 1981; GAGE & GORHAM, 1985; ISTVANOVICS et al, 1993). La corrélation entre l'A.P.A. et ces paramètres de déficience en phosphore s'est souvent bonne (HEALEY & HENDZEL, 1980; ISTVANOVICS et al, 1992).



The relationship between alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus in the phytoplankton biomass of Minnesota lakes. Proposed diagnostic criteria for phosphorus status are A<sub>1</sub>, starvation; A<sub>2</sub>, warning; A<sub>3</sub>, constitutive (basal) enzyme activity; P<sub>1</sub>, starvation; P<sub>2</sub>, warning; P<sub>3</sub>, surplus phosphorus (for further explanation see text). Circles represent Lake Josephine; triangles represent the nine lakes. Solid symbols represent epilimnetic waters; open symbols represent waters below the thermocline.

extrait de GAGE & GORHAM (1985)

T. BERMAN



Phosphatase activity from 1 m per phytoplankton biomass unit compared with total phosphorus concentrations from 1-5 m. Phytoplankton biomass was calculated biometrically from weekly cell counts (Pollinger, unpublished).

extrait de BERMAN (1980)

Remarquons qu'en cas de déficience en phosphore du milieu, toutes les algues ne sont pas capables d'autorégulation de l'A.P.A. (HEALEY & HENDZEL, 1980).

## 2-2-L'activité phosphatasique (A.P.)

### *2-2-1-Intérêt écologique de l'A.P.*

L'A.P. est très largement utilisée comme indicateur de déficience en phosphore dans les eaux douces. Nombreux sont les organismes doués d'une A.P. elle même de nature différente suivant les organismes comme le montre le tableau au verso extrait de AARONSON & PATNI (1976).

MATAVULJ et al (1990) ont par exemple établi une corrélation significative entre l'activité phosphatasique et des indicateurs microbiologiques du degré de pollution des eaux douces (nombre de bactéries hétérotrophes, nombre total de bactérioplancton, indice de saprobie). Ils ont même proposé une classification des eaux douces de surface selon leur état d'eutrophisation en se basant sur l'A.P. (P.A.I. ou indice d'activité phosphatase ou moyenne de l'activité phosphatasique totale : phosphatase acide, neutre ou basique) comme le montre le tableau au verso extrait de MATAVULJ et al (1990).

Dès 1976, AARONSON & PATNI soulignaient que la stimulation de la croissance ainsi que l'usage de l'induction de l'A.P. chez les micro-organismes pouvaient très bien être utilisées comme paramètres pour déceler un bloom algal pour lequel le phosphore est l'élément nutritif limitant. La signification de l'A.P. spécifique aussi bien acide qu'alcaline dans le cycle du phosphore d'un micro-organisme spécifique, leur semblait d'ailleurs pertinente à étudier.

Toutefois le paramètre le plus usité de part les conditions physico-chimiques des milieux naturels est l'Activité Phosphatase Alcaline (A.P.A.).

STEWART & WETZEL (1982) précisent cependant que la signification écologique de l'A.P.A. dans les écosystèmes aquatiques ne peut probablement pas être appréciée, à moins de déterminer avec précision la contribution des autotrophes ainsi que celle des hétérotrophes dans l'intensité de ce paramètre.

En effet, phytoplancton, matériel particulaire de nature non algale et enzymes dissous participent à l'A.P.A. dans des proportions différentes, lesquelles peuvent elles-mêmes varier suivant la saison.

Remarquons que la distribution de l'A.P.A. dans un lac peut être considérée comme un traceur intéressant afin de suivre les mouvements du phosphore (HEALEY & HENDZEL, 1980). Les phosphatases sont d'ailleurs reconnues pour avoir une fonction essentielle dans la dynamique des nutriments des lacs.

### *2-2-2-Aptitude de l'A.P.A. des microphytes à définir le degré de déficience en phosphore du milieu*

La corrélation directe entre A.P.A. des microphytes et degré de déficience en phosphore du milieu n'est pas aisée.

Phosphomonoesterases or PME activity at surface of or secreted by microorganisms.

Microorganism	Type of PME*	At surface	Medium	Reference*
<b>Bacteria</b>				
<i>Actinomyces</i> sp.	Alk	•	•	1
<i>Bacillus amylolyma</i>	Alk	•	•	2
<i>Bacillus caldovelox</i>	Alk	•	•	3
<i>Bacteroides ruminicola</i>	Alk	•	•	4
<i>Escherichia coli</i>	Alk	•	•	5
<i>Micrococcus sodonensis</i>	Alk	•	•	6
<i>Micrococcus xanthus</i>	B	•	•	7
<b>Fungi</b>				
<i>Candida albicans</i>	Ac	•	•	8
<i>Saccharomyces</i> (protoplast)	Ac	•	•	9
<i>Saccharomyces mellis</i>	Ac	•	•	10
<i>Sclerotinia fructigena</i>	Ac	•	•	11
<b>Algae</b>				
<b>Prokaryota</b>				
<i>Anabaena variabilis</i>	Alk	•	•	12
<i>Anacystis nidulans</i>	Alk	•	•	13
<b>Eucaryota</b>				
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	B	•	•	14
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Alk	•	•	15
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Alk	•	•	15
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alk	•	•	16
<i>Chlorella</i> sp.	Ac	•	•	15
<i>Chlorella gracilis</i>	Ac	•	•	17
<i>Gymnodinium nelsoni</i>	B	•	•	15
<i>Nitzschia sigma</i>	Ac	•	•	18
<i>Ochromonas danica</i>	Ac	•	•	19
<i>Peridinium cinctum vestii</i>	Alk	•	•	20
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Alk	•	•	21
<i>Pyramimonas</i> sp.	Ac	•	•	15
<i>Rhodomonas lens</i>	B	•	•	15
<i>Stichococcus</i> sp.	Ac	•	•	15
<i>Thalassiosira fluviatilis</i>	Alk	•	•	21
<b>Protozoa</b>				
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	Alk	•	•	22
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Ac	•	•	23
<i>Mavorella palestinensis</i>	Ac	•	•	24
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	Ac	•	•	25

\*Key: Ac = acid PME; Alk = alkaline PME; B = acid and alkaline PME.

extrait de AARONSON & PATNI (1976)

The proposal of new system of surface freshwaters categorization according to the water Phosphatase Activity Index (Matavulj, 1986).

PHOSPHATASE ACTIVITY INDEX ( $\mu\text{mol/s/dm}^3$ pNP, 30°C)	PROPOSAL OF CATEGORY NAME	CHARACTERISTIC OF WATER (conditionally)	Equivalent to classes according to		
			Keil (1975)	Tümping (1969)	Pantle - Duck (1955)
below 0.01	I	A MAXIMALLY CLEAN	I	I	KATABOLIC ZONE
0.01 - 0.10		B VERY CLEAN			
0.10 - 0.25	I - II	CLEAN			
0.25 - 0.50	II	A SATISFACTORILY CLEAN	II - III	II	OLIGO - SAPROBIC ZONE
		B SLIGHTLY POLLUTED			
1.00 - 2.50	II - III	MODERATELY POLLUTED	II - III	II	MESO - SAPROBIC ZONE
2.50 - 5.00	III	A POLLUTED	III	III	MESO - SAPROBIC ZONE
5.00 - 7.50		B VERY POLLUTED			
7.50 - 10.00	III - IV	DIRTY		III	MESO - SAPROBIC ZONE
10.00 - 15.00	IV	A VERY DIRTY	IV	IV	POLY - SAPROBIC ZONE
		B MAXIMALLY DIRTY			
above 15.00					

extrait de MATAVULJ et al (1990)

D'une part, c'est plutôt le quota de phosphore intracellulaire comme nous l'avons vu en 2-1- qui régule l'A.P.. De plus, différents auteurs comme CURRIE et al (1986) ainsi que FEUILLADE et al (1990) ont montré que dans certains lacs déficients en phosphore, le bactérioplancton est responsable de la plus grande partie de la consommation des orthophosphates. Le phytoplancton, lui, assimile principalement le phosphore des composés phosphorés organiques. Cette différence doit très probablement induire de manière non négligeable l'A.P.A. du phytoplancton, ce qui ne signifie donc pas obligatoirement que la concentration en orthophosphates (directement assimilables par les algues) soit réellement limitante dans le milieu.

TAFT, LOFT & TAYLOR (1977) insistent sur le fait qu'il serait incorrect de suggérer que le phytoplancton soit "limité" en phosphore en considérant isolement l'A.P.A.. Ils considèrent que les cellules peuvent être stressées par la présence d'une quantité minimale d'orthophosphate disponible et non pas "limité" si suffisamment de monoesters disponibles sont capables de répondre à une demande en phosphore du phytoplancton. Pour parler d'une déficience en phosphore, ils considèrent qu'il faut distinguer la productivité et la limitation du taux de croissance de la limitation en biomasse. La limite supérieure de biomasse par unité de volume sera déterminée par la concentration totale d'un ou de plusieurs éléments nutritifs disponibles. Ils ont en effet montré de manière expérimentale que la disponibilité en azote inorganique influence l'A.P.A..

Une bonne connaissance de la composition des espèces phytoplanctoniques est également importante. VRBA et al (1993) fournissent différentes explications pour une faible A.P.A. observée dans un réservoir "eutrophe" de la République tchèque : la communauté phytoplanctonique est dominée par une espèce avec une faible A.P.A.; le phytoplancton n'a pas eu assez de temps pour s'adapter à une "dé-repression" de l'A.P.A. pour la population algale ou à la succession de population avec une A.P.A. plus élevée. La disparition d'une population phytoplanctonique pourrait aussi avoir interrompu un processus d'adaptation. Enfin une proportion importante de Diatomées capables de stocker du phosphore ou un rapport C/P relativement faible dans le seston peuvent expliquer une faible A.P.A. alors inattendue.

Enfin l'effet de substances en solution peuvent influencer l'A.P.A.. En effet, KIM & WETZEL (1993) ont montré de manière expérimentale que les substances humiques avaient un effet inhibiteur pour l'A.P.A. de cultures axéniques d'algues et de Cyanobactéries (*Anabaena flos-aquae*, *Microcystis aeruginosa*, *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus brasiliensis* and *Nitzschia palea*). Ces substances humiques exacerbent l'inhibition de type non-compétitive de la P.A. en affectant le  $K_m$  ainsi que la  $V_m$ . L'inhibition du  $K_m$  varie cependant avec les espèces ainsi que la localisation de l'enzyme (extracellulaire ou liée à la membrane plasmique de la cellule).

Si l'interprétation de l'A.P.A. est difficile en milieu naturel, elle peut cependant être utile en milieu contrôlé et pour des cultures monospécifiques. Ce paramètre peut ainsi pour des milieux synthétiques et dépourvus de phosphore évaluer l'intensité de la demande en phosphore de l'espèce cultivée qui se trouve en état de carence. Nous l'utiliserons donc lors de nos expérimentations à venir pendant la carence de *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* comme l'explique le chapitre suivant qui traite de la mise au point du test qui est le sujet de notre étude.



# III INTERET D'UN BIOESSAI AVEC ALGUES PLANCTONIQUES DESTINE A METTRE EN EVIDENCE L'EFFET FERTILISANT D'UNE SUBSTANCE CHIMIQUE

---

## 3-1-Bioessais avec algues planctoniques et biodisponibilité du phosphore

La pertinence des bioessais avec algues planctoniques appliqués à des test de fertilité est indiscutable face à des analyses chimiques de la teneur en phosphore des eaux.

En effet, toutes les substances phosphorées en solution dans les eaux ne sont pas assimilables ou capables de libérer du phosphore assimilable pour les algues (avec ou sans intervention des phosphatases ). Le dosage chimique du phosphore total n'aura donc pas de réelle signification sur la fertilité potentielle du milieu. De plus les limites de détection des dosages par voie chimique sont parfois insuffisantes.

Ces bioessais sont basés sur une variante de la loi du minimum de LIEBIG qui énonce que "la biomasse maximale est proportionnelle à la quantité de nutriment ou d'une combinaison de nutriments qui sont présents et biodisponibles en quantité minimale par rapport aux besoins de croissance des organismes"; cette loi s'applique à un seul élément limitant à la fois (USEPA, 1978). Ces bioessais ont été mis au point dans le but de caractériser la valeur nutritive de l'eau.

Le National Eutrophication Research Program du Federal Water Administration a très largement participé au développement de tels bioessais visant à étudier le degré d'eutrophisation des eaux en publiant "Algal Assay Procedure : Bottle Test" (USEPA, 1971) et enfin "Selenastrum capricornutum Printz Algal Assay Bottle Test" (USEPA, 1978).

Il faut toutefois remarquer que ces bioessais ne tiennent pas compte des réserves intracellulaires que peuvent faire les algues. Or ces réserves facilement mobilisables peuvent interférer sur la validité des résultats. HANNA (1985) avait tenu compte de ces réserves afin d'élaborer, avec des algues préalablement carencées en phosphore durant 3 semaines, une technique permettant d'établir les relations qui existent entre la quantité de phosphore total contenue dans l'eau et la quantité de phosphore biodisponible pour le phytoplancton.

Notons aussi que l'expérience de HANNA (1985) était intéressante à exploiter et nous a aidé pour élaborer ce test avec algues planctoniques destiné à mettre en évidence l'effet fertilisant d'une substance chimique.

## 3-2-Principe du test

Avant tout, il est important de préciser que ce test a pour objectif la mise en évidence des effets fertilisants «potentiels» de substances chimiques sur la croissance d'algues phytoplantoniques dans des conditions artificielles. Ces substances chimiques contiendront du phosphore dans leurs formulations et ce test, à court terme, permettra d'évaluer la quantité de phosphore biodisponible pour les algues et donc susceptible d'engendrer une dystrophie dans le milieu récepteur.

Dans un premier lieu, il s'agira de réaliser un test préalable sur le protocole de la Norme ISO 8692 afin de mettre en évidence un éventuel effet toxique des substances chimiques ou un effet fertilisant. Si les résultats de ce test révèlent une absence de toxicité, l'effet fertilisant de la substance testée peut être déjà détectable, mais dans certains cas il peut être occulté par rapport au témoin par la présence de phosphore dans le milieu ISO (0.36 mg/l).

Dans ce dernier cas de figure, la mise au point d'un test sur algues préalablement carencées en phosphore s'impose mais également dans le cas où l'effet fertilisant est déjà détecté car il permettra d'évaluer la quantité de phosphore relargué par la substance grâce à l'étalonnage de souches préalablement carencées en phosphore.

L'organigramme page 9 résume le principe de ce test.

## 3-3-Mise en forme de ce test

### 3-3-1-Choix des souches de phytoplancton

Les variations interspécifiques de croissance pour les souches de phytoplancton nous ont conduits à choisir plus d'une espèce pour la mise au point de ce test. De plus ces souches phytoplantoniques doivent être aussi représentatives que possible du milieu naturel et aptes à être cultivées en laboratoire.

D'autre part, le principe même du test fait appel au test d'inhibition de croissance de la Norme ISO 8692 or celui-ci utilise les deux espèces que sont *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata*.

Notre choix c'est donc naturellement porté sur les deux espèces précitées appartenant à l'ordre des *Chlorococcales* (Chlorophytes, Chlorophycées) qui répondent à tous les critères requis.

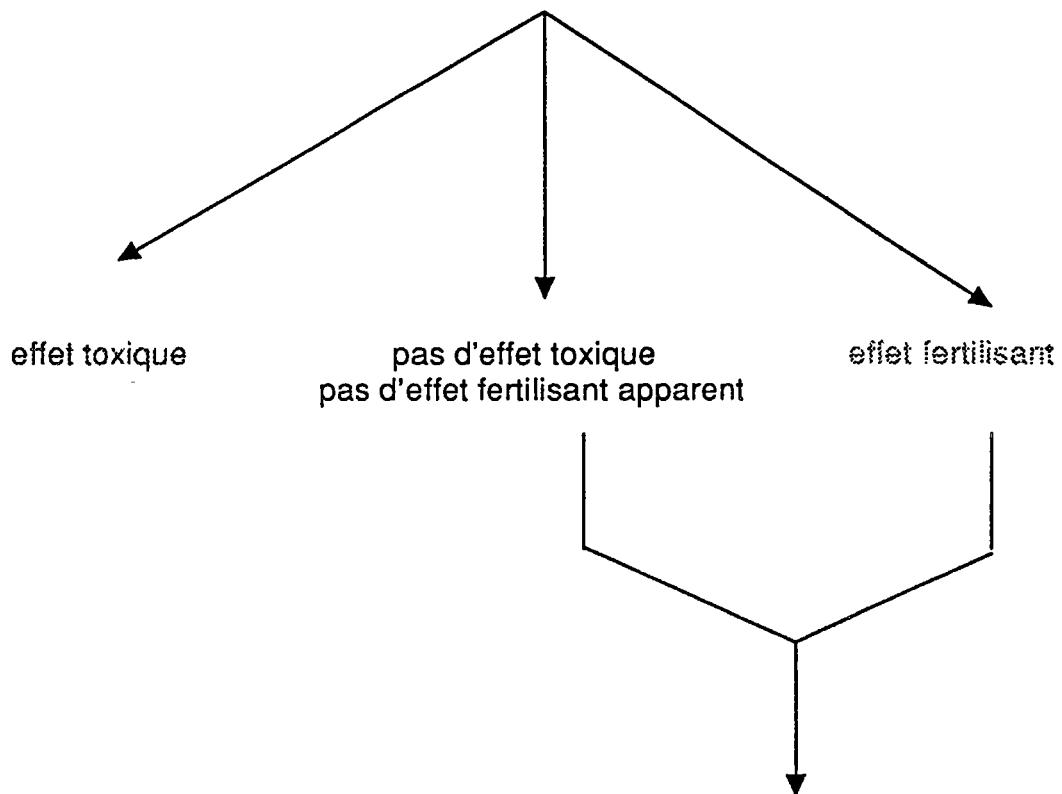
### 3-3-2-Starvation des souches en phosphore

La starvation des souches en phosphore permettra d'éliminer leurs réserves en phosphore intracellulaires. Elle est nécessaire à la mise au point de ce test comme nous l'avons déjà expliqué.

Pour ce faire, les algues seront cultivées dans du milieu ISO dépourvu en phosphore.

## Principe du test

1<sup>ère</sup> étape : Test préalable d'inhibition de croissance de la Norme ISO 8692



2<sup>ème</sup> étape : Test avec algues préalablement carencées en phosphore

### Mise au point du test avec algues carencées

- 1-Choix des souches de phytoplancton
- 2-Starvation des souches en phosphore
- 3-Etalonnage des souches avec un apport connu de phosphore

### *3-3-3-Etalonnage des algues carencées par un apport connu de phosphore*

L'intérêt de cet étalonnage est de pouvoir estimer la quantité de phosphore biodisponible que peuvent émettre les substances chimiques étudiées.

Cet étalonnage consistera à mettre en suspension des algues carencées dans des milieux de culture connus comportant différentes concentrations en phosphore. La croissance des algues sera alors suivie jusqu'à la phase plateau. Nous déterminerons alors la biomasse maximale produite pour l'inoculum de concentration connue au début de la mise en culture dans le milieu considéré.

Lors d'essai avec des substances comportant une concentration en phosphore biodisponible inconnue, la biomasse produite pourra ainsi être convertie en concentration de phosphore biodisponible présent dans le milieu.

## IV ETUDES PRELIMINAIRES

---

### 4-1-Mode de culture des algues

#### *4-1-1-culture en batch*

Les cultures en batch sont réalisées dans des erlens de 250 ml contenant 120 ml de culture ou de 1 l contenant 400 ml de culture, quel que soit le type de culture ( carencée en phosphore ou non ). Ces erlens sont "bouchés" de manière à ce que les échanges gazeux puissent se faire.

Des repiquages hebdomadaires sont réalisés pour les souches mères.

Les erlens sont soumis à une température de 24 °C comme le préconise le "Algal Bottle Test" (US EPA, 1978) dans une enceinte thermo-régulée, sous un éclairage de 6 à 110  $\mu\text{E}/\text{s}.\text{m}^2$  avec une alternance jour/nuit de 19h/5h.

Placés sur des plateaux tournants qui effectuent deux rotations par minute, les erlens sont agités à chaque passage au dessus d'un agitateur magnétique grâce à des barreaux aimantés placés dans les erlens. Chaque erlen effectue donc deux passages par minute au dessus de l'agitateur.

Le dispositif de culture est représenté page 13.

#### *4-1-2-Culture en chemostat*

La mise en place d'une culture en chemostat a été initiée durant ces trois mois, mais notons que ces cultures en continu n'ont pas été utilisées durant nos expérimentations. Le choix des apports périodiques devait être déterminé afin d'atteindre un état d'équilibre et ce, à une concentration adéquate pour notre étude.

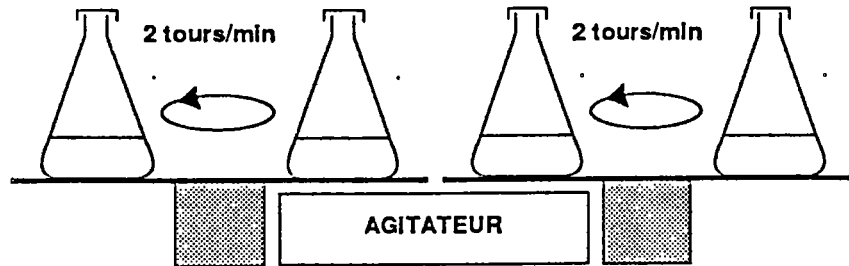
#### *4-1-3-Choix du milieu de culture*

La composition du milieu de culture est la même que celle du milieu ISO 8692 figurant page 12 avec toutefois une concentration en  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dix fois plus importante pour le concentré nutritif.

En effet des expérimentations préliminaires réalisées au CEMAGREF de BORDEAUX semblent montrer que la bonne préparation des inoculums carencés passe par une mise en culture préalable sur un milieu plus enrichi en phosphore que le milieu ISO (alors 12,5 fois plus), nous avons donc choisi une concentration 10 fois plus forte.

## Dispositif de culture

### culture en batch



Température : 24 °C

Eclairage : alternance jour/nuit = 19h/5h  
intensité lumineuse : 6 à 110  $\mu\text{E}/\text{S.m}^2$

Erlens de 250 ml avec 120 ml de culture maximum  
Erlens de 1 l avec 250 ml de culture maximum

Milieu de culture selon la norme ISO 8692 figurant dans le tableau ci-dessous  
avec pour modifications :

- une concentration en phosphore x 10 (milieu de "culture")
- ou - une concentration nulle en phosphore (milieu de starvation)

### MILIEU DE CULTURE NORME ISO 8692

Substances nutritives	Concentration de la solution mère	Concentration finale de la solution d'essai
<b>Solution mère 1 : macrosubstances nutritives</b>		
$\text{NH}_2\text{Cl}$	1,5 $\text{g.l}^{-1}$	15 $\text{mg.l}^{-1}$
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 $\text{g.l}^{-1}$	12 $\text{mg.l}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 $\text{g.l}^{-1}$	18 $\text{mg.l}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 $\text{g.l}^{-1}$	15 $\text{mg.l}^{-1}$
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,16 $\text{g.l}^{-1}$	1,6 $\text{mg.l}^{-1}$
<b>Solution mère 2 : Fe-EDTA</b>		
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	80 $\text{mg.l}^{-1}$	80 $\mu\text{g.l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 $\text{mg.l}^{-1}$	100 $\mu\text{g.l}^{-1}$
<b>Solution mère 3 : éléments traces</b>		
$\text{H}_3\text{BO}_3$	185 $\text{mg.l}^{-1}$	185 $\mu\text{g.l}^{-1}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 $\text{mg.l}^{-1}$	415 $\mu\text{g.l}^{-1}$
$\text{ZnCl}_2$	3 $\text{mg.l}^{-1}$	3 $\mu\text{g.l}^{-1}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 $\text{mg.l}^{-1}$	1,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 $\text{mg.l}^{-1}$	0,01 $\mu\text{g.l}^{-1}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 $\text{mg.l}^{-1}$	7 $\mu\text{g.l}^{-1}$
<b>Solution mère 4 : <math>\text{NaHCO}_3</math></b>		
$\text{NaHCO}_3$	50 $\text{g.l}^{-1}$	50 $\text{mg.l}^{-1}$

#### *4-1-4-Stérilisation du matériel et des milieux de culture*

Toute la verrerie ainsi que les cônes ou pipettes utilisés lors de nos manipulations ont été stérilisés par autoclave sous 1 bar durant 30 minutes.

Les différents milieux ont été stérilisés par autoclave sous 1 bar durant 30 minutes et/ou par filtration à 0.2 µm.

### **4-2-Méthodes d'évaluation de la biomasse**

Trois méthodes ont été utilisées pour notre étude : le comptage cellulaire au microscope photonique, la spectroscopie d'absorption et les matières volatiles en suspension (M.V.S.).

#### *4-2-1- le comptage cellulaire*

Le comptage cellulaire correspond à une numération réalisée au microscope (grossissement plan x400) grâce à une cellule de comptage du type AGASSE LAFONT B (pour les plus faibles concentrations) et MALASSEZ. Les résultats seront exprimés en nombre de cellules par millilitre.

#### *4-2-2- la spectroscopie d'absorption*

Le principe de la spectroscopie d'absorption repose sur la loi de BEER-LAMBERT :

$$D.O. = \log I_0/I_t = \epsilon.c.l.$$

avec : D.O. : densité optique  
I<sub>0</sub> : intensité de la lumière incidente  
I<sub>t</sub> : intensité de la lumière transmise  
ε : coefficient d'absorption cellulaire  
c : concentration moléculaire  
l : épaisseur de la cuve

Dans le cas présent, c représente la concentration en chlorophylle a. La longueur d'onde pour les mesures sera de 665 nm.

#### *4-2-3- les matières volatiles en suspension (M.V.S.)*

La mesure des M.V.S. est possible par la filtration sous vide de la suspension algale (en l'occurrence 40 ml) avec des filtres préalablement passés à l'étuve (1 heure minimum), au dessiccateur (15 minutes minimum) puis tarés. Après passage à l'étuve et dessiccation pour des durées identiques à celles précitées, les filtres chargés de matière sont pesés. Par déduction du poids du filtre, on obtient le poids des matières en suspension directement assimilables dans le cas présent aux

M.V.S., c'est à dire au poids des algues compte tenu du fait que ces dernières sont les seuls éléments figurés en solution. Les résultats seront exprimés en mg de M.V.S. par litre.

### 4-3-Correlation entre les méthodes d'évaluation de la biomasse

Pour la mise au point du test qui est l'objet de notre étude, il nous fallait connaître la concentration cellulaire afin de pouvoir évaluer la croissance des algues au file du temps ou encore la quantité de M.V.S. pour la mesure de l'A.P.A.

Un comptage systématique étant trop fastidieux et la mesure directe des M.V.S. nécessitant des volumes trop importants par rapport à nos moyens de culture, nous avons écarté ces deux méthodes. La D.O. ne demandant qu'un volume de 8 ml de suspension, une corrélation entre D.O. et concentration cellulaire ainsi qu'entre D.O. et M.V.S. nous est apparue le moyen le plus simple et même le plus rapide pour déterminer directement et à partir d'une même mesure ces paramètres.

Pour ce faire, nous avons prélevé à différents moments et sur différentes cultures de *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* des volumes nous permettant de déterminer : la D.O., la concentration cellulaire par comptage ainsi que les M.V.S.. Les trois paramètres ont alors pu être corrélés deux à deux.

Les mesures qui figurent sur l'annexes A1 dont la représentation graphique se trouve page 16 nous ont permis de déterminer les corrélations suivantes entre D.O., MVS. et concentration cellulaire :

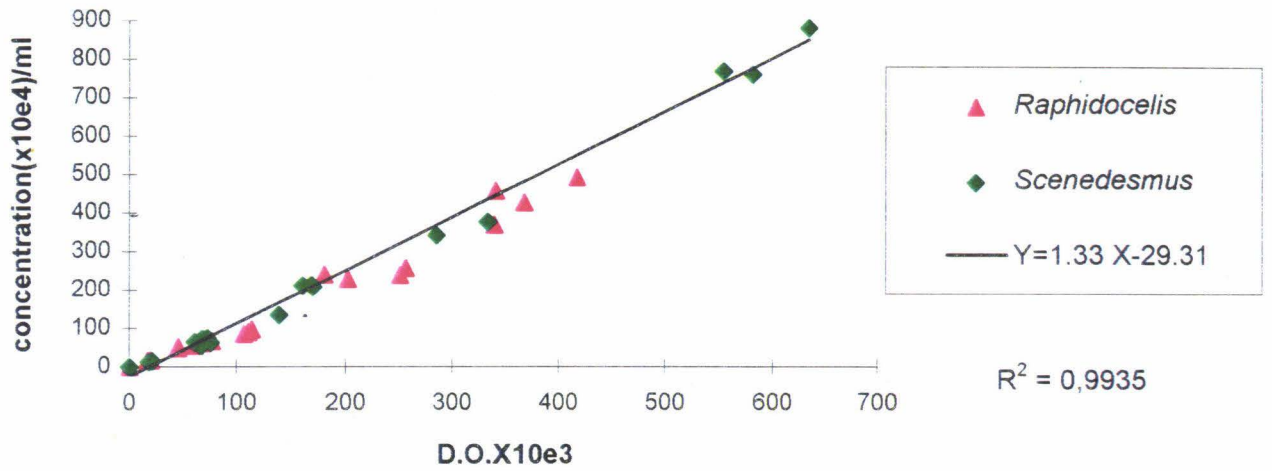
$$\text{concentration cellulaire } \times 10^4/\text{ml} = 1.33 \times (\text{D.O. } \times 10^3) - 29,31 \quad r^2 = 0,993$$

$$\text{M.V.S. (mg/l)} = 0.268 (\text{D.O.} \times 10^3) - 1,58 \quad r^2 = 0,982$$

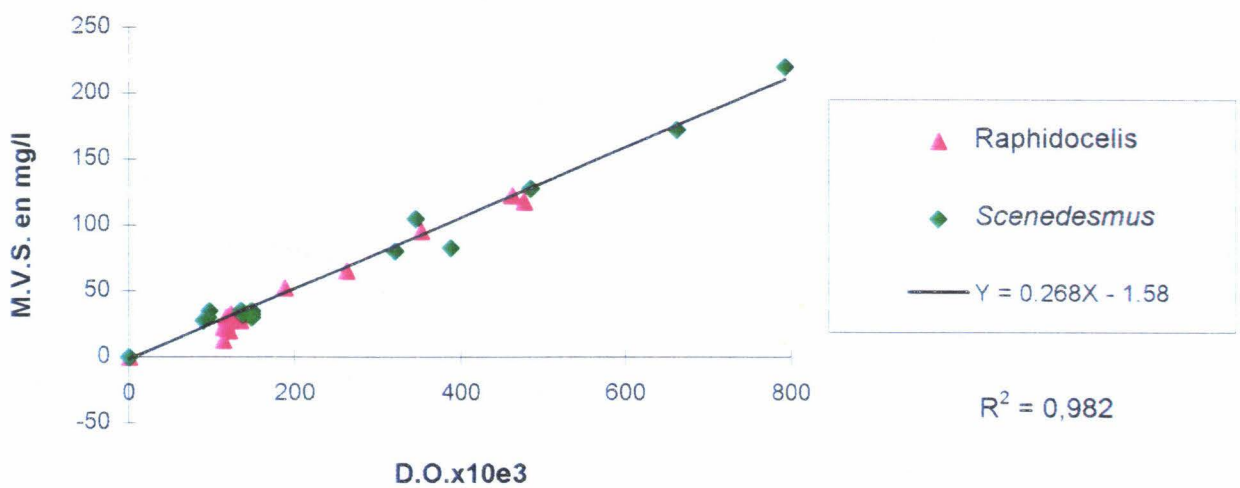
Notons que les résultats obtenus pour les deux souches ne justifiaient pas une individualisation des corrélations pour chacune d'elle.



### Corrélation entre D.O. lues à 665 nm et concentration cellulaire



### Corrélation entre D.O. lues à 665 nm et M.V.S. (mg/l)



## Différents substrats utilisés pour la mesure de l'A.P.A.

p-nitrophenyl phosphate (pNPP)

3-O-methylfluorescein phosphate (3-O-MFP)

4-methylumbelliferyl phosphate (4-MUP)

1-naphtolphosphate

glycéro-phosphate

phenolphthalein phosphate

## Hydrolyse spontanée du pNPP d'après FONTY (1964) (D.O. à 420 nm de la solution tampon-substrat)

Mode de conservation	le jour de la préparation	15 jours après
à la température du laboratoire	0,31	0,95
à +4 °C	0,31	0,58
à -24 °C	0,31	0,31

## V EXPERIMENTATIONS

---

### 5-1- Mises au point pour la mesure de l'Activité Phosphatase Alcaline

#### ♦ Choix du substrat

Il s'agit bien sûr d'un dosage enzymatique. La biomasse utilisée lors des tests étant suffisamment concentrée pour un dosage spectrophotométrique, nous avons choisi comme substrat le paranitrophényl phosphate de sodium (pNPP).

Le pNPP est un substrat parmi d'autres possibles comme le montre le tableau ci-contre pour la mesure de l'A.P.A.. Il présente une bonne affinité pour l'enzyme et la comparaison de l'activité de la phosphatase réalisée par PETERSON & JANSSON (1978) entre ces différents substrats et le pNPP justifie sa très large utilisation.

Le schéma réactionnel est le suivant :



P.A. : Phosphatase alcaline

pNPP : paranitrophényl phosphate

pNP : paranitrophénol

Le produit d'hydrolyse, le paranitrophénol (pNP) présente un pic d'absorption dans le jaune à 400 nm (voir annexe A2). Le volume de pNPP 3 g/l utilisé pour chaque dosage est tel qu'il respectera le rapport  $\text{pNPP/MVS}=0,2$ .

Ce réactif une fois préparé ne peut être conservé trop longtemps car il s'hydrolyse spontanément comme le montre le tableau ci-contre extrait de FONTY (1964). Cette hydrolyse peut également être provoquée par une élévation de température, ce qui nous amènera à réaliser des "blancs" sans MVS et avec substrat, ainsi qu'à la lumière, ce qui explique que la réaction doive se dérouler à l'obscurité.

De nombreux auteurs ont utilisé ce substrat: BERMAN (1970), JONES (1972), AARONSON & PATNI (1976), FEUILLADE & FEUILLADE (1990), BOAVIDA & MARQUES (1995), avec des protocoles expérimentaux différents (voir annexe A3).

#### ♦ Choix du pH et du tampon

Souhaitant nous placer à un pH convenable pour l'expression de l'A.P.A., nous avons retenu la valeur de 8,5 préconisé par plusieurs auteurs: FIZGERALD & NELSON (1966), HEATH & COOKE (1975), HEALPH & HENDZEL(1979), LIOGIER & ZENKER (1988).

Nous avons utilisé le tampon le plus fréquemment employé pour les phosphatases alcalines à savoir le tris-méthyllaminométhane (ou TRIS). Il sera préparé à une concentration de 1M pour un pH de 8,5 afin de maintenir celui-ci tout au long de la réaction d'hydrolyse.

♦ Apport des ions activateurs

Les ions divalents comme le  $\text{Ca}^{++}$  et le  $\text{Mg}^{++}$  sont des activateurs des réactions phosphatasiques. Nous avons utilisé le  $\text{Mg}^{++}$  0,01M dans le volume réactionnel sous forme  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (DENEUVY 1984).

♦ Température d'incubation et durée de la réaction

La valeur de 35°C utilisée dans de nombreux travaux tels que ceux de JONES (1972), LOGIER & ZENKER (1988)? BADREDDINE (1992), a été retenue.

Comme DENEUVY (1984) et LIOGIER & ZENKER (1988) nous avons choisi une durée de réaction de 2h.

L'inhibition de la réaction est obtenue par élévation de pH grâce à un apport de 1/5 du volume réactionnel de NaOH 1M.

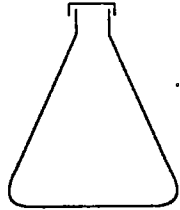
♦ Protocole expérimental

Le protocole choisi pour notre étude est principalement inspiré de celui élaboré par LIOGIER & ZENKER (1988). L'apport de 10 ml de suspension pour un volume réactionnel total de 15 ml nous semblait intéressant afin de minimiser les variations de la quantité de biomasse apportée d'un essai à l'autre lors des répartitions.

Comme le montre le schéma page 19, 10ml d'une suspension algale préalablement carencée en phosphore et de concentration cellulaire connue sont introduits dans un tube à essai auxquels sont ajoutés 1,5 ml TRIS 1M-pH8,5 et 1,5 ml de  $\text{MgCl}_2$  0,01M. Les tubes sont plongés dans un bain-marie à 35°C et une fois la température stabilisée le pNPP est introduit selon un ordre de remplissage noté ainsi que l'heure. Ces tubes seront placés sous agitation magnétique durant les 2 heures de réaction. Un blanc sera réalisé sans suspension algale mais avec le substrat pour chaque essai du fait de la possible hydrolyse spontanée du pNPP.

Une fois la réaction stoppée par l'ajout de 3 ml de NaOH 1M, les échantillons sont centrifugés à 5000 tours pendant 15 minutes et le surnageant est extrait pour une lecture au spectrophotomètre à 400 nm. Les D.O. sont ensuite converties en  $\mu\text{moles}$  de pNP libérées par litre grâce à la gamme étalon (annexe A2) puis en  $\mu\text{moles}$  de pNP libérées par gramme de M.V.S. et par minute tout en tenant compte des dilutions successives de l'introduction des 10 ml de suspension algale jusqu'à la lecture au spectrophotomètre.

## Protocole pour la mesure de l'A.P.A.



Préconditionnement des algues dans du milieu ISO sans phosphore



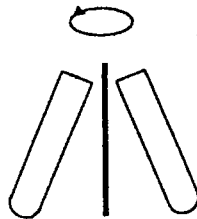
essai avec un volume de 15 ml :  
10 ml de culture préconditionnée  
+ 1.5 ml de  $MgCl_2$  0.01 M  
+ 1.5 ml de TRIS-HCl 1 M  
+ un volume x de pNPP 3g/l pour avoir  
 $pNPP/MVS=0.2$

$H_2O$  qsq 15 ml

Incubation pendant 2 h à l'obscurité  
à 35 °C et sous agitation



Arrêt de la réaction :  
ajouter 3 ml de NaOH 1 N



Centrifugation à 5000 tours/min.  
pendant 15 min.



Lecture à 400 nm de la D.O. du surnageant

## 5-2-Recherche du pic d'absorption du pNP dans les conditions expérimentales et réalisation d'une gamme étalon du pNP

### ♦ Intérêt

Ces mises au point ne nous sont apparues nécessaires qu'après un essai "test" de la mesure de l'A.P.A..

En effet, ayant choisi de suivre un protocole inspiré de celui pratiqué par LIOGIER & ZENKER, nous avons tout d'abord réalisé une gamme étalon pour le pNP à 400 nm dans du TRIS 0,1M-pH=8,5 puis quelques mesures de l'A.P.A. sur des souches carencées depuis 7 jours selon le protocole décrit précédemment.

Après expérimentation, il s'est avéré que l'intensité de la coloration du pNP provenant de l'hydrolyse du pNPP dans les essais était intensifiée par l'ajout de soude 1 M. Nous avons alors émis l'hypothèse que ce phénomène devait très probablement être provoqué par une augmentation du pH consécutif à l'apport de soude.

De plus, il apparaissait alors évident, qu'apporter 3 ml de soude 1M à 15 ml d'essai, devait non seulement provoquer une augmentation du pH mais entraîne de manière certaine une dilution de l'essai. Le TRIS lors de la mesure de la D.O. n'était alors plus de 0,1M mais de 0,083M.

Il nous fallait donc tout d'abord définir la variation du pH avant et après l'ajout de soude.

Si le pH s'était avéré supérieur à 8,5 au moment de la lecture au spectrophotomètre, il nous fallait alors vérifier que le pic d'absorption du pNP défini à 400 nm dans du TRIS 0,1M pour un pH de 8,5 est toujours à cette même longueur d'onde dans du TRIS 0,083M pour le pH déterminé, sinon il fallait préciser quelle était cette longueur d'onde

Ensuite il faudra réaliser une nouvelle gamme étalon pour le pNP, c'est à dire dans du TRIS 0,083M à la longueur d'onde du pic d'absorption.

### ♦ Résultats

La mesure du pH après l'ajout de 3 ml de soude 1M aux 15 ml d'essai a montré que celui-ci augmente en variant de 8,5 à 12,5.

Le spectre du pNP dans du TRIS 0,083M pour un pH de 12,5 qui figure sur l'annexe A2 a montré un pic maximal d'absorption dans à 400 nm, c'est à dire identique à celui déterminé dans du TRIS 0,1M pour un pH de 8,5 comme le montre l'annexe A4.

Une nouvelle gamme étalon a été réalisée dans du TRIS 0,083M pour un pH de 12,5 à 400 nm et figure sur l'annexe A2.

# VI STARVATION DE *SCENEDESMUS* *SUBSPICATUS* ET *RAPHIDOCELIS* *SUBCAPITATA*.

---

L'étude de cette starvation est destinée à particulariser le temps nécessaire à la carencer les deux souches en phosphore. L'état de carence de ces algues en croissance a été apprécié grâce à la mesure de l'A.P.A. exprimée par les algues afin de puiser dans leurs réserves en phosphore.

D'autre part, la mesure de l'A.P.A. faisant par définition appel à une réaction enzymatique, il nous a paru important de vérifier qu'aucun inhibiteur ne venait perturber la réaction étudiée. Pour cela nous avons effectué des mesures de l'A.P.A. sur les souches carencées avec plusieurs rapports massiques pNPP/M.V.S..

## 6-1-Suivi de la starvation des algues

### *6-1-1-Matériel et méthode*

Pour *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* le protocole expérimental pour cette expérimentation a été le suivant :

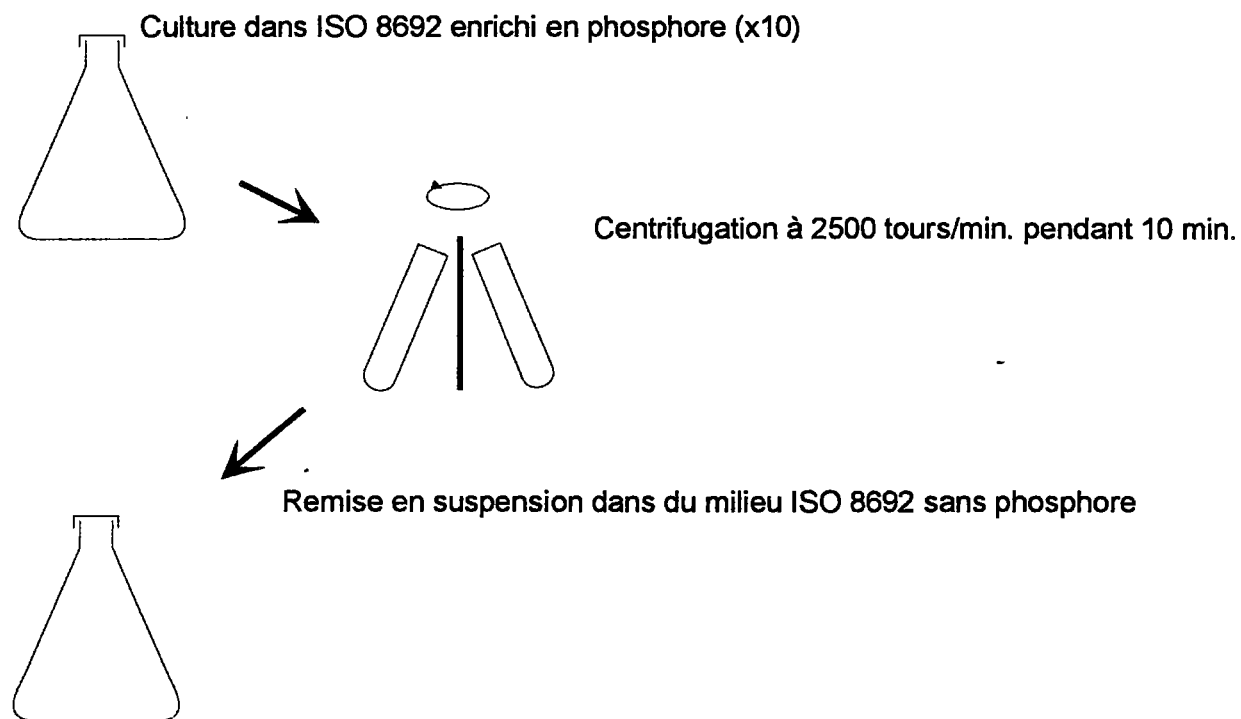
7 erlens contenant 120 ml chacun de milieu ISO 8692 sans phosphore ont été placés dans les conditions de cultures décrites en 4-1-1. Au sein de ces erlens ont été réensemencées des algues préalablement cultivées dans du milieu ISO 8692 dix fois plus riche en phosphore et centrifugées pour être remises en suspension comme le décrit le schéma page 21. Toutes les manipulations ont été réalisées dans des conditions pouvant assurer un maximum de stérilité afin de minimiser tout risque de contamination des cultures.

Parmi ces 7 erlens :

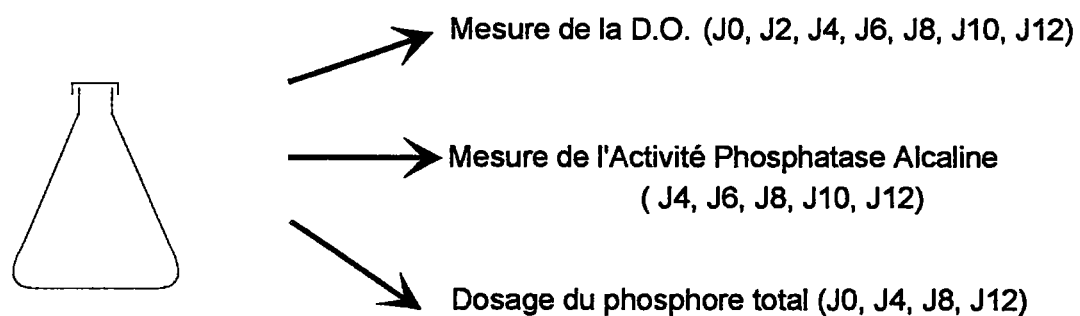
- tous ont subi un prélèvement de 8 ml tous les 2 jours (j2, j4, j6, j8, j10, j12) afin de suivre la croissance des algues
- 4 ont permis respectivement de réaliser à j0, j4, j8, j12 le dosage (pour 50 ml) du phosphore total dont la concentration est ramenée en mgP/mg de M.V.S. Le protocole de dosage du phosphore total est celui de la norme NF T 90-023.
- Les trois autres appelés a,b et c ont servi à déterminer l'A.P.A. tous les 2 jours.

Pour chaque erlen, une fois les prélèvements effectués le jour dit entre 10h et 11h, nous avons apporté du milieu ISO 8692 sans phosphore par volume égale à 5% du volume restant dans l'erlen. Cette "dilution" tend à écarter tout risque de carence en élément autre que le phosphore pour la durée de l'expérience. La valeur de 5% est arbitraire mais choisie de manière à ce que la dilution ne soit pas trop importante et nous permette d'avoir une biomasse encore suffisante pour le dosage de l'A.P.A..

## Préparation des souches carencées en phosphore



## Mesures effectuées sur les différentes souches carencées





### 6-1-2-Résultats

Les résultats figurant page 23 et 24 obtenus pour les deux souches reflètent bien les besoins en phosphore des algues pour croître ainsi que la nécessité de faire appel à l'A.P.A. pour puiser dans leurs réserves en l'absence de phosphore dans le milieu.

En effet, nous observons bien ici pour *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* une diminution du phosphore cellulaire exprimé en mg/gMVS. La teneur en phosphore de *Scenedesmus* diminue de 1.035g/gMVS pour J0 à 350 mg/gMVS pour J12 et celle de *Raphidocelis subcapitata* de 839.85mg/gMVS pour à 319,63 mg/gMVS pour le même temps.

Cette consommation du phosphore cellulaire nécessitant l'intervention de la phosphatase alcaline nous observons bien pour les histogrammes (page 24) des deux espèces une augmentation de l'A.P.A. se traduisant par une hydrolyse plus important du pNPP en pNP lors des dosages.

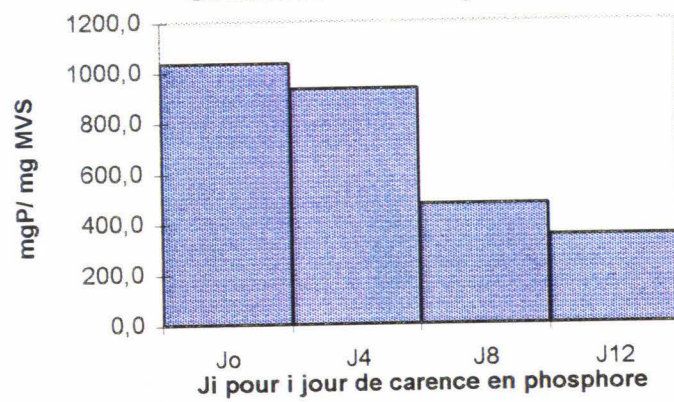
Les résultats mettent également en exergue deux différences :

- ♦ *Raphidocelis subcapitata* cultivée pour une même durée et dans un même milieu que *Scenedesmus subspicatus* avant la carence a des réserves en phosphore moins importantes à J0 (839,85 mg/g MVS contre 1035,88mg/g MVS, soit environ 20 % de moins). Tout le phosphore biodisponible se trouvait alors sous forme d'orthophosphate et était donc directement assimilable. Il semblerait donc que *Raphidocelis subcapitata* ait des capacités inférieures à celles de *Scenedesmus subspicatus* pour stocker du phosphore.

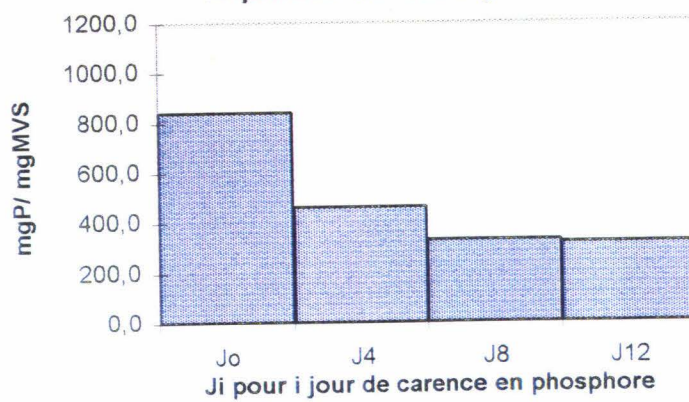
- ♦ *Raphidocelis subcapitata* possède une A.P.A. beaucoup plus intense que celle de *Scenedesmus subspicatus* pour toute la durée de la carence. L'augmentation de cette A.P.A. est d'ailleurs de type exponentielle de J0 à J13, alors que celle de *Scenedesmus subspicatus* semble avoir atteint une phase plateau dès J6 ,jusqu'à J12.

Il est intéressant de remarquer qu'à J12, les réserves en phosphore des deux espèces ne diffèrent que d'environ 30 mg/g MVS alors qu'à J0 la différence était approximativement de 300 mg/g MVS. Aussi, bien que l'A.P.A. de *Raphidocelis subcapitata* soit la plus forte et que la biomasse produite soit sensiblement plus importante que celle de *Scenedesmus subspicatus*, cette dernière consomme plus rapidement le phosphore stocké.

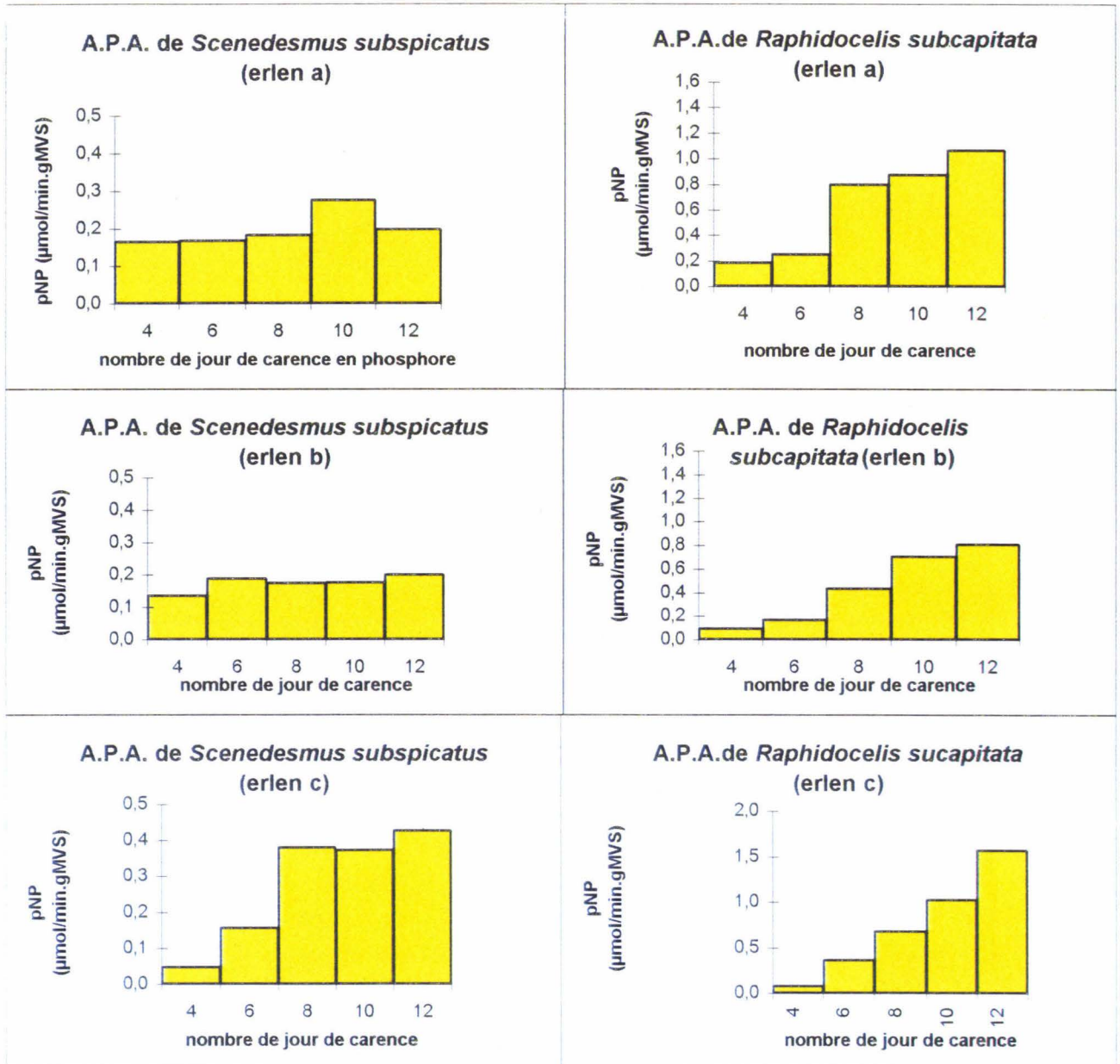
Dosage du phosphore intracellulaire total de *Scenedesmus subspicatus*



Dosage du phosphore intracellulaire total de *Raphidocelis subcapitata*



Suivi de la l'A.P.A. de *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* durant la carence de 12 jours en phosphore



## 6-2-Etude enzymologique

### 6-2-1-Intérêt de cette étude

Les enzymes sont des catalyseurs protéiques qui rendent possible, par abaissement de l'énergie d'activation, certaines réactions avec des substrats qui leurs sont étroitement spécifiques. Elles possèdent des sites actifs par lesquels elles s'associent à des molécules de substrat conduisant ainsi aux réactions du type :



E : Enzyme

S : Substrat

E-S : complexe enzyme substrat

P : Produit

La cinétique de ces réactions dépend généralement :

- de la concentration en enzyme
- de la concentration en substrat
- de l'affinité de l'enzyme pour le substrat
- de facteurs physico-chimiques
- de la présence d'effecteurs (activateurs ou inhibiteurs)

Dans le cas d'une cinétique enzymatique michaëlienne la loi de MICHAELIS-MENTEN dont la courbe de saturation est concave (figure ci-contre) est vérifiée :

$$V = V_m \cdot S / (K_m + S)$$

V : Vitesse d'hydrolyse

S : concentration en substrat

K<sub>m</sub> : constante de Michaëlis

V<sub>m</sub> : vitesse maximale d'hydrolyse

V<sub>m</sub> et K<sub>m</sub> sont des constantes caractéristiques de chaque enzyme. Le K<sub>m</sub> est défini comme la concentration en substrat permettant à l'enzyme d'atteindre la moitié de la vitesse maximale. De plus 1/K<sub>m</sub> est utilisé pour caractériser l'affinité de l'enzyme pour le substrat

La valeur du K<sub>m</sub> ainsi que celle de V<sub>m</sub> peut être définie graphiquement par la méthode de LINEWEAVER-BURK consistant à inverser la relation :

$$V = V_m \cdot S / (K_m + S)$$

On obtient alors l'équation de la droite  $1/V = f(1/S)$ , dont les intersections avec les axes des abscisses et des ordonnées sont respectivement  $1/K_m$  et  $1/V_m$ .

Pour *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* la cinétique michaëlienne doit être vérifiée afin de détecter un éventuel inhibiteur ainsi que le K<sub>m</sub> et V<sub>m</sub> propre à chaque espèce.

## 6-2-2-Expérimentation

### ♦ Protocole

Les cultures de *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* utilisées pour cette étude auront été carencées en phosphore dans les mêmes conditions que précédemment et pour une durée de 10 jours.

La mesure de l'A.P.A. sera réalisée selon le même protocole que celui décrit page 19.

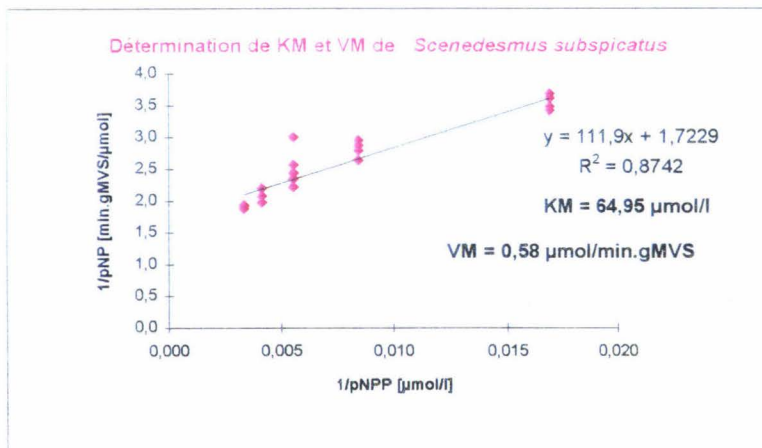
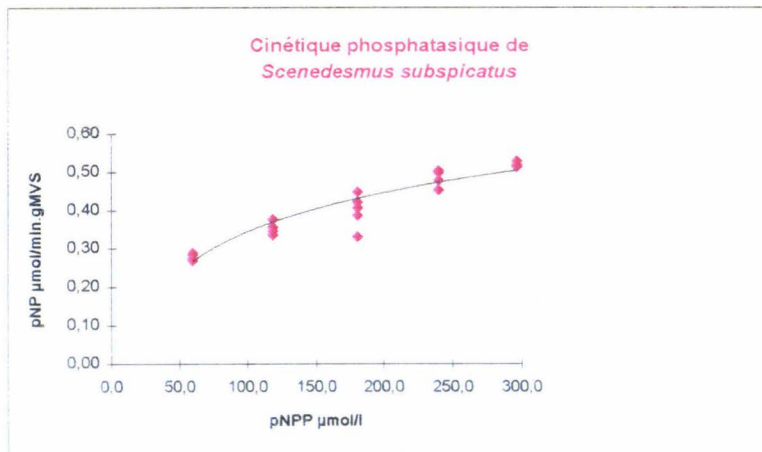
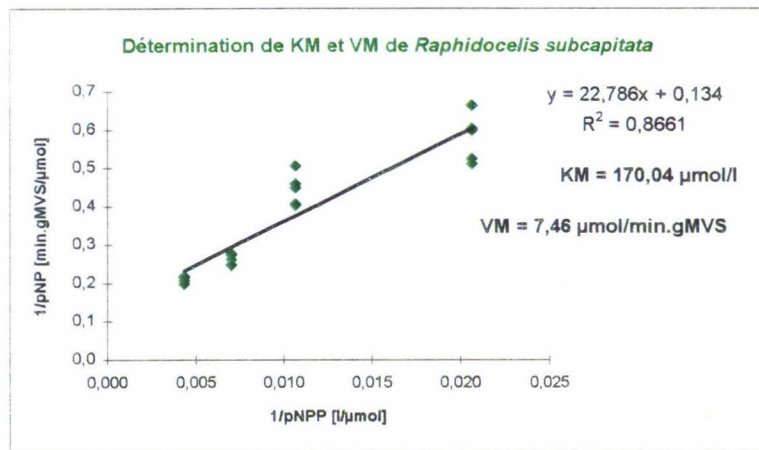
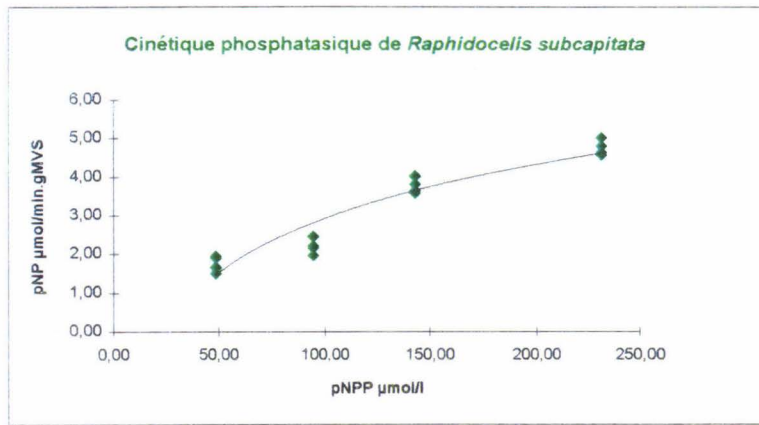
Pour mener à bien cette étude, la quantité de pNPP 3g/l apportée dans les milieux réactionnels respectera les rapports pNPP/MVS suivants : 0,2-0,4-0,6-0,8-1. Pour chaque rapport pNPP/MVS, 5 essais donneront lieu à 5 mesures. Cette multiplicité des mesures pour chaque rapport rendra compte de la reproductibilité de la mesure de l'A.P.A. suivant le protocole choisi.

### ♦ Résultats

Les graphiques page 27 transcrivent les résultats figurants annexe A7. Ceux-ci montrent bien des cinétiques michaéliennes pour les deux espèces dont les valeurs de Km et Vm ont été déterminées graphiquement.

Ces cinétiques écartent l'hypothèse de la présence d'un inhibiteur potentiel, dont la présence était tout de même peu probable dans le milieu de culture synthétique, à moins d'une forte contamination bactérienne dont l'A.P.A. aurait peut-être pu devenir compétitive.

Il est important de noter que Vm et Km de *Raphidocelis subcapitata* est beaucoup plus importante que celle de *Scenedesmus subspicatus*



## VII CONCLUSION

---

Les expérimentations réalisées nous ont permis de constater une augmentation effective de l'activité phosphatase alcaline pour *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata* en relation avec la diminution de la concentration cellulaire en phosphore.

Deux différences interspécifiques sont à souligner :

- ♦ l'intensité de l'activité phosphatase alcaline est beaucoup plus intense chez *Raphidocelis subcapitata*.
- ♦ *Raphidocelis subcapitata* stocke moins de phosphore que *Scenedesmus subspicatus*, bien que leurs métabolismes ne soient pas fondamentalement différents.

Il apparaît cependant que ces constatations ne nous permettent pas de préciser quelles sont les réserves concernées par la phosphatase alcaline au bout de 13 jours pour les deux espèces : réserves de luxes ou constituants cellulaires. De prochaines expérimentations devront être orientées dans ce sens, c'est à dire définir la quantité de phosphore minimum pouvant être considérée comme dépourvue de phosphore de "luxes". Pour cela il semble qu'un suivi de la biomasse en milieu carencé jusqu'à la phase de dégénérescence soit intéressant.

Nous pourrions ainsi déterminer la durée de carence maximale pour que les algues soient carencées en phosphore sans que leurs constituants cellulaires et donc leurs métabolismes ne soient irrémédiablement affectés par l'expression de l'activité phosphatase alcaline. La représentativité du test serait en effet compromise dans le cas contraire.

## VIII PERSPECTIVES

---

### A court terme :

Une fois le quota minimum interne en phosphore des espèces déterminé, un étalonnage des souches carencées devra être réalisé. Alors, différentes substances (polyphosphates, l'acide phosphorique et des substances organochlorées, ...) pourront être testées selon le protocole décrit page 9.

### A long terme :

Ce bioessai avec algues planctoniques d'eau douce est destiné à mettre en évidence l'effet fertilisant d'une substance chimique dissoute dans un milieu de culture contrôlé. Toutefois, son principe pourrait très bien être utilisé pour évaluer la fertilité d'une eau douce.

A un échantillon d'eau douce correspondrait alors une biomasse maximale et une quantité de phosphore biodisponible rendant parfaitement compte du réel état de fertilité du milieu, ce qu'une analyse chimique de la teneur en phosphore serait bien incapable de déterminer.

Afin de minimiser le temps de préparation des souches carencées, la recherche de souches de phytoplancton avec des réserves en phosphore rapidement consommées lors de la carence serait également intéressante à envisager.

Enfin, le suivi de l'A.P.A. en milieu naturel, notamment sur le périphyton, dont l'immobilité en fait un maillon privilégié pour l'étude de l'impact des activités anthropiques sur la qualité des hydrosystèmes, pourrait être réalisé.



## BIBLIOGRAPHIE

---

AARONSON S. & PATNI N.J., 1976, The role of surface and extracellular phosphatases in the phosphorus requirement of *Ochromonas*, Limnology and Oceanography, 21 (6), 638-645.

AZAD H.S. & BORDCHARDT J.A., 1970, Variations in phosphorus uptake by algae, Env. Sc. and Tech., 4 (9), 737-743.

BADREDDINE I., 1992, Utilisation des tests enzymatiques en écotoxicologie des milieux aquatiques continentaux, Rapport technique de D.E.A.: analyse et modélisation des systèmes biologiques à l'université BERNARD C. de LYON, 34p.

BARROIN G., 1991, La réhabilitation des plans d'eau, La Recherche, 24 (238), 1412-1422;

BENNETON J-P., 1986, Eutrophisation des plans d'eau. Inventaire des principales sources de substances nutritives azotées et phosphorées. Etude bibliographique, Trib. Cebedeau, 39 (506), 15-26.

BERMAN T., 1970, Alkaline phosphatase and phosphorus availability in lake Kinneret, Limnology and Oceanography, 15 (5), 663-674.

BOAVIDA M.J. & MARQUES R.T., 1995, Low phosphatase activity in two eutrophic reservoirs, Hydrobiologia, 297, 11-16.

CHENEVAL J-P., 1993, La toxicité des lessives, La Recherche, 24 (250), 18-25.

CURRIE J., BENTZEN E. & KALFF J., 1986, Does algal-Bacterial Phosphorus Partitioning Vary among lakes? A comparative Study of orthophosphate Uptake and Phosphatase Activity in Freshwater, Can. Fish. Aquat. Sci., 43, 311-318.

DENEUVY J-P., 1984, L'activité phosphatasique des microphytes. Données de la littérature et essais en vue d'applications potentielles, Mémoire de D.E.A. à l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, 34p.

FEUILLADE J., FEUILLADE F. & BLANC P., 1990, Alkaline phosphatase activity fluctuations and associated factors in a eutrophic lake dominated by *Oscillatoria rubescens*, Hydrobiologia, 207, 233-240.

FIZGERALD G.P. & NELSON T.C., 1966, Extractive and enzymatic analysed for limiting or surplus phosphorus in algae, J. Phycol., 2, 32-37.

FONTY P., 1964, Méthode d'étude pratique d'une réaction enzymatique. Monographie annuelle de la société française de biologie clinique, L'expansion, 254-282.

GAGE M.A. & GORHAM E., 1985, Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of phosphorus status of phytoplankton in Minnesota lakes, Freshwater Biology, **15**, 227-233.

GILLEN G. *et al.*, 1994, Modélisation mathématique du développement algale et de la qualité de l'eau dans le réseau hydrolique de la Marne (modèle EUSTACHE), rapport A.E.S.N.

HANNA M., 1985, La biodisponibilité du phosphore, Mémoire de D.E.A. de l'université SABATIER P. de TOULOUSE, 72p.

HEALEY F.P. & HENDZEL L.L., 1979, Fluorimétric measurement of alk. ph. act. in algae, Fresh Water Biology, **9** (5), 429-439.

ISO 8692 : 1989 (F), Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenestrum capricornutum*.

ISTVANOVIC V. *et al.*, 1992, Evaluation of phosphorus deficiency indicators for summer phytoplankton in Lake Erken, Limnology & Oceanography, **37** (4), 890-900.

KIM B. & WETZEL R.G., 1993, The effect of dissolved humic substances on the alkaline phosphatase and the growth of microalgae, Verh. Internat. Verein. limnol., **25**, 129-132.

JONES J.G., 1972, Studies on freshwater micro-organisms : phosphatase activity in lakes of differing degrees of eutrophisation, J. Ecol., 777-791.

LIOGIER P. & ZENKER B., 1988, Assimilation de phosphore et croissance des microphytes, Mise au point d'un test d'activité phosphatasique, travail de fin d'étude à l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, 88p.

MATAVULJ M. *et al.*, 1990, Phosphatase activity of water as monitoring parameter, Wat.Sci. Tech., **22** (5), 63-68.

NF T 90-023, Septembre 1982, Essai des eaux, Dosage des orthophosphates des polyphosphates et du phosphore total.

PETTERSON K. & JANSSON M., 1978, Determination of phosphatase activity in lake water-a study of methods, Verh. Internat. Verein. Limnol., **20**, 1226-1230.

RHEE G.Y., 1973, A continuous culture study of phosphate uptake, Growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus sp.*, J. Phycol., **9**, 495-506.

SMITH R.E.H. & KALFF J., 1981, The effect of phosphorus limitation on algal growth rates : evidence from alkaline phosphatase, Can. J. Aquat. Sci., **38**, 1421-1427.

STEWART A.J. & WETZEL R., 1982, Phytoplankton contribution to alkaline phosphatase activity, Archi. Hydrobiol., **3**, 265-271.

TAFT J.L., LOFTS M.E. & TAYLOR R.W., 1977, Phosphate uptake from phosphomonoesters by phytoplankton in Chesapeake Bay, Limnology and Oceanographie, 22 (6), 1012-1021.

U.S.ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, National Eutrophication Research Program, 1971, Algal Assay Procedure : Bottle test, EPA, Pacific Northwest Laboratory, Corvallis, Oregon, 82 p.

U.S.ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, National Eutrophication Research Program, 1978, The *Scelenastrum capricornutum* Printz Algal Assay Bottle Test, EPA, Pacific Northwest Laboratory, CORVALLIS, OREGON, 126 P.

VURBA J., KOMARKOVA J.; & VYHNALE V., 1993, Enhanced activity of alkaline phosphatases-Phytoplankton response to epilimnic phosphorus depletion, Wat. Sci. Tech., 28 (6), 15-24.

## LISTE DES ANNEXES

---

A1 : Corrélation entre les méthodes d'évaluation de la biomasse

A2 : Pic d'absorption du pNP dans le TRIS 0.083M, pH 12.5 et gamme étalon

A3 : Protocoles expérimentaux suivis par différents auteurs pour la mesure de l'A.P.A. avec le pNPP

A4 : Pics d'absorption du pNP dans le TRIS 0.083M à pH 8.5 et pH 12.5

A5 : Suivi de la carence en phosphore de *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata*

A6 : Dosage du phosphore cellulaire total pour les deux souches

A7 : Etude enzymatique de l'A.P.A. pour les deux souches

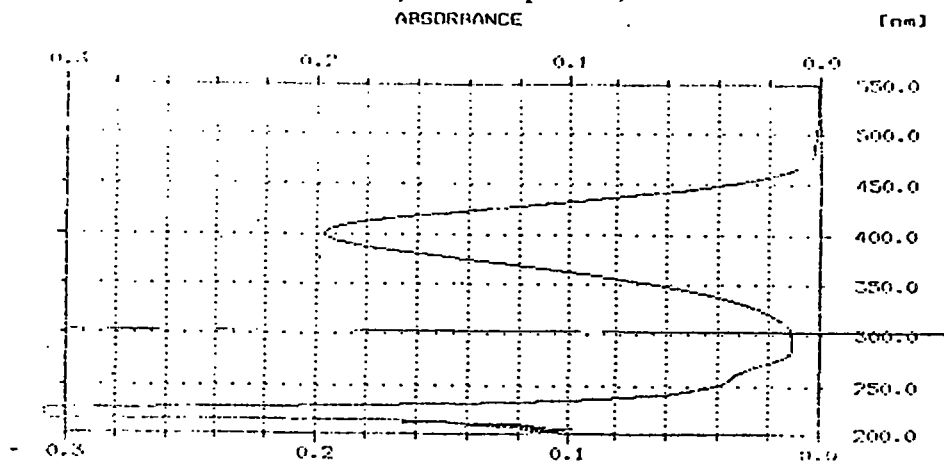
Corrélation entre D.O. lues à 665 nm et concentrations cellulaires

<i>Raphidocelis subcapitata</i>		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	
D.O.x10e3	x10e4cell./ml	D.O.x10e3	x10e4cell./ml
17	17	18	14
19	16	18	14
20	16	21	15
45	49	61	65
45	51	66	56
45	48	67	55
61	55	68	73
69	61	73	75
77	66	76	64
107	85	139	135
111	90	161	212
114	97	169	214
180	240	170	208
202	228	285	342
251	239	334	377
256	257	554	768
340	368	581	760
341	456	635	880
367	427		
417	492		

Corrélation entre D.O. lues à 665 nm et M.V.S. (mg/l)

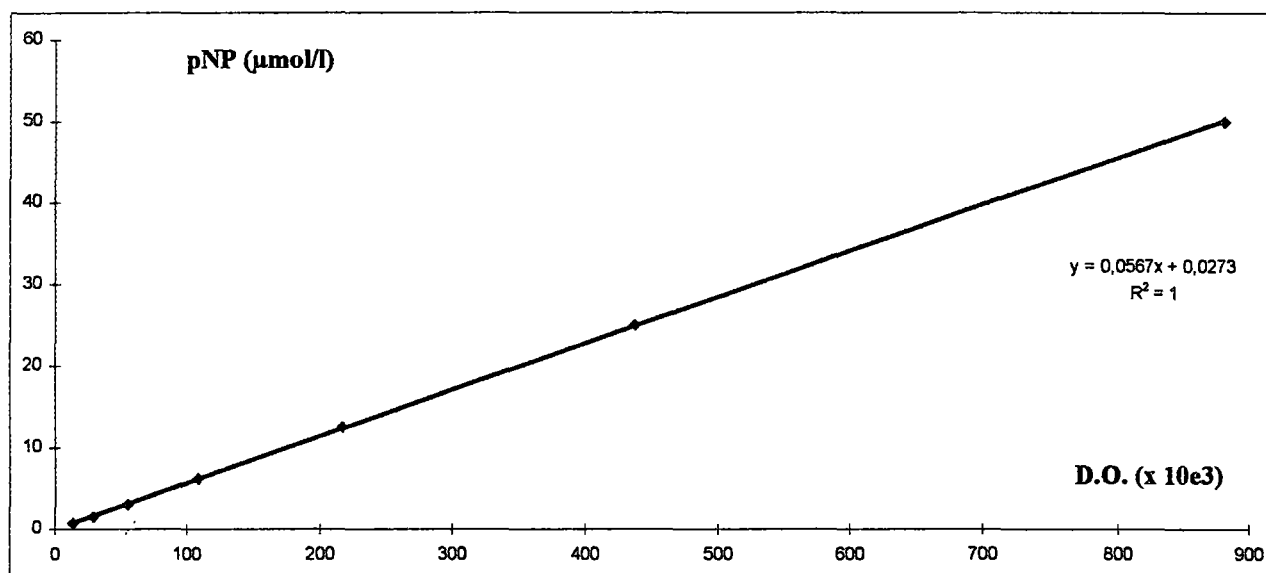
<i>Raphidocelis subcapitata</i>		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	
D.O.x10e3	M.V.S.(mg/l)	D.O.x10e3	M.V.S.(mg/l)
113	23	90	28
114	13	95	30
118	25	97	35
118	30	135	35
121	20	136	35
121	30	137	33
123	33	148	30
126	28	148	33
134	28	148	35
187	53	319	80
261	65	344	105
351	95	387	83
462	123	484	128
476	118	662	173
		792	220

Spectre d'absorption du pNP  
dans le TRIS 0,083 M à ph = 12,5



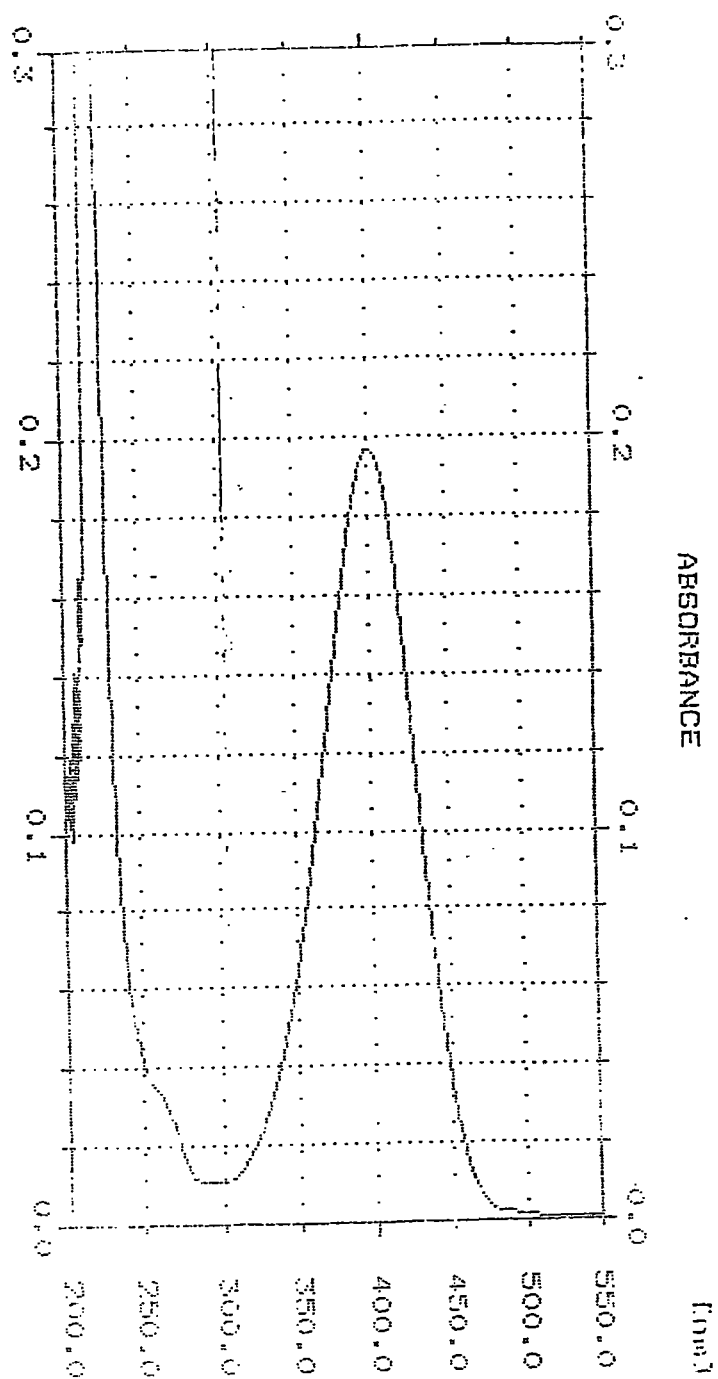
Gamme étalon du pNP  
dans le TRIS-HCl 0,083 M à pH=12,5  
Lecture des D.O. à 400 nm

D.O. (x 10e3)	Concentration du pNP en $\mu\text{mol/l}$
883	50
438	25
217	12,5
109	6,25
55	3,12
30	1,56
14	0,78

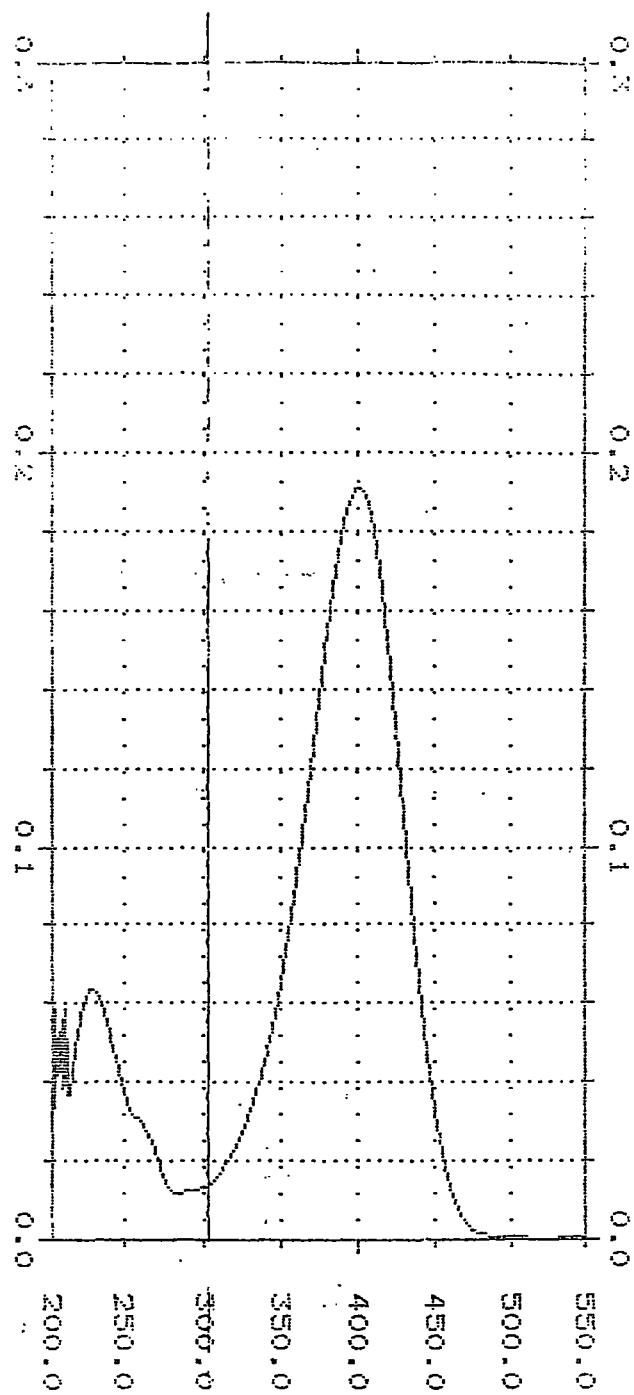


Protocoles expérimentaux suivis par différents auteurs  
pour la mesure de l'A.P.A. avec le pNPP

Auteur	Volume réactionnel	Réactif d'arrêt	Volume du réactif d'arrêt
FITZGERALG & NELSON (1966)	40 ml : 32 ml de suspension + 4 ml (TRIS1M+MgCl <sub>2</sub> 0,01 M) + 4 ml pNPP 300mg/l	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 mg dans 0,5 d'échantillon à doser
JONES (1972)	24 ml : 20 ml de suspension + 1 ml de chloroforme + 1 ml de TRIS 0.1 M + 1 ml pNPP 0.1g/l	NaOH 1N	1 ml
GAGE & GORHAM (1985)	11 ml : 10 ml de suspension + 0.5ml de TRIS0.3M pH 8.5 +0.5ml de pNPP 0.4g/l	NaOH 1N + 0.5l d'EDTA	0.5 ml
LIOGIER & ZENKER (1988)	15 ml : 10 ml de suspension + 1 ml de MgCl <sub>2</sub> 0.01M + 1 ml de TRIS 0,1M + pNPP 3/l tel que pNPP/MVS =0.2	NaOH 1N	3 ml
FEUILLADE, FEUILLADE & BLANC (1990)	2 ml + MVS filtrée: + 2 ml de TRI à PH8.5 + 1 mg/ml de pNPP	NaOH 0,2N	



Spectre d'absorption du pNP à 400 nm dans le TRIS 0.083M à pH 8.5



Spectre d'absorption du pNP à 400 nm dans le TRIS 0.083M à pH 12.5



Suivi de la carence en phosphore de *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata*

**Scenedesmus subspicatus**

Erlen a

durée de carence (jours)	2	4	6	8	10	12
M.V.S. (mg/l)	106	126,6	154,7	175,1	192	199,5
D.O. corr. X 10e3	/	24	30	37	62	46
pNP (µmol/l.)	/	1,39	1,73	2,13	3,54	2,64
pNP (µmol/min.gMVS)	/	0,16	0,17	0,18	0,28	0,20

Erlen b

durée de carence (jours)	2	4	6	8	10	12
M.V.S. (mg/l)	109,1	128,2	154,9	181,7	189,1	214,1
D.O. corr. X 10e3		20	34	37	39	50
pNP (µmol/l.)	/	1,16	1,96	2,13	2,24	2,86
pNP (µmol/min.gMVS)	/	0,14	0,19	0,18	0,18	0,20

Erlen c

durée de carence (jours)	2	4	6	8	10	12
M.V.S. (mg/l)	105,9	114,1	138,5	178	192,6	218,4
D.O. corr. X 10e3		6	25	79	84	109
pNP (µmol/l.)	/	0,37	1,44	4,51	4,79	6,21
pNP (µmol/min.gMVS)	/	0,05	0,16	0,38	0,37	0,43

**Raphidocelis subcapitata**

Erlen a

durée de carence (jours)	2	4	6	8	10	12
M.V.S. (mg/l)	73,35	94	111,2	138	147,9	168,1
D.O. corr. X 10e3		20	32	129	152	210
pNP (µmol/l.)	/	1,16	1,84	7,34	8,65	11,93
pNP (µmol/min.gMVS)	/	0,19	0,25	0,80	0,88	1,06

Erlen b

durée de carence (jours)	2	4	6	8	10	12
M.V.S. (mg/l)	67	88,2	103,3	122,3	134,4	152,6
D.O. corr. X 10e3		9	20	62	111	145
pNP (µmol/l.)	/	0,54	1,16	3,54	6,32	8,25
pNP (µmol/min.gMVS)	/	0,09	0,17	0,43	0,71	0,81

Erlen c

durée de carence (jours)	2	4	6	8	10	12
M.V.S. (mg/l)	72,3	91,3	81	84,2	99	128,9
D.O. corr. X 10e3		8	34	67	119	237
pNP (µmol/l.)	/	0,48	1,96	3,83	6,77	13,47
pNP (µmol/min.gMVS)	/	0,08	0,36	0,68	1,03	1,57

Dosage du phosphore cellulaire total  
durant le carençage de *Scenedesmus subspicatus* et *Raphidocelis subcapitata*

**Scenedesmus subspicatus**

durée de carence (jours)	Jo	J4	J8	J12
MVS (mg/l)	79,16	90,82	146,47	191,24
Pt (mg/l)	4,10	4,25	3,50	3,35
Pt (mg/g MVS)	1035,88	935,92	477,91	350,35

**Raphidocelis subcapitata**

durée de carence (jours)	Jo	J4	J8	J12
MVS (mg/l)	52,39	90,82	118,12	131,4
Pt (mg/l)	2,20	2,10	1,95	2,10
Pt (mg/g MVS)	839,85	462,45	330,17	319,63

Pourcentage de la diminution du phosphore cellulaire total de Ji à J(i+4)

**Scenedesmus subspicatus**

de Ji à J(i+4)	J0-J4	J4-J8	J8-J12
% de la diminution du Pt	9,65	48,94	26,69

**Raphidocelis subcapitata**

de Ji à J(i+4)	J0-J4	J4-J8	J8-J12
% de la diminution du Pt	44,94	28,60	3,19

## Etude enzymatique

*Raphidocelis subcapitata* (MVS = 131,89 mg/l)

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,018</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	48,50	48,50	48,50	48,50	48,50
D.O.corr. x 10e3	256	302	294	233	258
pNP $\mu\text{mol/l}$	14,54	17,15	16,70	13,24	14,66
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	1,65	1,95	1,90	1,51	1,67

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,035</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	94,30	94,30	94,30	94,30	94,30
D.O.corr. x 10e3	305	344	379	382	336
pNP $\mu\text{mol/l}$	17,32	19,53	21,52	21,69	19,08
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	1,97	2,22	2,45	2,47	2,17

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,053</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	142,80	142,80	142,80	142,80	142,80
D.O.corr. x 10e3	556	591	564	622	625
pNP $\mu\text{mol/l}$	31,55	33,54	32,01	35,29	35,46
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	3,59	3,81	3,64	4,01	4,03

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,069</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	185,91	185,91	185,91	185,91	
D.O.corr. x 10e3	455	406	456	428	
pNP $\mu\text{mol/l}$	25,83	23,05	25,88	24,29	
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	2,94	2,62	2,94	2,76	

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,086</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	231,71	231,71	231,71	231,71	
D.O.corr. x 10e3	708	746	719	778	
pNP $\mu\text{mol/l}$	40,17	42,33	40,79	44,14	
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	4,57	4,81	4,64	5,02	

*Scenedesmus subspicatus* (MVS = 167,67 mg/l)

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,022</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	59,28	59,28	59,28	59,28	59,28
D.O.corr. x 10e3	54	53	57	56	57
pNP $\mu\text{mol/l}$	3,09	3,03	3,26	3,20	3,26
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	0,28	0,27	0,29	0,29	0,29

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,044</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	118,55	118,55	118,55	118,55	118,55
D.O.corr. x 10e3	70	74	70	66	68
pNP $\mu\text{mol/l}$	4,00	4,22	4,00	3,77	3,88
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	0,36	0,38	0,36	0,34	0,35

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,067</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	180,52	180,52	180,52	180,52	180,52
D.O.corr. x 10e3	83	76	80	88	65
pNP $\mu\text{mol/l}$	4,73	4,34	4,56	5,02	3,71
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	0,42	0,39	0,41	0,45	0,33

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,089</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	239,80	239,80	239,80	239,80	239,80
D.O.corr. x 10e3	94	99	89	99	98
pNP $\mu\text{mol/l}$	5,36	5,64	5,07	5,64	5,58
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	0,48	0,50	0,45	0,50	0,50

<b>pNPP g/l</b>	<b>0,11</b>				
pNPP $\mu\text{mol/l}$	296,38	296,38	296,38	296,38	
D.O.corr. x 10e3	104	101	102	104	
pNP $\mu\text{mol/l}$	5,92	5,75	5,81	5,92	
pNP $\mu\text{mol/min.gMVS}$	0,53	0,51	0,52	0,53	