

Station Biologique de la Tour du Valat

**Mesure de l'absorption des nutriments
(Ammonium - Nitrate - Phosphate)
par les thalles de *Gracilaria verrucosa*
de l'étang du Méjean**

Isabelle Auby

Contrat IFREMER - 95 2 432 404 DEL

Octobre 1995

Remerciements

Je tiens à remercier ici vivement les quatre hommes de la situation qui ont facilité l'achèvement de ce travail, soit :

- Bruno Etcheverria, du laboratoire de neurophysiologie, qui a gentiment prêté du matériel à l'écolo d'à côté,

- Michel Parra, du laboratoire d'océanographie qui m'a aidée à installer le dispositif expérimental et à réparer les appareils qui tombaient régulièrement en panne,

- Franck Lerouvreur, du même laboratoire, qui s'est occupé du stockage des Gracilaires,

- Gilles Trut, de la Station IFREMER d'Arcachon, qui m'a tout appris du dosage du phosphate et de l'ammoniaque.

Et je n'oublie pas non plus Marie-Claude Ximenes, du CEMAGREF - Montpellier, qui m'a fait la confiance de me confier cette tâche.

Mesures d'absorption de nutriments par les thalles de *Gracilaria verrucosa* de l'Étang du Méjean

I. Matériel végétal

1.1. Récolte - stockage

Les thalles de *Gracilaria verrucosa* utilisés dans ces expériences proviennent de l'étang du Méjean. Trois lots successifs d'algues ont été prélevés (Figure 1) entre les mois de mars et de mai 1995. Les Gracilaires étaient ensuite débarrassées de leur macrofaune épiphyte (notamment l'Annélide polychète *Ficopomastus enigmaticus*, et le Bryozoaire *Conopeum seurati*), et stockées dans un bac ouvert rempli d'eau de mer aérée, situé en extérieur (conditions naturelles de température et d'éclairement). L'eau du bac était renouvelée environ tous les quinze jours.

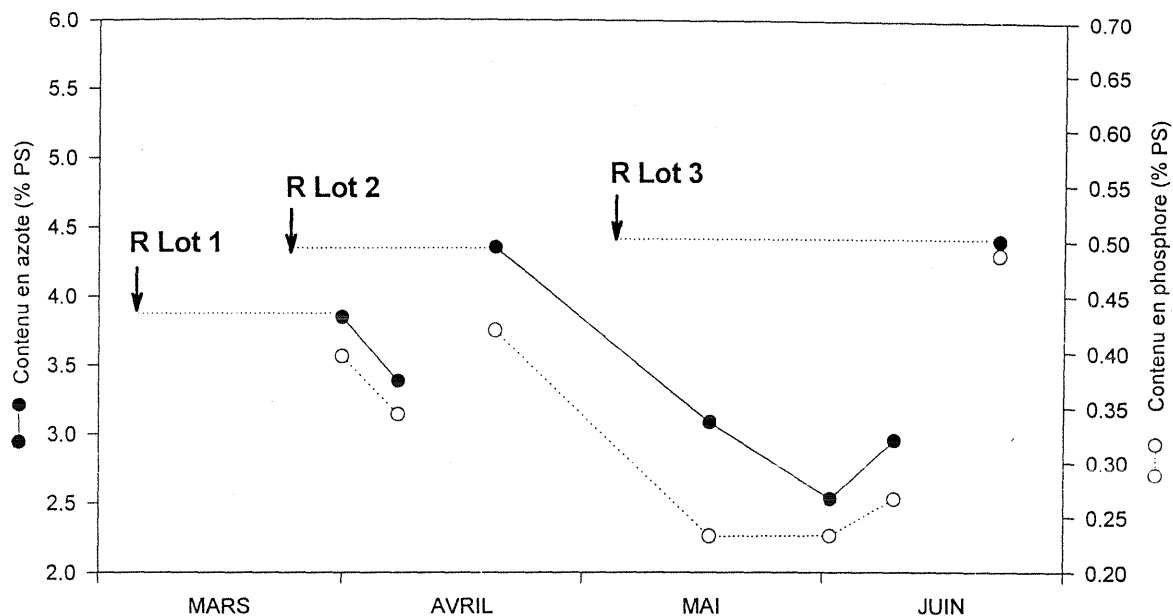
1.2. Réserves en azote et en phosphore des Gracilaires soumises à l'expérimentation

Les lots d'algues étaient stockés pendant au moins trois semaines avant d'être utilisés pour les expériences. En effet, il s'agissait d'appauvrir suffisamment les réserves en azote et en phosphore des Gracilaires pour les placer dans des conditions de carence relative en ces éléments, pour lesquelles, a priori, l'absorption des nutriments doit être maximale. Par ailleurs, il semblait logique de réaliser les expériences à basse température avec des algues présentant un contenu interne plus élevé que celui des algues testées à haute température.

Ces résultats ont été atteints pour la majorité des expériences. En effet, la comparaison du contenu en azote et en phosphore des algues dans le milieu naturel (Figure 2) d'une part et celui des Gracilaires soumises à l'expérimentation (Figure 1) d'autre part, indique que les réserves de ces dernières sont généralement du même ordre que les algues les plus carencées de l'étang (zone est) à la même époque de l'année.

Malheureusement, le troisième lot d'algues, utilisé pour les mesures d'absorption de l'ammonium à 20°C, présentait des contenus en azote et en phosphore relativement élevés (quoiqu'inférieurs à ceux des algues de la zone est de l'étang à cette période) et ce malgré un stockage long de plus d'un mois.

D'une façon générale, il est intéressant de constater que le contenu en N et P des algues stockées présente la même évolution que celui des Gracilaires du milieu. Ce phénomène rend probablement compte de la prédominance du cycle biologique des algues (variations du taux de croissance) par rapport à l'intensité et au rythme des apports en nutriments sur le contenu des algues en N et en P.



Lot 1		$\text{NH}_4\text{-NO}_3$ 10°C	
Lot 2		PO_4 10°C	* NO_3 20°C PO_4 20°C **
Lot 3			NH_4 20°C

* : expérience supplémentaire NO_3 - 10°C

** : expérience supplémentaire NO_3 - 20°C

Figure 1 : Contenu en azote et en phosphore des Gracilaires utilisées pour l'expérimentation (R = Récolte des algues sur le terrain).

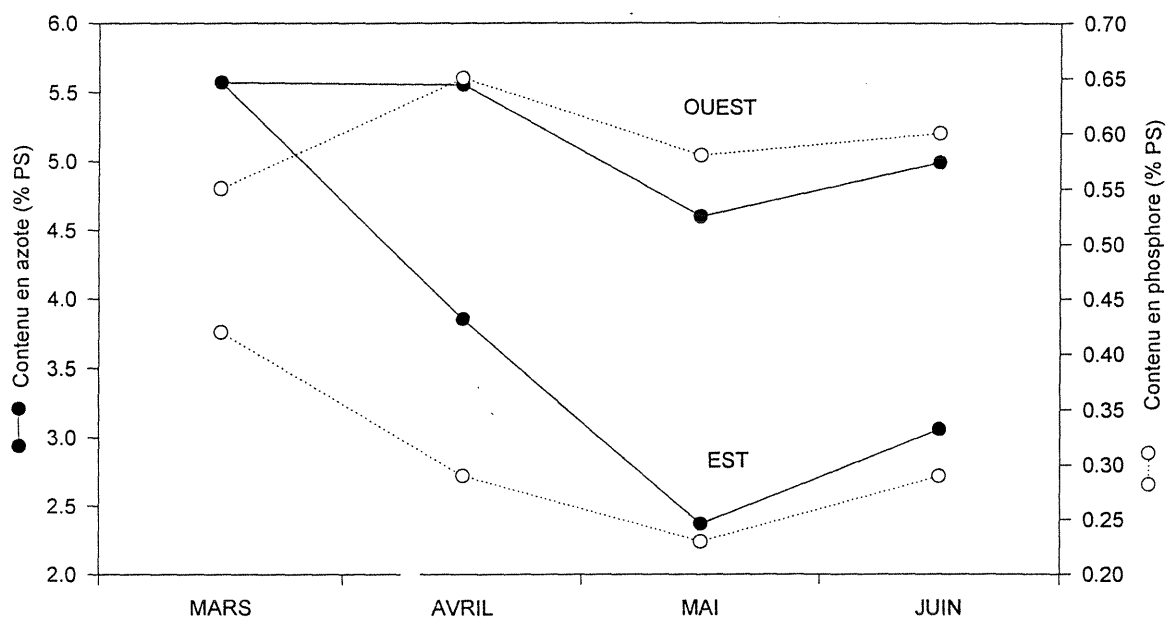


Figure 2 : Contenu en azote et en phosphore des Gracilaires dans l'étang du Méjean (valeurs hautes : est; valeurs basses : ouest)

2. Protocole expérimental

2.1. Pré acclimatation

Toutes les algues ont été soumises à une pré acclimatation aux conditions expérimentales (température, éclairage), pendant la période précédant les expériences :

- dans de l'eau de mer filtrée pour les mesures d'absorption d'ammonium (1h d'acclimatation) et de phosphate (2h d'acclimatation).

- dans de l'eau de mer filtrée enrichie de la concentration testée en nutriment, dans le cas du nitrate (2h d'acclimatation). En effet, il semble que la synthèse des enzymes qui permettent l'absorption de ce nutriment soit induite par la présence de nitrate dans le milieu (Harrisson et al., 1986; Thomas et al., 1987). Dans le cadre de ces expériences, nous ne souhaitons pas prendre en compte l'éventuel temps de latence correspondant à cette synthèse enzymatique dans les mesures d'absorption.

2.2. Mesures d'absorption des nutriments

Les expériences ont été réalisées dans des béciers de 500 ml immergés dans un bain maintenu à température constante (10°C puis 20°C), et en éclairage saturant. Ces béciers étaient remplis avec une solution d'eau de mer filtrée (sur membranes de porosité 0,45 µm) enrichie de milieu ES Provasoli, du nutriment testé à la concentration adéquate, et d'une source d'azote (pour les expériences d'absorption du phosphate : 80 µM NO₃) ou de phosphore (mesures d'absorption de l'ammonium et du nitrate : 10µM PO₄).

Le rang des concentrations testées au cours de ces expériences correspond aux limites des valeurs mesurées dans l'étang : 0 à 10 µM pour le phosphate, 0 à 80 µM pour le nitrate, et 0 à 400 µM pour l'ammoniaque. A chaque concentration, 3 réplicats (pour le phosphate et l'ammoniaque) ou 5 réplicats (pour le nitrate) et un blanc étaient réalisés.

La durée d'incubation et la quantité de Gracilaires étaient variables selon les expériences : il s'agissait que le milieu ne s'appauvrisse pas trop en nutriment testé au cours de l'expérience, mais que la diminution de concentration en ce nutriment soit suffisamment importante pour que l'on puisse mesurer une absorption significative.

<u>Ammonium</u> :	10°C	30 mn	3 g de poids frais
	20°C	15 mn	2 g de poids frais
<u>Phosphate</u> :	10°C	4 h	6 g de poids frais
	20°C	30 mn - 1 h	3 g de poids frais
<u>Nitrate</u> :	10°C	2h	5 g de poids frais
	20°C	1h - 2h	3 g de poids frais

Nutriment	t°	Equation du modèle	Vm	Ks
Ammonium	10°C	$V = 173,05 * C / 182,89 + C$ $r^2 = 0,98$	173,05	182,89
		$V = 44,49 * C / 32,95 + C (*C)$ $r^2 = 0,85$	44,49	32,95
	20°C	$V = 413,99 * C / 655,95 + C$ $r^2 = 0,98$	413,99	655,95
		$V = 46,52 * C / 92,96 + C (*C)$ $r^2 = 0,80$	46,52	92,96
Nitrate	10°C	$V = 7,18 * C / 11,27 + C$ $r^2 = 0,84$	7,18	11,27
	20°C	$V = 23,79 * (C - 4,86) / 14,34 + (C - 4,86)$ $r^2 = 0,97$	23,79	14,34
Phosphate	10°C	$V = 1,01 * C / 12,31 + C$ $r^2 = 0,99$	1,01	12,31
		$V = 0,13 * C / 1,36 + C (*C)$ $r^2 = 0,91$	0,13	1,36
	20°C	$V = 1,25 * (C - 0,42) / 1,89 + (C - 0,42)$ $r^2 = 0,80$	1,25	1,89

(*C) = équation corrigée en retranchant la composante diffusive

Tableau 1 : Modèles ajustés aux mesures de vitesse d'absorption en fonction de la concentration en nutriment. Vm : vitesse maximale d'absorption ($\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Ks : constante de demi saturation (μM).

Nutriment	Vm	Ks
Ammonium	38 - 196	4 - 38
Nitrate	6 - 64	2 - 8
Phosphate	0,2 - 11	0,45 - 2

Tableau 2 : Limites des valeurs de Vm ($\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) et de Ks (μM) chez les macroalgues de type "delicately branched, pluriseriate", selon Wallentinus (1984).

2.3. Analyses chimiques

2.3.1. Matériel végétal

Les dosages d'azote et de phosphore dans les Gracilaires ont été réalisés par le CIRAD.

- *Azote total* : Détermination par combustion sur un LECO FP428.
- *Phosphore total* : Mesure par ICP spectrométrie (JY50 Polyscan) après minéralisation acide.

2.3.2. Eau

Les dosages d'ammonium et de phosphate ont été réalisés à la station IFREMER d'Arcachon. Les nitrates ont été dosés par le CIRAD.

- *Ammonium* : Méthode de Koroleff (1976).

Etalonnage avec la même eau de mer que celle qui est utilisée pour les expériences : pas de correction de salinité. Un étalonnage avant chacune des deux expériences (10 et 20°C).

Fixation immédiate des échantillons au cours des expériences (ajout des deux réactifs).

Au dessus d'une concentration de 10 µM, dilution des échantillons avec de l'eau de mer.

Conservation à l'obscurité. Mesures environ 12 h plus tard

- *Phosphate* : Méthode de Murphy et Riley (1962)

Etalonnage préalable à chaque série de dosages (l'un des réactifs ne se conserve pas et doit être préparé peu de temps avant les opérations).

Conservation des échantillons au réfrigérateur et à l'obscurité, pendant 12h au maximum.

Ajout des réactifs juste avant les mesures.

- *Nitrate* : Echantillons congelés au cours des expériences.

Mesures réalisées avec un autoanalyseur Alliance, en utilisant une méthode basée sur la réaction de Griess (Aminot et Chaussepied, 1983).

2.4. Analyse statistique

Les cinétiques d'absorption de nutriments ont été ajustées sur différents types de modèles, en utilisant le logiciel Statsgraphics 5.1. :

$\text{NH}_4 - 10^\circ\text{C}$

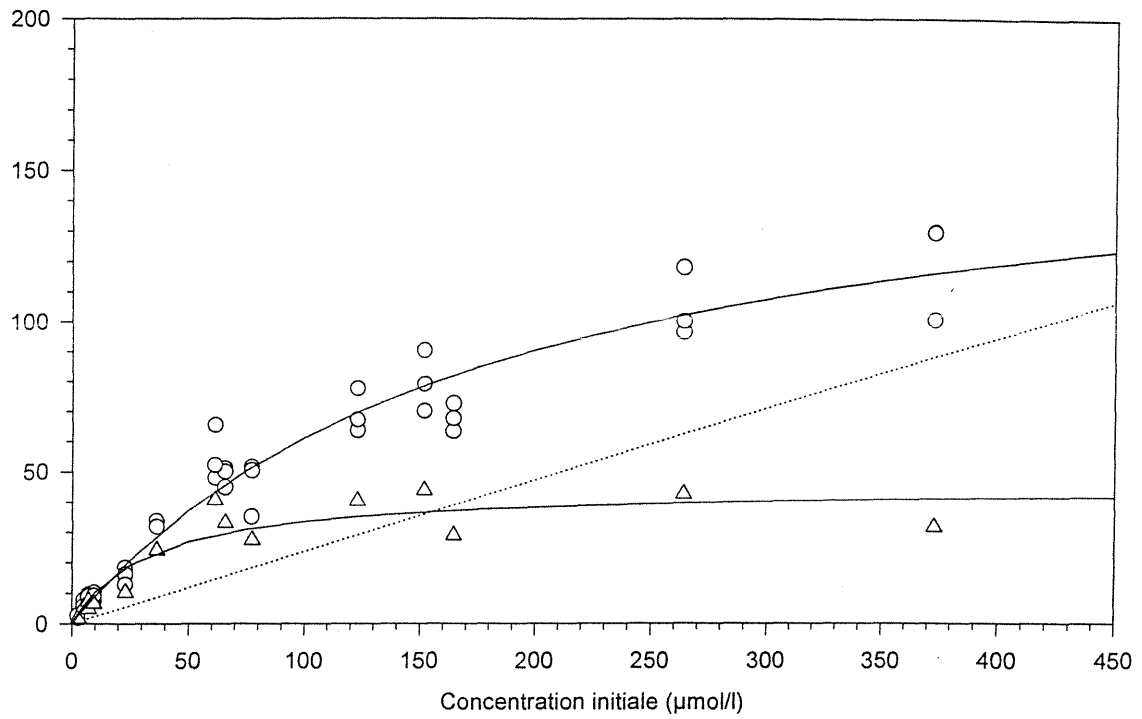


Figure 3a : Cinétique d'absorption de l'ammonium à 10°C.

$\text{NH}_4 - 20^\circ\text{C}$

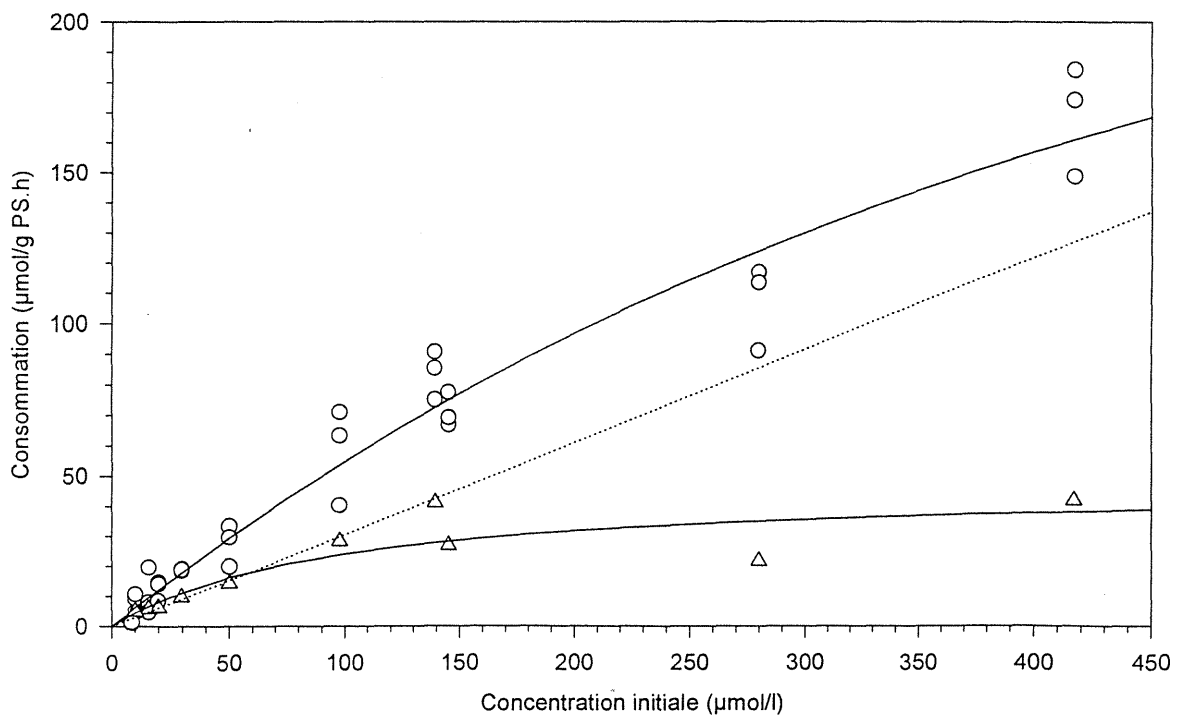


Figure 3b : Cinétique d'absorption de l'ammonium à 20°C.

- Modèle linéaire : $V = a * C + b$
- Modèles hyperboliques (Equation de Michaelis-Menten)

$$V = V_m * C / (K_s + C)$$

$$V = V_m * (C - k) / (K_s + (C - k)).$$

Le modèle le mieux ajusté aux données expérimentales (en l'occurrence, toujours l'un ou l'autre des deux types de modèles hyperboliques) était ensuite retenu pour calculer les paramètres V_m et K_s .

Dans un certain nombre de cas, les courbes ne présentent pas le plateau caractéristique des cinétiques enzymatiques (saturation). Pour les fortes concentrations, la vitesse d'absorption continue de s'élever en fonction de la concentration. Ce phénomène s'explique par la superposition d'une absorption active, modélisable par l'équation de Michaelis-Menten, et d'une absorption passive (diffusion), caractérisée par une fonction linéaire. La composante active de l'absorption peut être caractérisée en déduisant des données expérimentales les valeurs des ordonnées de la droite correspondant à la diffusion. Ce type de transformation a été effectué à trois reprises.

3. Résultats et discussion

Les résultats des 6 séries d'expérience sont présentés sur les figures 3, 4, et 5. Le tableau 1 rassemble les équations des modèles ajustés aux différentes courbes et les valeurs de V_m et de K_s correspondantes.

3.1. Ammonium

Aux deux températures testées, l'absorption de ce nutriment résulte à la fois d'un mécanisme actif et d'un processus diffusif. Ce phénomène est couramment observé dans le cas de l'ammonium, notamment chez *Gracilaria tikvahiae* et *Agardhiella subulata* (D'Elia et DeBoer, 1978; Friedlander et Dawes, 1985). Si l'on retire cette composante diffusive, l'ajustement des courbes permet de calculer des valeurs de V_m très semblables à 10°C (44,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) et à 20°C (46,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Ce phénomène peut être interprété de deux façons. Il est possible, comme d'autres auteurs l'ont mis en évidence, que l'absorption de l'ammonium par la Gracilaire ne soit pas un phénomène dépendant de la température. Néanmoins, le fait que les algues testées à 20°C aient un contenu en azote plus élevé que les Gracilaires testées à 10°C peut expliquer ce phénomène. En effet, il a été démontré chez une autre espèce de Gracilaire (*Gracilaria foliifera*) que la vitesse d'absorption de l'ammonium est inversement proportionnelle au rapport C/N du thalle (D'Elia et DeBoer, 1978). Dans le cas de nos deux expériences, l'effet physique de

NO₃ - 10°C

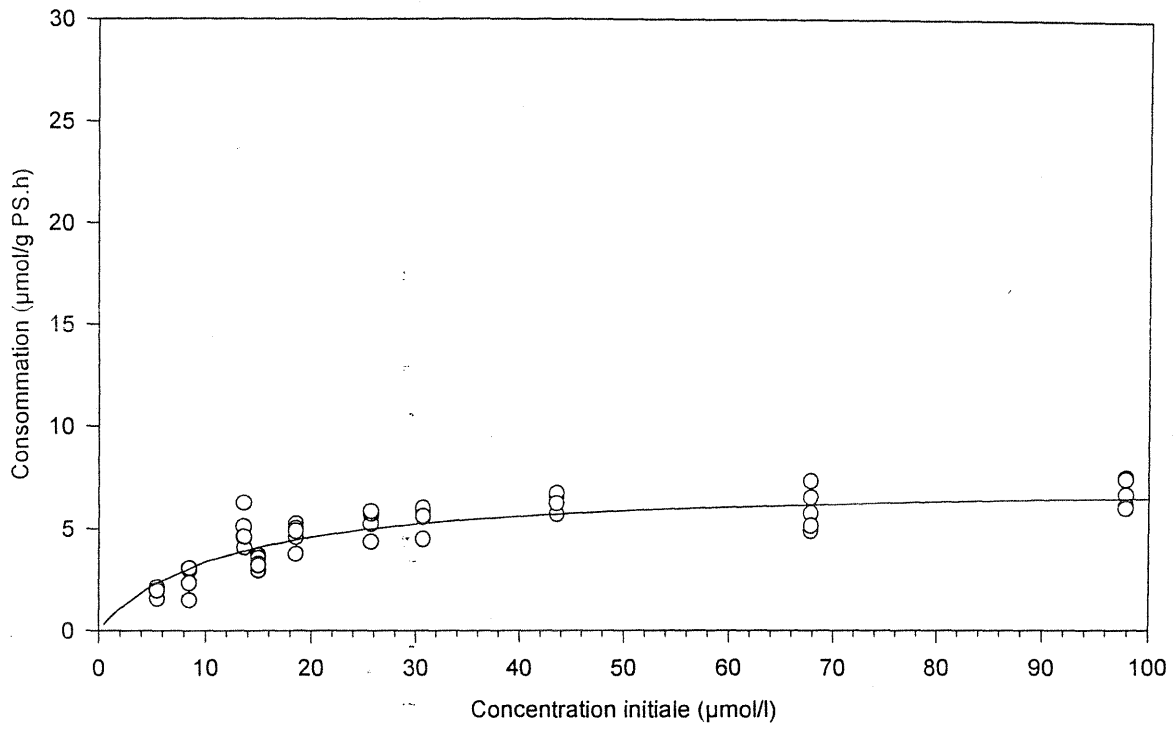


Figure 4a : Cinétique d'absorption du nitrate à 10°C.

NO₃ - 20°C

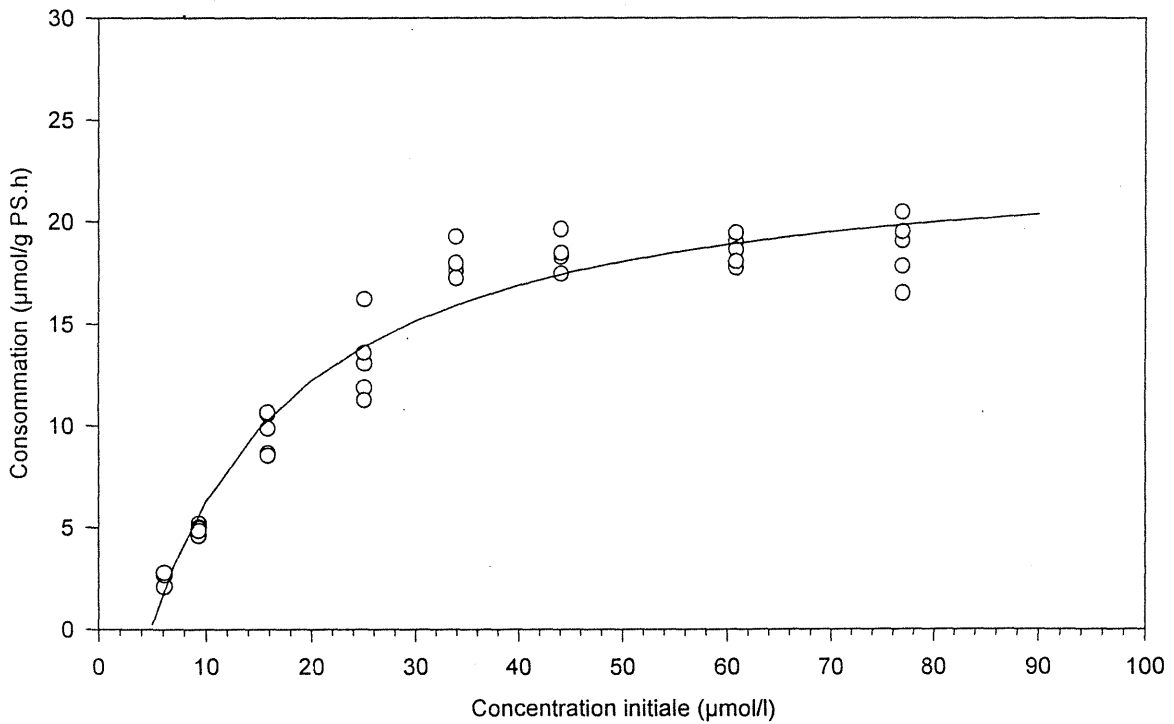


Figure 4b : Cinétique d'absorption du nitrate à 20°C.

l'accroissement de la température (augmentant l'absorption) serait alors contré par l'effet biologique de l'élévation des réserves en azote (diminuant l'absorption).

Ces valeurs de V_m sont élevées en comparaison de ce qui a été mesuré chez d'autres espèces de Gracilaires : 2,5 à 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour *Gracilaria pacifica* (Thomas et al, 1987), 9,7 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pour *Gracilaria foliifera* (D'Elia et DeBoer, 1978). Néanmoins, ces vitesses maximales sont plutôt faibles par rapport à celles qui ont été mesurées chez des algues de même type morphologique (tableau 2).

L'affinité de *Gracilaria* pour l'ammonium diminue lorsque la température augmente, le K_s passant de 33 μMol à 10°C à 93 μM à 20°C. Ces valeurs sont très fortes par rapport à celles qui sont rapportées chez d'autres Gracilaires et chez les algues de morphologie semblable.

3.2. Nitrate

L'interprétation des courbes d'absorption du nitrate ne présente pas de difficultés. Les données s'alignent parfaitement sur le modèle des cinétiques enzymatiques, avec un plateau de saturation bien marqué aux concentrations les plus élevées. Quoique ce type de cinétique soit courant dans le cas du nitrate (DeBoer, 1981), certains auteurs ont observé un accroissement linéaire de la vitesse d'absorption en fonction de l'augmentation des concentrations, notamment chez une autre espèce de Gracilaire, *Gracilaria pacifica* (Thomas et al, 1987), et chez des algues qui se développent également dans les étangs littoraux : *Chaetomorpha linum* et *Ulva rigida* (Lavery et McComb, 1991).

La vitesse maximale d'absorption est multipliée environ par 3 entre 10°C (7,2 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) et 20°C (23,8 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Ces valeurs sont comprises dans la gamme de ce qui est observé chez les algues de même type morphologique (Tableau 2). Néanmoins, ces vitesses sont plus élevées que celles qui ont été mesurées chez d'autres espèces de *Gracilaria* : 2,5 à 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ chez *G. pacifica* (Thomas et al., 1987) et 9,7 $\mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ chez *G. foliifera* (D'Elia et DeBoer, 1978).

Le K_s présente peu de variations entre 10°C (11,3 μMol) et 20°C (14,3 μMol). La valeur de ce paramètre est élevée par rapport à ce qui a été mesuré chez les algues de ce type, y compris les autres espèces de Gracilaires, traduisant la faible affinité des *G. verrucosa* du Méjean pour le nitrate.

$\text{PO}_4 - 10^\circ\text{C}$

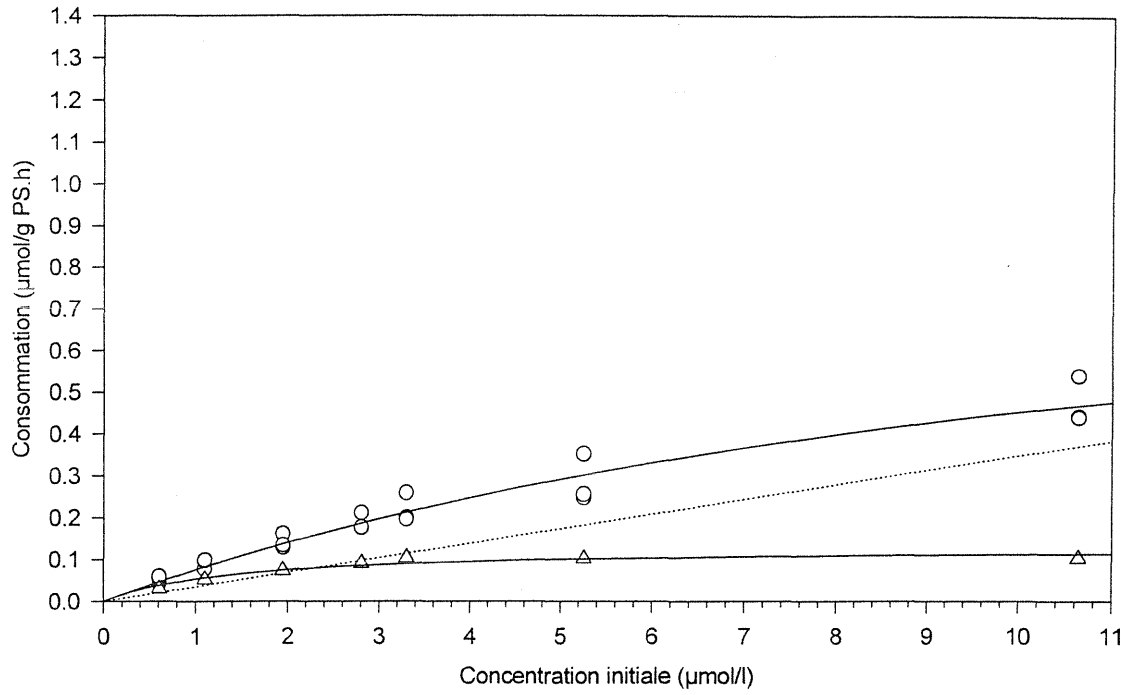


Figure 5a : Cinétique d'absorption du phosphate à 10°C .

$\text{PO}_4 - 20^\circ\text{C}$

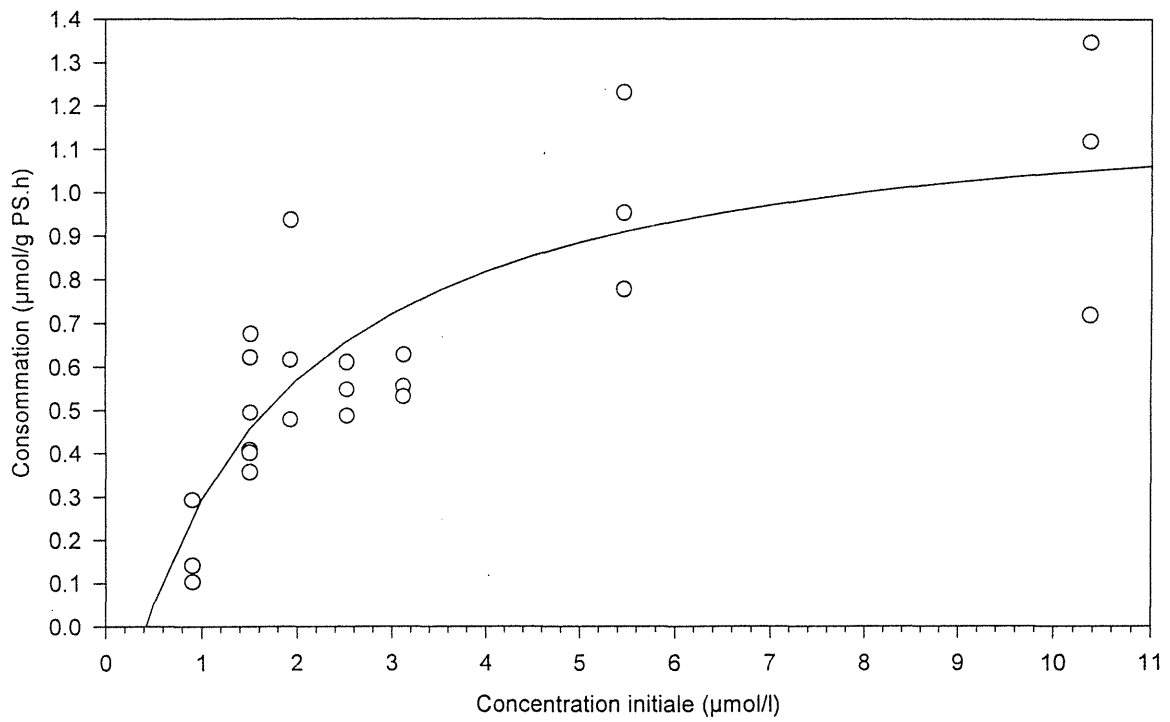


Figure 5b : Cinétique d'absorption du phosphate à 20°C .

3.3. Phosphate

A 10°C, la vitesse d'absorption du phosphate ne présente pas de plateau pour les concentrations les plus fortes. Un tel phénomène a déjà été mis en évidence chez une autre Gracilaire, *Gracilaria tikvahiae* (Friedlander et Dawes, 1985). Par ailleurs, chez les Ulves provenant du même type de biotope, Fillit et Ximenes (publication soumise) ont observé une relation linéaire entre la concentration en phosphate du milieu d'incubation et la vitesse d'absorption de ce nutriment. Selon ces auteurs, différents types de mécanismes seraient impliqués dans l'absorption, de type actif à de faibles concentrations et diffusif pour les teneurs élevées.

En admettant que ces deux types de mécanismes interviennent dans le cas de notre mesure de l'absorption du phosphate à 10°C, une fois retirée la composante diffusive, on obtient une vitesse maximale d'absorption faible ($0,13 \mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), qui correspond environ au dixième de la V_m mesurée à 20°C ($1,25 \mu\text{mol} \cdot \text{g PS}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$). Ces vitesses d'absorption sont faibles en comparaison de ce qui est mesuré chez des algues de même type morphologique (tableau 2).

Comme dans le cas du nitrate, le K_s augmente légèrement entre les deux températures ($1,4 \mu\text{Mol}$ à 10°C, $1,9 \mu\text{Mol}$ à 20°C), valeurs relativement élevées par rapport à celles qui sont synthétisées dans le tableau 2.

En ce qui concerne le nitrate et le phosphate, il est probable que la relativement forte augmentation du V_m entre les expériences 10°C et 20°C (supérieure au $Q_{10} = 2$ auquel on pourrait s'attendre) soit due aux effets conjugués de l'augmentation de température et de la diminution des stocks internes en N et P.

Bibliographie

Aminot A., Chaussepied M. (1983). Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO BNDO/Communication, Brest, 395 pp.

D'Elia C.F., DeBoer, J.A. (1978). Nutritional studies on two red algae. II. Kinetics of ammonium and nitrate uptake. *J. Phycol.*, **14**, 266-272.

DeBoer J.A. (1981). Nutrients. In C.S. Lobban & M.J. Wynne (eds.). *The Biology of Seaweeds*. Oxford, Blackwell Scientific, 356-391.

Fillit M., Ximenes M.C. (1995). Seasonal changes in the nitrogen (N-NO₃) and phosphorus (P-PO₄), absorption kinetics of *Ulva rigida* (Chlorophyta) in hypertrophic coastal lagoons. (submitted).

Friedlander M., Dawes C.J. (1985). In situ uptake kinetics of ammonium and phosphate and chemical composition of the red seaweed *Gracilaria tikvahiae*. *J. Phycol.*, **21**, 448-453.

Harrison P.J., Druehl L.D., Lloyd K.E., Thompson P.A. (1986). Nitrogen uptake kinetics in three year-classes of *Laminaria groenlandica* (Laminariales : Phaeophyta). *Mar. Biol.*, **93**, 29-35.

Koroleff, F. (1976). Determination of Ammonia. In K. Grasshoff (ed.) *Method of seawater analysis*, Springer-Verlag Chemis, Weinheim, 126-133.

Lavery P.S., Mc Comb A.J. (1991). The nutritional eco-physiology of *Chaetomorpha linum* and *Ulva rigida* in Peel Inlet, Western Australia. *Bot. mar.*, **34**, 251-260.

Murphy J., Riley, J.P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **24**, 31-36.

Thomas T.E., Harrison P.J., Turpin D.E. (1987). Adaptations of *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) to nitrogen procurement at different intertidal locations. *Mar. Biol.*, **93**, 569-580.

Wallentinus I. (1984). Comparison of nutrient uptake rates for Baltic macroalgae with different thallus morphologies. *Mar. Biol.*, **80**, 215-225.