

## DETERMINATION EXPERIMENTALE DES PARAMETRES LIES A L'ASSIMILATION DE L'AZOTE ET DU PHOSPHORE PAR SCENEDESMUS CRASSUS

par A. DAUTA<sup>1</sup>, L. BRUNEL<sup>1</sup> et M. M. GUERRI<sup>1</sup>

Les vitesses d'assimilation du phosphore et de l'azote sont exprimées par une équation de type Michaelis-Menten, et pondérée par une fonction de contrôle exercée par les réserves cellulaires internes. Pour chacun des deux nutriments, ont été déterminés : vitesse maximale d'assimilation ( $V_m$ ), constante de demi-saturation ( $K_s$ ), les quotas cellulaires minimum et maximum. L'interaction de la température a été déterminée pour  $V_m$  et  $K_s$ .

### Experimental determination of the parameters related to nitrogen and phosphorus assimilation by *Scenedesmus crassus*.

The kinetics of phosphorus and nitrogen uptake are well described by Michaelis-Menten hyperbolas, which are controlled by a feed-back fonction of the internal quotas of *Scenedesmus* cells. The related parameters have been evaluated for each nutrient. The dependance of maximum uptake rate and  $K_s$  on temperature has been determined.

## 1. — INTRODUCTION

Le contrôle du taux de croissance du phytoplancton, par les concentrations limitantes en nutriments, est un élément clé dans les écosystèmes aquatiques. Cependant, la corrélation entre une concentration en nutriment et le taux de croissance du phytoplancton qui lui est associé peut être trompeuse et parfois contradictoire (observation de la croissance d'une population en l'absence d'un nutriment dans le milieu). On a longtemps admis que la croissance des algues en fonction des nutriments suivait une équation de type Monod (1949), liant la croissance à la concentration de l'élément limitant par une fonction hyperbolique. Cependant, cette équation est inapte à restituer le rôle du stockage interne des nutriments par les algues (état nutritionnel) vis-à-vis de la vitesse d'assimilation (Caperon 1967, Droop 1974, Lehman 1975), induisant une variabilité de la vitesse maximale d'assimilation ( $V_m$ ). Enfin, de nombreux auteurs (Caperon et Meyer 1972,

---

1. Laboratoire d'Hydrobiologie, ERA 702 du CNRS, Université Paul Sabatier, 118, route Narbonne, 31062 Toulouse Cedex.

Lheman 1975, Droop 1973, 1974, 1977, Rhee 1973, 1974) ont démontré la nécessité de dissocier assimilation, stockage et croissance. Cette dernière devient alors une fonction des réserves cellulaires de la forme :  $\mu = \mu_m (I, \Theta) \cdot (Q - Q_0)/Q$  lorsqu'un seul nutriment est limitant (avec  $\mu_m$  : taux de croissance maximal sous les conditions de température  $\Theta$  et lumière  $I$ ,  $Q$  : quota cellulaire à l'instant  $t$ , et  $Q_0$  : le quota minimal).

L'influence de la lumière et de la température sur le taux de croissance de *Scenedesmus crassus* ayant été étudiée en l'absence de limitation par les nutriments (Guerrri et al. 1981), ce travail présente :

— la détermination des limites inférieures et supérieures des capacités de stockage cellulaire ( $Q_m$  = quota maximal,  $Q_0$  = quota minimal)

— les cinétiques d'assimilation des éléments nutritifs, en fonction des concentrations externes et de l'état nutritionnel des cellules et relatives à l'azote et au phosphore.

## 2. — MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Formulation

L'assimilation d'un nutriment est exprimée selon :

— une fonction du substrat externe  $S$ , définie par une fonction hyperbolique de type Michaelis-Menten (1)

— une fonction de contrôle par les stocks internes, rendant compte du fait que les cellules sont aptes à stocker les éléments nutritifs, en excès par rapport à leurs besoins métaboliques immédiats (2).

Ceci est résumé par une équation proposée par Lheman et al. (1975) :

$$V_j = \underbrace{[(V_{m,j} \times S_j)/(K_j + S_j)]}_{(1)} \times \underbrace{[(Q_{m,j} - Q_j)/(Q_{m,j} - Q_{0,j})]}_{(2)} \quad (A)$$

avec  $j$  = azote ou phosphore,

$V_j$  = vitesse d'assimilation d'un nutriment  $j$ ,

$V_m$  = vitesse maximale d'assimilation d'un nutriment  $j$ , caractéristique de l'algue

$S_j$  = concentration externe en nutriment  $j$ ,

$K_j$  = constante de demi-saturation, valeur du nutriment externe  $S_j$  pour laquelle  $V_j = 1/2 V_{m,j}$ .

$Q_j$  = stock interne ou quota cellulaire, variant entre deux états limites :  $Q_{0,j}$  = stock minimal, la croissance devient nulle et  $V_j$  tend  $V_{m,j}$ .

$Q_{m,j}$  = stock maximal possible, lorsque la cellule dispose du nutriment en quantité illimitée.

## 2.2. Mode de culture

Les nutriments considérés sont l'azote N-NO<sub>3</sub>, apporté sous forme de KNO<sub>3</sub>, et le phosphore P-PO<sub>4</sub>, apporté sous forme de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Les cultures en batch sont effectuées avec des combinaisons de température et de lumière variant respectivement de 15 à 35 °C, et de 0 à 80 KLux.

## 2.3. Détermination des paramètres

La densité des cellules est évaluée par la densité optique (Brunel et Guerri 1980), à 678 nm. La détermination des quotas cellulaires  $Q_0$  et  $Q_{max}$  est réalisée selon un protocole original (exemple fig. 1 : cas de l'azote, et fig. 2 : cas du phosphore). A  $t = \emptyset$ , les algues provenant d'une culture en phase de croissance exponentielle dans un milieu riche en nutriments, sont récupérées par filtration, rincées, et placées dans un milieu exempt du nutriment étudié. Lorsque le taux de croissance devient nul ( $t_1$ ), une quantité connue de nutriment est rajoutée à la culture dont la croissance reprend et s'arrête de nouveau à  $t_2$ . Si l'on exprime par  $A\emptyset$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ , respectivement le nombre de cellules à  $t\emptyset$ ,  $t_1$  et  $t_2$ , et par  $S$  la quantité de nutriment rajoutée, on peut globalement décrire les stades successifs de l'expérience, par les relations :  $A\emptyset \times Q_m = A_1 \times Q_0$  et  $(A_1 \times Q_0) + S = A_2 \times Q_0$ . On déduit alors  $Q_0 = S/(A_2 - A_1)$ , puis  $Q_m = Q_0 \times A_1/A\emptyset$ .

L'assimilation de l'azote et du phosphore a été mesurée sur des cultures de *Sc. crassus* préalablement soumises à un jeûne en N (milieu + P - N) et en P (milieu + N - P). Lorsque ces milieux sontensemencés avec un inoculum provenant d'une culture en phase exponentielle (milieu + P + N), la croissance cesse pratiquement au bout de 5 jours dans le milieu carencé en N, au bout de 20 jours dans le milieu carencé en P ( $T \text{ } ^\circ\text{C} = 25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ,  $I = 5 \text{ Klux}$ ). On peut considérer alors que le stock cellulaire interne est égal au stock minimum ( $Q = Q_0$ ) et que l'équation (A) se ramène à son premier terme. Ces cultures sont alors enrichies en NO<sub>3</sub>-N ou en (PO<sub>4</sub>-P + <sup>32</sup>PO<sub>4</sub>-P). La consommation de l'élément nutritif est contrôlée au bout de 5 à 10 minutes, suivie par dosage du NO<sub>3</sub>-N restant dans le milieu dans le premier cas, par mesure en scintillation liquide du <sup>32</sup>P assimilé par les algues dans le second cas.

## 3. — RESULTATS

Les figures 1 et 2 représentent l'évolution de la population utilisée pour la détermination respective des stocks internes en azote et en phosphore. Nous avons établi que l'intensité lumineuse et la température, qui agissent sur le taux de croissance des cultures, et par

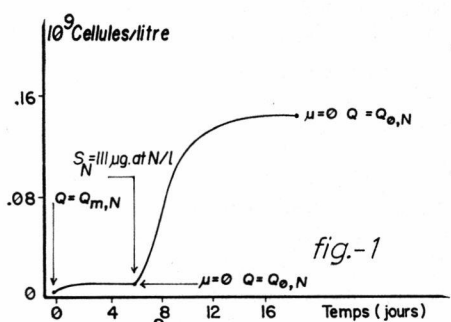


fig.-1

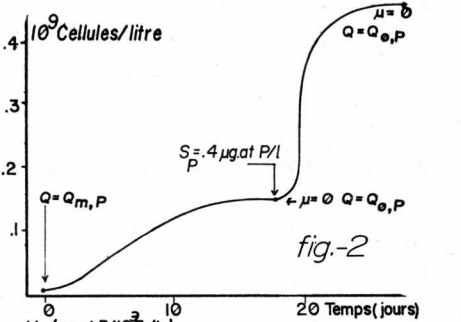


fig.-2

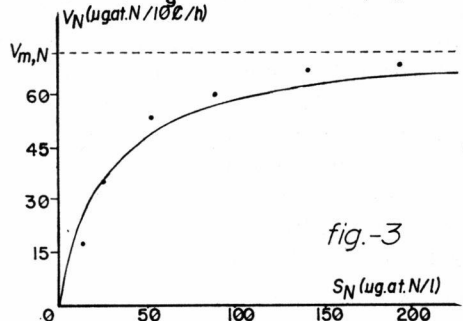


fig.-3

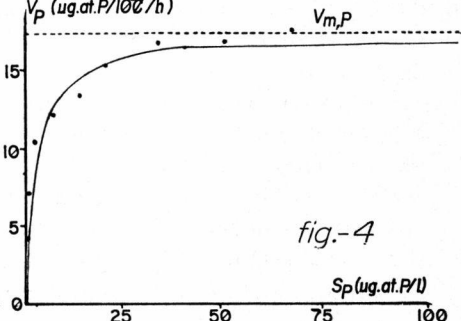


fig.-4

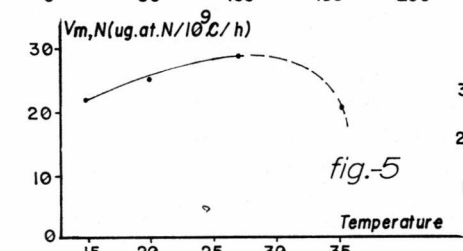


fig.-5

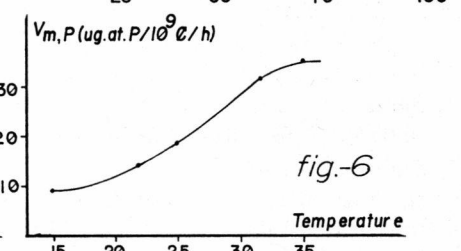


fig.-6

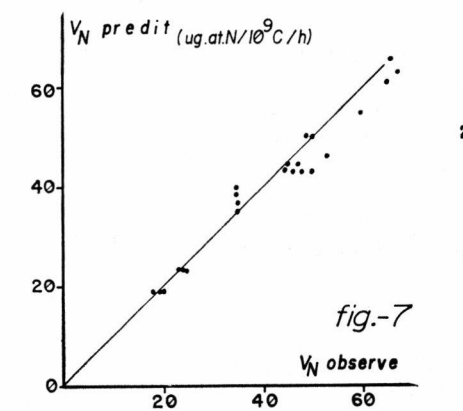


fig.-7

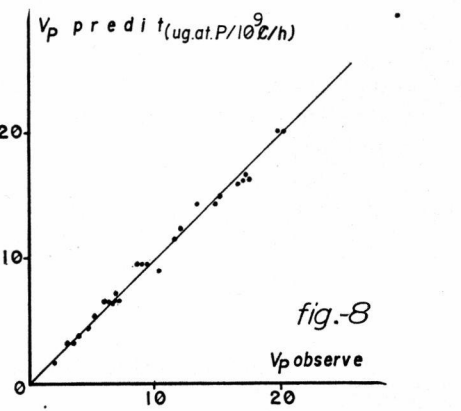


fig.-8

FIG. 1. — Suivi de la population A et variation des stocks internes en azote. Phosphore non limitant.

FIG. 2. — Suivi de la population A et variation des stocks internes en phosphore. Azote non limitant.

FIG. 3. — Vitesses initiales d'assimilation de l'azote :  $V_N$ , en fonction du substrat externe initial :  $S_N$ . Points expérimentaux et courbe ajustée.

FIG. 4. — Vitesses initiales d'assimilation du phosphore :  $V_P$ , en fonction du substrat externe initial :  $S_P$ . Points expérimentaux et courbe ajustée.

FIG. 5. —  $V_{m,N}$  pour différentes températures.

FIG. 6. —  $V_{m,P}$  pour différentes températures.

FIG. 7. — Vitesse d'assimilation de l'azote :  $V_{m,N}$ , prédite en fonction du  $V_{m,N}$  observé.

FIG. 8. — Vitesse d'assimilation du phosphore :  $V_{m,P}$ , prédite en fonction du  $V_{m,P}$  observé.

suite sur l'étalement des courbes dans le temps, n'affectent pas la valeur des ordonnées, et n'influencent donc pas les valeurs de  $Q_0$  et  $Q_m$  ainsi estimées. Les résultats (Tableau I) indiquent que le rapport  $Q_0/Q_m$  est d'environ de 3 pour l'azote, et de 7 pour le phosphore. Ces valeurs sont du même ordre que celles trouvées dans la littérature (Tableau II).

TABLEAU I. — Valeurs des paramètres relatifs à l'assimilation de l'azote et du phosphore, chez *Scenedesmus crassus*.

AZOTE	$Q_0N = 110 \mu\text{g-at N}/10^9 \text{ Cell.}$
	$Q_mN = 380 \mu\text{g-at N}/10^9 \text{ Cell.}$
	$V_mN(\theta) = 1,43.\theta \times 32,14 \mu\text{g-at N}/10^9 \text{ Cell./heure (pour } 15 \leq \theta \leq 27 \text{ }^\circ\text{C)}$
	$K N(\theta) = 0,2.\theta^2 - 11,36.\theta + 186,836 \mu\text{g-at N/litre (pour } 15 \leq \theta \leq 27 \text{ }^\circ\text{C)}$
PHOSPHORE	$Q_0P = 1,2 \mu\text{g-at P}/10^9 \text{ Cell.}$
	$Q_mP = 8 \mu\text{g-at P}/10^9 \text{ Cell.}$
	$V_mP(\theta) = 0,087.\theta^2 - 2,54.\theta + 26,08 \mu\text{g-at P}/10^9 \text{ Cell./heure (pour } 15 \leq \theta \leq 31 \text{ }^\circ\text{C)}$
	$K P(\theta) = 0,003.\theta^2 + 0,0021.\theta + 0,293 \mu\text{g-at P/litre pour } 15 \leq \theta \leq 31 \text{ }^\circ\text{C)}$

Les vitesses d'assimilation de l'azote et du phosphore, pour différentes concentrations initiales externes de ces éléments ont été ajustées par linéarisation à l'équation de Michaelis-Menten (fig. 3 et 4). Les expériences réalisées à différentes intensités lumineuses n'ont pas permis de déceler de différences significatives. Par contre, la vitesse d'assimilation varie avec la température selon les courbes représentées aux figures 5 et 6. L'ajustement des résultats expérimentaux à une équation empirique du type polynome a été réalisée par la méthode

TABLEAU II. — Valeurs des quotas cellulaires maximaux et minimaux d'azote et de phosphore, pour différentes espèces.

	$Q_0$ μg-at/10 <sup>9</sup> Cell.	$Q_m$ μg-at/10 <sup>9</sup> Cell.	Algues	Références bibliographiques
P	2		<i>Asterionella formosa</i>	Mackereth 1953
	1,5-3		<i>Asterionella formosa</i>	Muller 1972
	1,5		<i>Asterionella japonica</i>	Muller 1972
	0,9		<i>Cyclotella nana</i>	Fuhs 1969
	3		<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Muller 1972
	4,5		<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Muller 1972
	1,7		<i>Scenedesmus</i> sp.	Rhee 1973
	1,2	8	<i>Scenedesmus crassus</i>	Delclaux-Guerri 1980
	1,1	6,5	<i>Selenastrum</i>	Brown et Harris 1978
	3,5	330	<i>Cryptomonas</i>	Cloern 1976
N	33-29		<i>Isochrysis galbana</i>	Caperon 1968
	30		<i>Isochrysis galbana</i>	Droop 1973
	20		<i>Isochrysis galbana</i>	Grenney-Bella 1978
	110	380	<i>Scenedesmus crassus</i>	Delclaux-Guerri 1980
	46		<i>Scenedesmus</i> sp.	Rhee 1978
	600		<i>Asterionella formosa</i>	Grim 1939
	100		<i>Anabaena</i>	Grim 1939
360	2 200	<i>Cryptomonas</i>	Cloern 1976	

des moindres carrés. Le tableau I résume l'ensemble des résultats sur l'évaluation des constantes relatives à l'assimilation du phosphore et de l'azote. Ceux-ci permettent de définir une vitesse d'assimilation en fonction du substrat externe et des réserves internes, et donnent la résolution de l'équation générale (A).

Les figures 7 et 8 comparent les valeurs des taux d'assimilation d'azote et de phosphore mesurés sur des cultures d'algues (sous différentes températures, concentrations externes diverses en éléments dissous, stocks cellulaires variables) aux valeurs prédites par la résolution de l'équation (A) à l'aide des constantes du tableau I. La valeur prédictive est excellente pour le phosphore, assez satisfaisante pour l'azote, ce qui souligne la bonne adéquation du système proposé aux phénomènes biologiques étudiés.

#### 4. — CONCLUSION

La méthode originale et relativement simple que nous avons développée pour la détermination du  $Q_0$  et  $Q_m$ , donne des résultats reproductibles. Les algues ayant subi un jeûne prolongé en nutriment paraissent relativement peu affectées, puisque leur croissance reprend aussitôt après un ajout en éléments nutritifs. La carence en azote est cependant beaucoup plus sévèrement ressentie par les algues, entraînant

vraisemblablement de forts désordres physiologiques. Une carence trop prolongée affecte les teneurs en pigments qui deviennent très basses tandis que le temps de réponse de l'algue à l'ajout d'un nutriment est notablement allongé. Ceci perturbe quelque peu la prise de données pour la détermination de la vitesse maximale d'assimilation : ce fait est traduit par les figures 7 et 8, où la valeur prédictive pour l'azote est moins bonne que pour le phosphore.

Le quota cellulaire minimal,  $Q_m$ , semble d'après nos expériences, indépendant des conditions de lumière et de température, tout comme  $Q_m$  ; ces deux paramètres représentent donc bien des constantes de l'algue. Le quota minimal en phosphore,  $Q_{mP}$ , est bien inférieur au  $Q_{mN}$ , ce qui est en accord avec les rapports moyens N/P de la matière vivante. Ces résultats confirment le fait, déjà souligné par Caperon et Meyer (1972), que les cellules sont capables d'absorber une forte dose de nutriments en un temps bref, sans répercussion immédiate sur le taux de croissance. Inversement, la possibilité de stockage des éléments nutritifs par les algues planctoniques permet d'expliquer des développements d'algues dans un milieu où un nutriment peut temporairement venir à manquer (fig. 1 et 2). D'autre part, si l'on considère les quantités d'azote et de phosphore minéral dissous dans les eaux naturelles, leur analyse ne donne que peu d'indications sur les potentialités de croissance du phytoplancton.

Enfin, les résultats expérimentaux montrent que l'épuisement du stock en un élément nutritif, conditionne l'assimilation des autres éléments : ainsi, une déficience en azote réduit l'assimilation du phosphore (Brunel et Guerri 1980). La qualité de l'interaction des nutriments sur leur assimilation, et par-delà sur le taux de croissance, reste encore à définir clairement.

#### TRAVAUX CITÉS

- BROWN (E. J.), HARRIS (R. F.). 1978. — Kinetics of algal transient phosphate uptake and then cell quota concept. *Limnol. Oceanogr.*, 23 (1) : 35-40.
- BRUNEL-DELCLAUX (L.) et GUERRI (M. M.). 1980. — Cinétiques d'assimilation et de croissance de *Scenedesmus crassus*. Etude expérimentale et modélisation. Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Toulouse : 226 p.
- CAPERON (J.). 1967. — Population growth in micro-organisms limited by food supply. *Ecology*, 48 : 715-722. In CAPERON et al. 1972.
- CAPERON (J.) et MEYER (J.). 1972. — Nitrogen-limited growth of marine phytoplankton. II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. *Deep-Sea Research*, 19 : 619-632.
- CLOERN (J. E.). 1976. — Population dynamics of *Cryptomonas ovata*. A laboratory field and computer simulation study. These P.H.D. Washington State University. Department of Zoology : 102 p.
- DROOP (M. R.). 1973. — Some thoughts of nutrient limitation in algae. *J. Phycol.*, 9 (3) : 264-272.

- DROOP (M. R.). 1974. — The nutrient status of algal cells in continuous culture. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 54 : 825-855.
- DROOP (M. R.). 1977. — An approach to quantitative nutrition of phytoplankton. *J. Protozool.*, 24 (4) : 528-532.
- FUHS (G. W.). 1969. — Phosphorus content and rate of growth in the diatoms. *Cyclotella nana* and *Thalassiosira fluviatilis*. *J. phycol.*, 5 : 312-321.
- GREENEY (W. J.), BELLA (D. A.), CURL (H. C.). 1973. — A mathematical model of the nutrient dynamics of phytoplankton in a nitrate-limited environment. *Bio-technol. Bioeng.*, 15 (2) : 331-358.
- GRIM (J.). 1939. — Beobachtung am phytoplankton des Bodensees (Obersees) sowie deren rechnerische Auswertung. *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol.*, 39 : 193-315.
- GUERRI (M. M.), BRUNEL (L.) et DAUTA (A.). 1981. — Interaction de la lumière et de la température sur le taux de croissance de *Scenedesmus crassus*. *Annls. Limnol.*, 17 (2) : 97-104.
- LEHMAN (J. T.), BOTKIN (D. B.) et LIKENS (G. E.). 1975. — The assumptions and rationales of a computer model et phytoplankton population dynamics. *Limnol. Oceanogr.*, 20 (3) : 343-364.
- MACKERETH (F. J.). 1953. — Phosphorus utilization by *Asterionella formosa*. *J. Exp. Bot.*, 4 : 296-313.
- MONOD (J.). 1949. — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann & C<sup>o</sup>, Paris, 2nd edn., 1958, 210 p., in MAC ISAAC (J. J.) et al., 1969.
- MULLER (H. von). 1972. — Wachstum und Phosphat-bedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemn.) V. GOOR. in statischer und homokontinuierlicher Kultur unter Phosphat-limitierung. *Arch. Hydrobiol.*, Suppl. 38 : 399-484.
- RHEE (G. Y.). 1973. — A continuous culture study of phosphate uptake, growth rate and polyphosphate in *Scenedesmus* sp. *J. Phycol.*, 9 : 495-506.
- RHEE (G. Y.). 1974. — Phosphate under nitrate limitation by *Scenedesmus* sp. and its ecological implications. *J. Phycol.*, 10 : 470-475.