

Variations nycthémerales de l'activité phosphatase alcaline d'une Diatomée : *Synedra capitata* et de deux Cyanobactéries : *Microcystis aeruginosa* et *Aphanizomenon flos aquae*

H. Giraudet¹
D. Abrial¹
J.-L. Berthon¹
B. Buisson¹

Mots-clés : Activité phosphatase alcaline, Cyanobactéries, Diatomée, périodicité nycthémerale.

L'activité phosphatase alcaline (APA) (EC: 3.1.3.1) de 3 peuplements quasi monospécifiques dominés successivement par *Synedra capitata* (Diatomée), *Microcystis aeruginosa* et *Aphanizomenon flos aquae* (Cyanobactéries) présente une périodicité nycthémerale avec des caractéristiques propres à l'espèce. Dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, l'APA moyenne de *Microcystis aeruginosa* est 32 fois plus importante (par unité de biomasse) que celle de *Synedra capitata* et 3 fois plus élevée que l'activité phosphatasique d'*Aphanizomenon flos aquae*. En conditions LD (16 : 8), l'activité enzymatique de *Synedra capitata* et d'*Aphanizomenon flos aquae* atteint des valeurs maximales durant le jour (de l'ordre de 425 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ à 5 h, 11 h et 17 h pour la Diatomée et d'environ 850 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ à 11 h, 15 h et 19 h pour la Cyanobactérie) alors que celle de *Microcystis aeruginosa* est maximale au début de la nuit (de l'ordre de 1500 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ à 21 h). Enfin, les activités enzymatiques moyennes de *Synedra* et d'*Aphanizomenon* sont maximales quand ces espèces se trouvent en obscurité permanente et minimales en éclairage permanent. Les résultats inverses s'observent avec *Microcystis aeruginosa*. Les espèces phytoplanctoniques sont donc inégales dans leur aptitude à transformer le phosphore organique en orthophosphate grâce aux phosphatases. Cette différence de comportement enzymatique pourrait représenter un critère explicatif supplémentaire des successions écologiques observées au sein des communautés phytoplanctoniques.

Nycthemeral variation of the alkaline phosphatase activity of a Diatom : *Synedra capitata* and two Cyanobacteria : *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos aquae*

Keywords : Alkaline phosphatase activity, Cyanobacteria, Diatom, nycthemeral variation.

The results we present here were on three quasi monospecific settlements : *Synedra capitata* (Diatom), *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos aquae* (Cyanobacteria). The alkaline phosphatase activity (APA) (EC : 3.1.3.1) exhibited a nycthemeral variation for Diatoms as well as Cyanobacteria, though every species had its own characteristic. Under similar experimental conditions, the enzymatic activity was, in the average, 32 times higher (per unit of biomass) for *Microcystis aeruginosa* than for *Synedra capitata* and 3 times higher for *Microcystis aeruginosa* than for *Aphanizomenon flos aquae*. Under LD (16 : 8), *Synedra capitata* and *Aphanizomenon flos aquae* had a maximal enzymatic activity during the day time (maximal APA around 425 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ at 5 a.m., 11 a.m. and 5 p.m. for the Diatom and around 850 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ at 11 a.m., 3 p.m. and 7 p.m. for the Cyanobacteria) while the enzymatic activity of *Microcystis aeruginosa* was maximal at the beginning of the night time (maximal APA around 1500 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ at 9 p.m.). The observed daily rhythm disappeared when the samples were placed in the darkness (DD) or under permanent light (LL). In the last case (LL), the mean enzymatic activity of *Microcystis aeruginosa* was maximal and, on the contrary, the mean APA of both *Synedra capitata* and *Aphanizomenon flos aquae* was minimal. There was a difference between the phytoplanktonic species in the orthophosphate assimilation and in the capacity for mineralizing organic phosphorus because of the phosphatases. This difference in the enzymatic behaviour might explain ecological successions within the planktonic settlements.

1. Laboratoire de Biologie Animale et Appliquée, Université J. Monnet, 23 rue du Dr P. Michelon, F-42023 Saint-Etienne Cedex 2, France.

1. Introduction

L'implication du phosphore dans la prolifération phytoplanctonique en milieu lacustre a été démontrée depuis déjà quelques décennies (Lee 1976, Vollenweider 1981, Dodds 1993...).

L'ion orthophosphate est la seule forme de phosphore directement assimilable par le phytoplancton. Dans le cas d'une privation du milieu en phosphore minéral, de nombreuses espèces phytoplanctoniques peuvent assimiler une partie du phosphore organique dissous grâce à l'action d'enzymes spécifiques découvertes en 1938 par Steiner : les phosphatases.

Le terme "phosphatases" est couramment utilisé pour décrire les enzymes qui hydrolysent les esters et les anhydrides de l'acide phosphorique, autrement dit est synonyme de phosphomonoestérases et phosphomonoesterhydrolases (EC: 3.1.3.1) (Feder 1973). Les phosphatases sont subdivisées en 2 groupes suivant leur pH optimal de fonctionnement (Jansson et al. 1988). Les phosphatases alcalines (pH optimal = 8,5), qui nous intéressent ici, peuvent être produites par des organismes zooplanctoniques (Wynne & Gophen 1981, Boavida et al. 1984 ...), phytoplanctoniques (Smith & Kalff 1981, Gage & Gorham 1985, Olsson 1990...) ou bactériens (Currie et al. 1986, Chrost & Overbeck 1987, Jamet et al. 1995...) afin d'utiliser une partie du phosphore organique dissous dans l'eau en le transformant en ions orthophosphates assimilables.

Cette série d'expériences s'inscrit dans le cadre d'une vaste étude pluridisciplinaire sur l'eutrophisation de la retenue de Grangent (Loire, France) et porte sur une éventuelle rythmicité de l'activité phosphatase alcaline (APA) des principales espèces dominant le peuplement phytoplanctonique.

2. Matériel et méthodes

2.1. Site d'étude

Mise en eau en 1957, la retenue de Grangent située sur le cours amont de la Loire (France) possède une capacité totale de 57,4 millions de m³. Elle s'étend sur 21 km entre Aurec-sur-Loire et la voûte du barrage située à 2 km en amont de Saint-Rambert-sur-Loire. Sa largeur maximale atteint 400 m pour une superficie de 365 hectares. La fonction principale de ce plan d'eau est la production d'électricité mais il joue également un rôle important dans l'irrigation de la plaine du Forez via un canal. Dès la fin des années 70, le caractère eutrophe de cette retenue a été mis en évidence. Il est dû aux apports excessifs de phosphore par les affluents, entraînant la formation de fleurs d'eau à *Microcystis*

aeruginosa. La présence de Cyanobactéries montre un dysfonctionnement de la biocénose qui a abouti aujourd'hui à une hypereutrophisation de la retenue (Devaux 1993).

2.2. Stratégie d'échantillonnage

Lors de 3 campagnes de prélèvements sur une trentaine réalisée entre avril et fin octobre 1996, la communauté phytoplanctonique est apparue dominée, à hauteur d'au moins 95 %, par une seule espèce. Ces campagnes, qui se sont déroulées au printemps, au milieu de l'été et en fin d'été, nous ont donc semblé particulièrement intéressantes pour lancer des cycles d'études de l'évolution de l'activité phosphatase chez ces peuplements quasi monospécifiques.

C'est pourquoi, à ces 3 périodes, des volumes totaux de 100 litres d'eau concentrée en plancton (après collecte des organismes par 3 séries de traits horizontaux au filet de Juday d'environ 4 m³ d'eau) ont été prélevés à heure fixe (14 h), à une même profondeur (0,5 m) et en un même point de la retenue de Grangent (en face de l'ancien port de Saint-Victor-sur-Loire). L'eau prélevée a ensuite été préfiltrée sur filtre d'ouverture de maille 80 µm afin d'éliminer la plus grande partie du zooplancton.

2.3. Paramètres physico-chimiques

A partir de ce volume total d'eau, ont été mesurées :

- La teneur en oxygène dissous, le pourcentage de saturation en oxygène, la température et le pH avec une sonde multiparamètres modèle YSI-50B.

- La teneur en ions orthophosphates (P-PO₄³⁻) à partir de la formation d'un complexe entre l'ion PO₄³⁻, le molybdate d'ammonium et le tartrate double d'antimoine et de potassium qui se colore en présence d'acide ascorbique (Norme AFNOR NF T90. 023).

- La concentration en phosphore total après minéralisation par chauffage en présence de persulfate de sodium du phosphore associé aux molécules organiques. Le phosphore minéral libéré est ensuite dosé suivant la méthode normalisée décrite précédemment (Norme AFNOR NF T90. 023).

L'eau ainsi analysée est ensuite répartie au laboratoire dans 3 aquariums de 30 litres placés respectivement en conditions LD (16 : 8, les nuits étant programmées de 20 h à 4 h correspondant à la scotophase naturelle), en éclairage permanent (LL) et en obscurité permanente (DD) pendant une durée de 48 à 72 heures. L'éclairage et la climatisation des salles expérimentales sont programmés de façon à se rapprocher des intensités lumineuses et des conditions thermiques naturelles.

Les principaux paramètres biotiques, d'une part, et l'activité phosphatase alcaline, d'autre part, ont ensuite été mesurés à partir de prélèvements de 250 ml d'eau homogénéisée après agitation mécanique suivant un pas d'échantillonnage de 2 heures. Après chaque prélèvement, un volume équivalent de substrat (eau filtrée) a été rajouté dans chaque conteneur.

2.4. Paramètres biotiques

- La teneur en chlorophylle *a* de l'eau homogénéisée dans chaque aquarium est déterminée suivant la méthode spectrophotométrique de Lorenzen (1967).

- Le dénombrement des cellules algales a été effectué à l'aide d'un microscope inversé (Wild 40), suivant la méthode d'Utermöhl (1958) modifiée par Legendre & Watt (1972).

- Le dénombrement cellulaire des Cyanobactéries a été réalisé en fonction de la taille des colonies en se référant à la liste établie par Dussart (1966) après avoir vérifié que les dimensions des colonies cyanobactériennes récoltées dans la retenue de Grangent ne s'écartaient pas de celles rapportées dans la littérature.

- Les biomasses spécifiques ont été calculées suivant la méthode de Lohman (1908) qui revient à estimer le volume cellulaire de chaque espèce en ramenant celle-ci à une ou plusieurs formes géométriques de volume calculable. En supposant que la densité des algues planctoniques soit voisine de 1, il existe alors une relation directe entre le volume et la masse cellulaire : $10^6 \mu\text{m}^3 = 1 \mu\text{g}$.

2.5. Activité phosphatase alcaline

Chaque volume d'eau homogénéisée de 250 ml prélevé dans l'aquarium est filtré sur membrane en fibre de verre Whatman GF/D (de porosité 2,7 μm). Une étude comparée des techniques de broyage à billes, au tube de Dounce, par ultra-sons et manuellement, a montré que les 3 premières méthodes dégradent une partie importante des enzymes et nous a fait opter pour le broyage manuel. Le filtre est broyé avec une tige de

verre dans 6 ml de tampon Tris HCl (0,1M, pH=8,5), le tout dans la glace. Après broyage, les extraits sont soumis à une centrifugation de 15 minutes à 5000 g afin d'éliminer les fibres de verre.

L'APA est ensuite déterminée suivant la technique colorimétrique employant comme substrat chromogène 0,5 ml de para-nitrophényl phosphate (pNPP) à 1 mg/ml. Ce substrat est considéré comme le plus fiable et le plus couramment utilisé en Hydrobiologie (Lindhardt & Walter 1965, Berman 1970, Heath & Cooke 1975, Chrost et al. 1984, Hernandez et al. 1993..). Il permet de quantifier, après 6 heures d'incubation à 37°C, la phosphatase alcaline par mesure de l'absorbance des échantillons à une longueur d'onde égale à 410 nm.

3. Résultats

3.1. Paramètres physico-chimiques

L'ensemble des paramètres physico-chimiques demeurent relativement constants pendant toute la durée des expérimentations. Par exemple, les variations thermiques de l'eau dans les aquariums sont toujours inférieures à 1°C.

Les valeurs moyennes de l'ensemble des paramètres abiotiques ont été rassemblées dans le tableau 1. Ce tableau montre que les concentrations en P-PO_4^{3-} sont très différentes en fonction de la saison. Cette constatation rendra difficile l'interprétation des variations de l'APA mais le but de cette étude n'est pas de connaître les capacités de chaque population dans telle ou telle condition standard mais consiste plutôt à savoir si l'APA apparaît comme un réel facteur déterminant au moment où un peuplement atteint son développement maximum.

3.2. Paramètres biotiques

L'analyse qualitative des échantillons a révélé la présence d'un peuplement quasi monospécifique (> 95 % dans chaque échantillon) de *Synedra capitata* au prin-

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau prélevée au printemps, au milieu de l'été et à la fin de l'été.

Table 1. Changes in physical and chemical parameters of the sampled water collected during the spring, the middle and the end of summer.

Date	O ₂ (%)	O ₂ (mg/l)	T (°C)	pH	P-PO ₄ ³⁻ (mg/l)	P total (mg/l)
Printemps	125	16,4	4	7,7	0,016	0,2
Milieu été	86	6,6	19	7,6	< 0,003	0,1
Fin été	46	4,3	16,3	7,3	0,065	0,2

temps, de *Microcystis aeruginosa* au milieu de l'été et d'*Aphanizomenon flos aquae* en fin d'été.

Plus précisément, on dénombre au printemps $60 \cdot 10^6$ cellules de *Synedra capitata* par litre d'eau concentrée. Cette Diatomée est fréquemment rencontrée dans notre région et possède 2 pics de croissance : au printemps et à l'automne.

On compte au milieu de l'été 210 millions de cellules par litre d'eau concentrée de *Microcystis aeruginosa*, Cyanobactérie caractérisée par l'agglomération en colonies de cellules arrondies entourées d'un mucus de nature polysaccharidique.

Le nombre de cellules d'*Aphanizomenon flos aquae* s'élève à $420 \cdot 10^6$ par litre d'eau concentrée en fin d'été. Cette espèce cyanobactérienne est caractérisée par la présence de trichomes droits réunis le plus souvent en faisceaux. *Aphanizomenon flos aquae* possède également des cellules apicales allongées, incolores et vacuolisées (Bourrelly 1970).

La concentration en chlorophylle *a* est comprise entre 350 et 400 $\mu\text{g/l}$ pour *Synedra capitata*, entre 60 et 80 $\mu\text{g/l}$ pour *Microcystis aeruginosa* et entre 120 et 180 $\mu\text{g/l}$ pour *Aphanizomenon flos aquae*.

Ces deux techniques de détermination de la biomasse algale nous conduisent à dire que la biomasse cyanobactérienne (2,1 mg/l pour *Microcystis* et 4,2 mg/l pour *Aphanizomenon*) est globalement inférieure à celle de la Diatomée (de l'ordre de 12 mg/l).

3.3. Activité phosphatase alcaline

Après avoir répété toutes les mesures de l'activité phosphatasique, on constate que les deux valeurs enzymatiques obtenues pour chaque échantillon sont sensiblement égales.

La mesure spectrophotométrique de l'APA indique une périodicité nyctémérale de cette activité enzymatique aussi bien chez la Diatomée que chez les Cyano-

bactéries mais avec des caractéristiques propres à chaque espèce.

Ainsi, chez *Synedra capitata* et *Aphanizomenon flos aquae* :

- Les valeurs maximales de l'APA sont obtenues le jour (de l'ordre de 425 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ à 5 h, 11 h et 17 h pour la Diatomée et d'environ 850 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ à 11 h, 15 h et 19 h pour *Aphanizomenon flos aquae*) (Fig. 1 : LD et 2 : LD).

- Les valeurs minimales de l'activité enzymatique sont observées la nuit (de 25 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ à 23 h pour *Synedra capitata* et de l'ordre de 580 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$ à 21 h pour l'espèce cyanobactérienne) (Fig. 1 : LD et 2:LD).

- En conditions LD (16 : 8), l'activité enzymatique moyenne diurne de ces 2 espèces est supérieure à l'activité enzymatique moyenne nocturne (Tableau 2).

Chez *Microcystis aeruginosa* :

- Les maxima, dépassant 1500 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$, sont observés à 21 h (début de la nuit) alors que les minima, avoisinant 1050 $\mu\text{mol pNPP/l/h}$, sont obtenus aussi bien la nuit (3 h) que le jour (13 h) (Figure 3 : LD).

- En conditions LD (16 : 8), les APA moyennes diurne et nocturne sont proches l'une de l'autre (Tableau 2).

On constate également que le rythme journalier des 3 espèces étudiées disparaît quand les échantillons sont placés en obscurité permanente (Figures 1 : DD, 2 : DD, 3 : DD) ou en éclaircissement permanent (Figures 1 : LL, 2 : LL, 3 : LL).

Enfin, les activités enzymatiques moyennes de *Synedra capitata* et *Aphanizomenon flos aquae* sont maximales quand ces espèces se trouvent en obscurité permanente et minimales en éclaircissement permanent. A l'inverse, l'activité enzymatique moyenne de *Microcystis aeruginosa* est maximale en conditions (LL) et minimale en obscurité permanente (Fig. 4).

Tableau 2. Activité phosphatasique moyenne ($\mu\text{mol pNPP/l/h}$) de *Synedra capitata*, *Microcystis aeruginosa* et *Aphanizomenon flos aquae* dans les différentes conditions d'éclaircissement.

Table 2. Mean alkaline phosphatase activity ($\mu\text{mol pNPP/l/h}$) of *Synedra capitata*, *Microcystis aeruginosa* and *Aphanizomenon flos aquae* in different conditions of light.

	<i>Synedra capitata</i>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	<i>Aphanizomenon flos aquae</i>
APA moyenne diurne	271,5	1205,5	765
APA moyenne nocturne	142	1220,5	698
APA moyenne (DD)	307,5	913,5	808,5
APA moyenne (LD)	230	1210	744
APA moyenne (LL)	180	1497,5	579,5

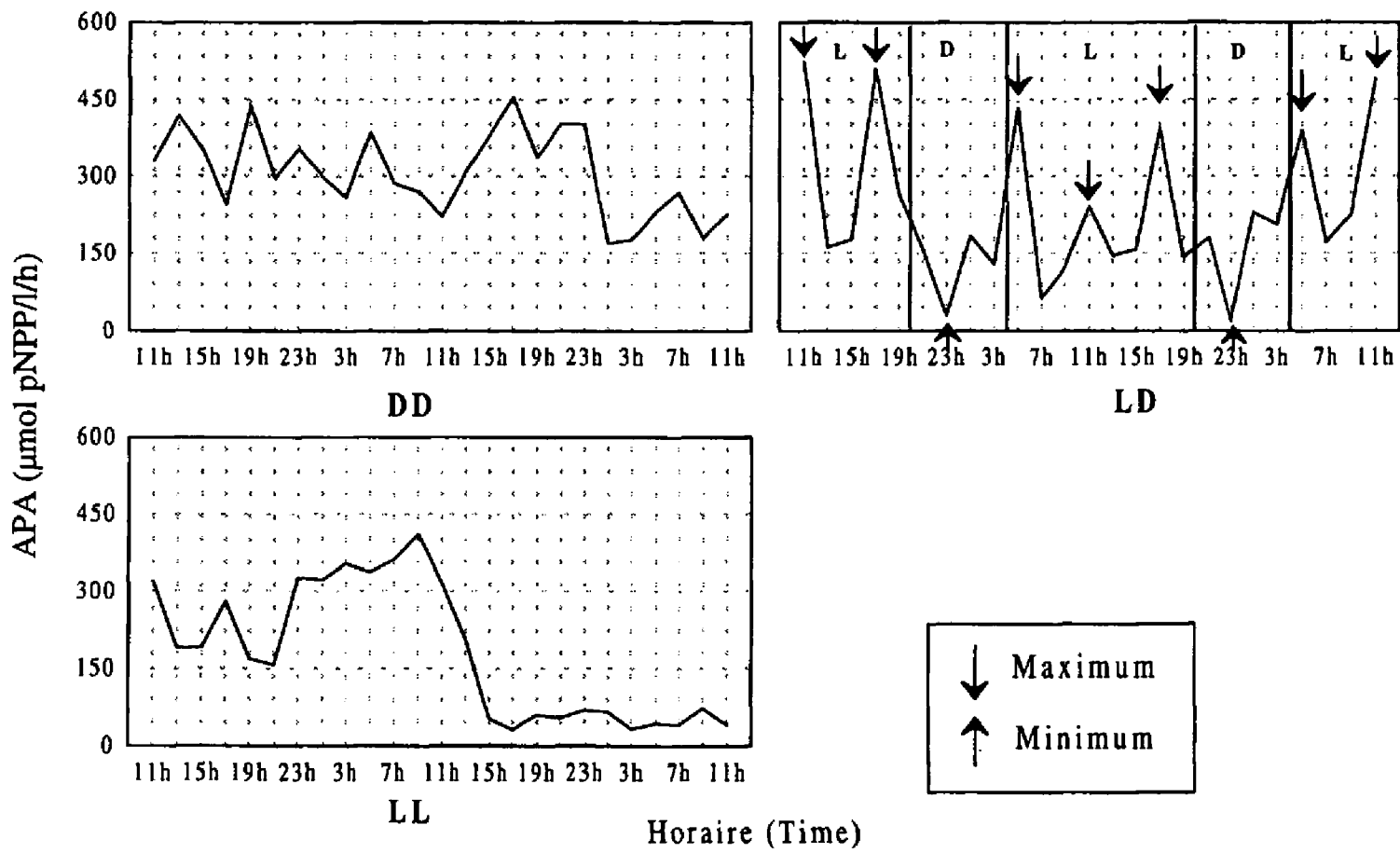


Fig. 1. Variations de l'activité phosphatase alcaline de *Synedra capitata* en fonction de la lumière.

Fig. 1. Changes in the alkaline phosphatase activity of *Synedra capitata* under total darkness (DD), LD (16 : 8) and permanent light (LL).

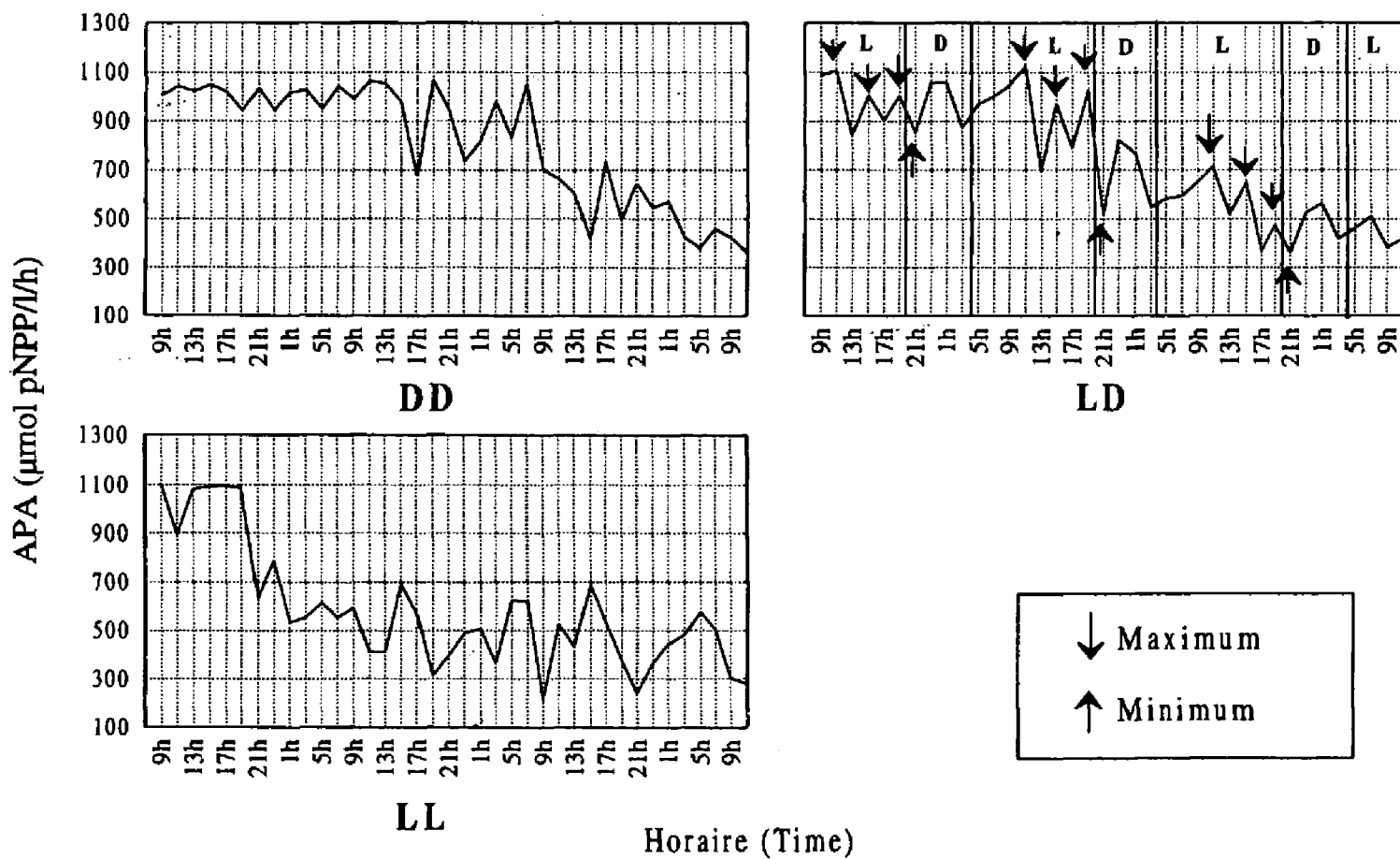


Fig. 2. Variations de l'activité phosphatase alcaline d'*Aphanizomenon flos aquae* en fonction de la lumière.

Fig. 2. Changes in the alkaline phosphatase activity of *Aphanizomenon flos aquae* under total darkness (DD), LD (16 : 8) and permanent light (LL).

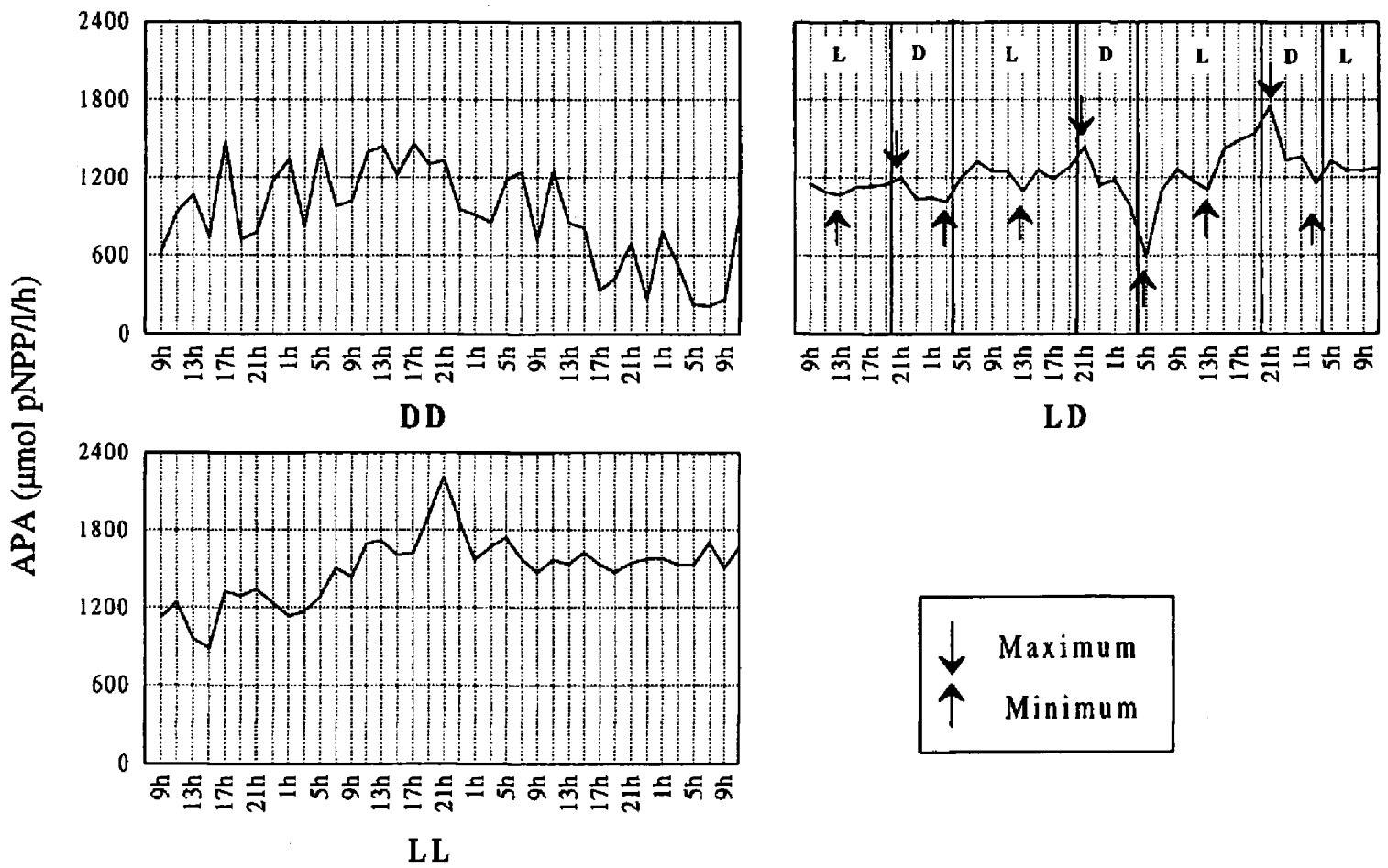


Fig. 3. Variations de l'activité phosphatase alcaline de *Microcystis aeruginosa* en fonction de la lumière.

Fig. 3. Changes in the alkaline phosphatase activity of *Microcystis aeruginosa* under total darkness (DD), LD (16 : 8) and permanent light (LL).

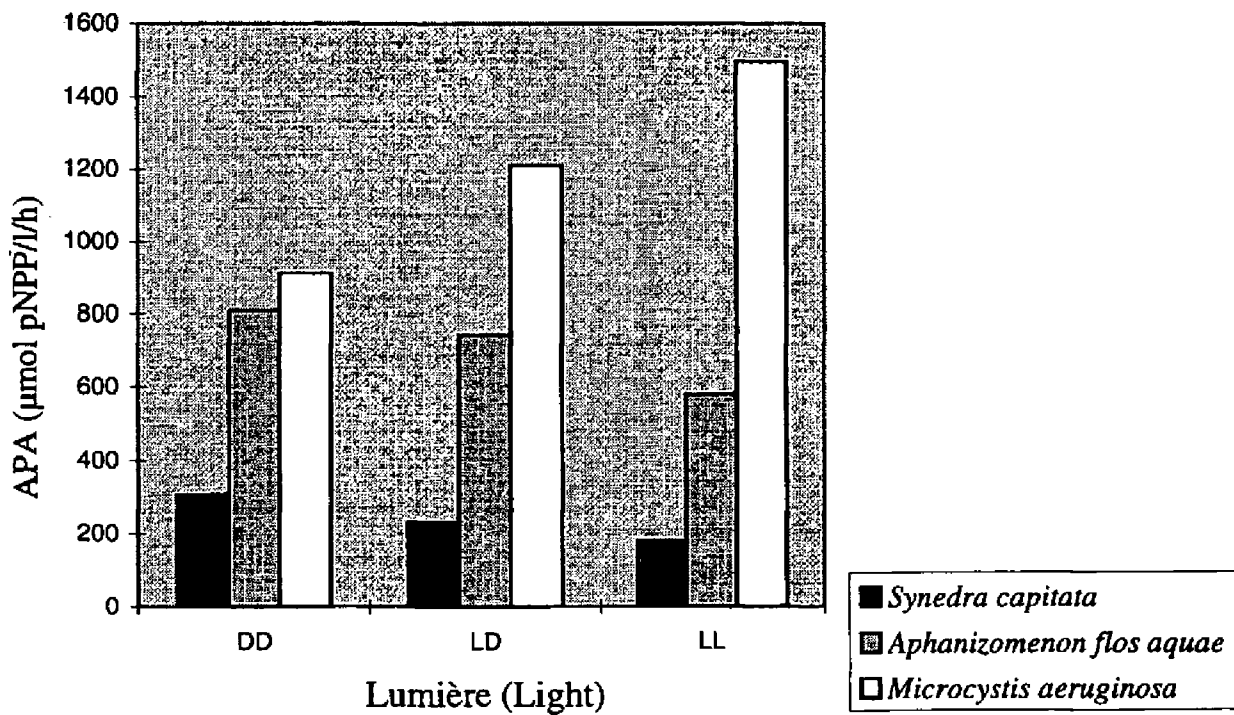


Fig. 4. Activité phosphatasique moyenne de *Synedra capitata*, d'*Aphanizomenon flos aquae* et de *Microcystis aeruginosa*.

Fig.4. Mean of the alkaline phosphatase activity of *Synedra capitata*, *Aphanizomenon flos aquae* and *Microcystis aeruginosa*.

4. Discussion et conclusion

L'activité phosphatasique mesurée dans ces conditions expérimentales correspond à l'activité enzymatique du phytoplancton et des bactéries associées. Or, des travaux antérieurs sur l'APA spécifique (Giraudet et al. 1996) ont montré que l'activité phosphatasique de ces bactéries (dont la biomasse protéique est faible par rapport à celle du phytoplancton) intervient de façon négligeable dans l'évolution spatio-temporelle de l'APA brute. L'activité enzymatique obtenue ici reflète donc bien celle de la fraction microplanctonique retenue sur les membranes WHATMAN GF/D.

Dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques, l'APA moyenne de *Microcystis aeruginosa* est beaucoup plus élevée (32 fois plus importante par unité de biomasse) que celle de *Synedra capitata* (Tableau 2). Cette différence pourrait s'expliquer par une carence en $P-PO_4^{3-}$ dans l'eau de la retenue de Grangent au milieu de l'été : on mesure alors une teneur inférieure à 0,003 mg/l contre 0,016 mg/l au printemps (Tableau 1). L'activité phosphatase alcaline jouerait donc le rôle d'un indicateur de carence en phosphore minéral. De nombreux auteurs ont démontré que l'activité phosphatase alcaline était étroitement liée aux quantités de phosphore minéral disponibles dans le milieu et que de fortes concentrations en phosphore minéral répriment la synthèse de l'enzyme (Ihlenfeldt & Gibson 1975, Healey & Hendzel 1979, Cembella et al. 1984-85, Jansson et al. 1988).

Cependant, cette interprétation paraît un peu compromise quand on regarde l'APA d'*Aphanizomenon* qui demeure élevée en fin d'été (10 fois plus importante que celle de *Synedra*) alors qu'à cette période la concentration en $P-PO_4^{3-}$ est 4 fois plus grande que celle mesurée au printemps (Tableaux 1 et 2). On peut donc suggérer que les Cyanobactéries possèdent une plus grande capacité de minéralisation du phosphore organique par unité de biomasse.

La lumière a un effet très significatif sur l'APA qui présente une périodicité nyctémérale aussi bien chez la Diatomée que chez les Cyanobactéries. Cette rythmicité disparaît quand les différentes espèces sont placées en éclairage ou en obscurité continue. Ce phénomène s'explique par l'absence de composante endogène, la lumière jouant un rôle moteur dans les variations de l'activité enzymatique. Cette importance de la lumière pourrait expliquer en partie les nombreux points communs entre l'APA de la Diatomée et celle d'*Aphanizomenon flos aquae* :

- leur APA moyenne respective est maximale en obscurité permanente et minimale en conditions (LL) (Fig. 4) ;

- en conditions LD (16 : 8), ces deux espèces possèdent une activité enzymatique moyenne maximale le jour et minimale la nuit (Tableau 2).

Il ne faut pas perdre de vue que ces 2 espèces, phylogénétiquement éloignées, ont été prélevées respectivement au printemps (début avril) et en fin d'été (début septembre), périodes de l'année où les photopériodes sont sensiblement égales (durée du jour de l'ordre de 13 heures). *Microcystis aeruginosa* subissait des conditions initiales d'éclairage différentes puisqu'au milieu de l'été (mi-juillet) la durée du jour est plus longue (de l'ordre de 15 h).

Avant de pouvoir affirmer que les différences de comportement enzymatique entre les divers groupes phytoplanctoniques représentent un critère explicatif des successions écologiques, des travaux complémentaires apparaissent nécessaires :

- un nouveau protocole expérimental d'étude des variations diurnes de l'APA de cultures monoalgales placées en flux continu sera mis en œuvre pour comparer l'activité enzymatique des différentes espèces phytoplanctoniques dans des conditions physico-chimiques contrôlées ;

- à plus long terme, une étude des variations de l'activité phosphatasique de *Microcystis aeruginosa*, à différents stades de son développement, est programmée. Cette étude a pour but de mettre en évidence, après les différences de comportements enzymatiques interspécifiques, des différences intraspécifiques et, plus particulièrement, pour montrer s'il existe une corrélation entre les variations de l'APA au sein des colonies et les changements de l'état physiologique cellulaire, comme il en apparaît, s'agissant de la toxicité de certaines souches.

Travaux cités

- Berman T. 1970. — Alkaline phosphatases and phosphorus availability in Lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.*, 24 : 541-547.
- Boavida M.J., Spujii J., Markowitz D. & Heath R.T. 1984. — Are soluble alkaline phosphatases secreted by zooplankton ? *Ohio. J. Sci.*, 84 : 77.
- Bourrelly P. 1970. — *Les algues bleues et rouges* (III). Boubée et Cie (Ed.), Paris : 512 p.
- Cembella A.D., Antia N.J. & Harrison P.J. 1984. — The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae : a multidisciplinary perspective : part 1. *CRC Critical Review in Microbiol.*, 10 : 317-391.
- Cembella A.D., Antia N.J. & Harrison P.J. 1985. — The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae : a multidisciplinary perspective : part 2. *CRC Critical Review in Microbiol.*, 11 : 13-81.

- Chrost R.J. & Overbeck J. 1987. — Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in Lake Plußsee (North German Eutrophic Lake). *Microb. Ecol.*, 13 : 229-248.
- Chrost R.J., Siuda W. & Halemejkó G.Z. 1984. — Long term studies on alkaline phosphatase activity (APA) in a lake with fish-aquaculture in relation to lake eutrophication and phosphorus cycle. *Arch. Hydrobiol., Suppl.*, 70 (1) : 1-32.
- Currie D.J., Bentzen E. & Kalff J. 1986. — Does algal-bacterial phosphorus partitioning vary among lakes? A comparative study of orthophosphate uptake and alkaline phosphatase activity in freshwater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43 : 311-317.
- Devaux J. 1993. — Etude de la retenue de Grangent. Rapport final du Conseil Général de la Loire : 131 p.
- Dodds W.K. 1993. — What controls levels of dissolved phosphate and ammonium in surface waters? *Aquat. Sci.*, 55/2 : 132-142.
- Dussart B. 1966. — *Limnologie, l'étude des eaux continentales*. Gauthier-Villars (Ed.), Paris : 677 p.
- Feder J. 1973. — The phosphatases, in *Environmental phosphorus handbook*. Griffith E.J., Beeton A., Spencer J.M. & Mitchell D.T. (Eds), New York : 475-508.
- Gage M. & Gorham E.G. 1985. — Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of the phosphorus status of phytoplankton in Minnesota lakes. *Freshwater Biol.*, 15 : 227-233.
- Giraudet H., Berthon J.-L. & Buisson B. 1996. — Variations nyctémérales de l'activité phosphatase alcaline et photosynthétique chez *Synedra capitata* en laboratoire, in *Quelques aspects de la Chronobiologie*. Buisson B. (Ed.), Presses Universitaires de St-Etienne : 150 p.
- Healey F.P. & Hendzel L.L. 1979. — Indicators of phosphorus and nitrogen deficiency in five algae in culture. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 36 : 1364-1369.
- Heath R.T. & Cooke G.D. 1975. — The significance of alkaline phosphatase in a eutrophic lake. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 19 : 959-965.
- Hernandez I., Fernandez J.A. & Niell F.X. 1993. — Influence of phosphorus status on the seasonal variation of alkaline phosphatase activity in *Porphyra umbilicalis* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 173 : 181-196.
- Ihlenfeldt M.J.A. & Gibson J. 1975. — Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). *Arch. Microbiol.*, 102 : 23-28.
- Jamet D., Aleya L. & Devaux J. 1995. — Diel changes in the alkaline phosphatase activity of bacteria and phytoplankton in the hypereutrophic Villerest Reservoir (Roanne, France). *Hydrobiologia*, 300-301 : 49-56.
- Jansson, M., Olsson H. & Pettersson K. 1988. — Phosphatases, origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia*, 170 : 157-175.
- Lee G.F. 1976. — Role of phosphorus in eutrophication and diffuse source control. *Wat. Res.*, 7 : 111-128.
- Legendre L. & Watt W.D. 1972. — On rapid technique for plankton enumeration. *Ann. Inst. Oceanogr. Paris.*, 58 : 173-177.
- Lindhardt K. & Walter K. 1965. — Phosphatases, in *Methods of Enzymatic Analysis*. Berbmeyer H.U. (Ed.), Verlag Chemie : 779-785.
- Lohman H. 1908. — Untersuchungen zur Feststellung des Vollständigen Gehaltes des Meeres an Plankton. *Wiss. Meeresunters. Abt. Kiel. N. F.* 10 : 132-170.
- Lorenzen C.J. 1967. — Determination of chlorophyll and pheopigments : spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* 12 (2) : 343-346.
- Olsson H. 1990. — Phosphatase activity in relation to phytoplankton composition and pH in Swedish lakes. *Freshwater Biol.* 23 : 353-362.
- Smith R.E.H. & Kalff J. 1981. — The effect of phosphorus limitation of algal growth rates : Evidence from alkaline phosphatase. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38 : 1421-1427.
- Steiner A. 1938. — Zur Kenntnis des phosphatkreislaufes in Seen. *Naturwissenschaften*, 26 : 723-724.
- Utermöhl H. 1958. — Zur Vervollkommung der quantitative Phytoplankton. *Methodik. Mitt. Intern. Ver. Limnol.*, 9 : 1-38.
- Vollenveider R.A. 1981. — Eutrophication of lakes and rivers. A global problem. *Wat. Qual. Bull.*, 6 : 59.
- Wynne D. & Gophen M. 1981. — Phosphatase activity in freshwater zooplankton. *Oikos*, 37 : 369-376.