

Étude de l'activité phosphatasique particulière au sein d'un écosystème pollué : le port de Toulon

Phosphatase activity of the particular material in a polluted ecosystem: Toulon sea port

N. JEAN *, G. BOGE, J.L. JAMET, D. JAMET

SUMMARY

Phosphatase activity was estimated on particulate material resulting from filtration of sea water on 90, 5 and 0.25 μm membranes, from December 1999 to March 2000 in Toulon seaport. Para-nitrophenylphosphate (pNPP) dissolved in seawater was used as substrate. In these conditions, activities with low and high affinities were disclosed on each size class. The contribution of the 0.25-5 μm fraction was low, whereas the activity of the size class superior to 90 μm was elevated. Enzyme activities of fixed bacteria were characterized in the zooplanktonic and phytoplanktonic fractions. However, they cannot explain the totality of the measured activities in particular for zooplankton.

Key-words: *alkaline phosphatase activity, particulate material, zooplankton, phytoplankton, bacteria, Toulon seaport.*

RÉSUMÉ

L'activité phosphatasique a été mesurée sur le matériel particulaire obtenu par filtration d'eau de mer sur des membranes de 90 μm , 5 μm et 0,25 μm de vide de maille, de décembre 1999 à mars 2000. Le substrat utilisé est du para-nitrophénylphosphate (pNPP) dissous dans l'eau de mer. Dans ces conditions, deux types d'activités, à faible et à forte affinités, ont été caractérisés pour chaque classe de taille. La contribution de la classe de taille comprise entre 0,25 et 5 μm à l'ensemble de l'activité a été la plus faible des trois fractions, alors que celle de la classe de taille supérieure à 90 μm a souvent été la

Université de Toulon et du Var, Département de Génie biologique, Laboratoire d'étude des échanges particuliers aux interfaces, UPRES EA 1723, BP 132, 83957 La Garde cedex, France.

* Correspondance. E-mail : jean@univ-tln.fr

Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 mars 2003.

plus forte. Des activités associées à la présence de bactéries ont été mises en évidence sur les fractions zooplanctonique et phytoplanctonique. Toutefois, celles-ci n'ont pu rendre compte de la totalité des activités mesurées, en particulier pour le zooplancton.

Mots clés : activité phosphatase, matériel particulaire, zooplancton, phytoplancton, bactéries, port de Toulon.

1 – INTRODUCTION

L'utilisation des esters phosphoriques par le plancton est liée à l'activité d'enzymes de nature très diverse, produites par les bactéries, le phytoplancton ou le zooplancton (AMMERMAN et AZAM, 1985 ; BOON, 1994 ; COTNER *et al.*, 1997 ; JANSSON *et al.*, 1988 ; KOBORI et TAGA, 1979 ; LI *et al.*, 1998 ; SIUDA, 1984). Les phosphatases sont particulièrement impliquées dans la production de phosphore assimilable, notamment lorsque les milieux sont naturellement pauvres en orthophosphates dissous, ainsi que l'a souligné PETERSON (1980), ce qui est le cas de la Méditerranée (THINGSTAD *et al.*, 1998). Cette activité peut être particulaire, c'est-à-dire intégrée au plancton, ou bien dissoute lorsque les enzymes sont sécrétées (REICHARDT *et al.*, 1967 ; STEWART et WETZEL, 1982).

Depuis quelques années, l'étude de ces activités enzymatiques a été entreprise dans plusieurs écosystèmes littoraux marins de la région toulonnaise (GAMBIN *et al.*, 1999 ; JAMET et BOGÉ, 1998 ; JEAN *et al.*, 2000). Ces écosystèmes possèdent des caractéristiques écologiques très différentes, notamment au niveau des communautés planctoniques. Ainsi, le port de Toulon se caractérise par des densités planctoniques plus importantes, et par un indice de diversité moins élevé que dans les autres sites étudiés (JAMET et FEREC-CORBEL, 1996).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité des fractions particulières planctoniques. Cette étude permettra de préciser la contribution des différentes classes de taille à l'activité phosphatase, les constantes cinétiques de ces activités, ainsi que le rôle des bactéries fixées.

2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Présentation du site d'étude

Toulon est un port de la zone littorale méditerranéenne nord-occidentale qui compte approximativement 160 000 habitants. Une importante activité militaire, commerciale et touristique s'y déroule. Des analyses physicochimiques menées par Ifremer, ont mis en évidence une pollution chimique par les métaux (Pb, Zn, Hg, et Cu) et des contaminants organiques (PCB, PAH et TBT).

La rade de Toulon est un milieu semi-fermé caractérisé par des courants de surface générés par des vents dominants (N-W et S-E). La station d'échantillonnage choisie se situe à proximité des quais d'apportement des navires de commerce.

2.2 Échantillonnage

La campagne d'échantillonnage a débuté en décembre 1999 et s'est poursuivie jusqu'en mars 2000. Chaque mois, dix litres d'eau de mer ont été prélevés à 3 mètres de profondeur à l'aide d'une bouteille fermante verticale (modèle General Oceanic).

2.3 Préparation des fractions particulières

L'eau de mer prélevée a été filtrée sur des membranes en polyamide (Nytrel-TI d'UGB) de 90, 5 et 0,25 μm de vide de maille. Les organismes récupérés sur les filtres de 90 μm appartiennent surtout au zooplancton. La classe de taille comprise entre 5 μm et 90 μm est essentiellement constituée de cellules phytoplanctoniques et celle comprise entre 5 μm et 0,25 μm , de bactéries.

La mesure de l'activité enzymatique et le dosage des protéines ont été effectués sur les fractions particulières ainsi récupérées. Les activités enzymatiques ont été mesurées sur le matériel fraîchement collecté. En revanche, le dosage des protéines a été effectué sur des fractions congelées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4 Mesure des activités enzymatiques

Des cinétiques enzymatiques ont été réalisées à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en utilisant du para-nitrophénylphosphate (pNPP) comme substrat (GAMBIN *et al.*, 1999 ; JAMET et BOGÉ, 1998).

Dix concentrations de substrat (0,01 mM-15 mM) ont été préparées dans de l'eau de mer préalablement filtrée sur 0,25 μm . Le matériel récupéré sur les filtres a été broyé puis correctement dilué dans de l'eau de mer filtrée sur des membranes de 0,25 μm . Au cours de la réaction enzymatique, le pNPP est converti en paraNitroPhénol (pNP), de couleur jaune, dosé par spectrophotométrie à 410 nm. La vitesse de la réaction est stable pendant au moins une heure. Afin d'estimer la contribution des enzymes dissoutes, des blancs substrats ont été préparés dans l'eau de mer filtrée. Des blancs filtres ont également été réalisés.

Les V_{max} (vitesse initiale théorique de la réaction enzymatique pour une concentration infinie en substrat) et les K_m (concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction atteint la moitié de la vitesse enzymatique maximale) ont été calculés en linéarisant les courbes de Michaelis-Menten au moyen de la transformation d'Eadie-Hofstee (Activité exprimée en fonction du rapport : Activité/Concentration en substrat) (LEHNINGER, 1975). Dans la plupart des cas, les cinétiques présentent plusieurs composantes michaeliennes. Afin de déterminer les paramètres de chacune d'elles, un programme de calcul applicable aux cinétiques multienzymatiques a été développé par JEAN *et al.* (2000). Les écarts types sur les valeurs des constantes cinétiques obtenues ont été calculés avec le logiciel Table Curve 2D.

2.5 Détermination des teneurs en protéines

Les teneurs en protéines constituent un paramètre estimatif de la biomasse planctonique. Elles ont été mesurées sur les fractions recueillies sur les filtres, selon la méthode de LOWRY *et al.* (1951). Ce matériel a été broyé dans de l'eau distillée. Puis, de la soude NaOH (2M) a été ajoutée à la suspension afin de dissoudre les protéines. L'étalonnage a été effectué à l'aide d'albumine bovine à 250 µg/mL. Le dosage a été réalisé par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 660 nm.

3 – RÉSULTATS

3.1 Évolution de l'activité phosphatasique des fractions particulières

Les activités enzymatiques responsables de l'hydrolyse des esters phosphoriques ont d'abord été rapportées au volume d'eau échantillonné. Deux mécanismes enzymatiques présentant des constantes biochimiques distinctes ont été caractérisés (*figure 1*). Le premier présente une faible affinité pour le substrat, son K_m a été de l'ordre de la millimole par litre. Le second correspond à un mécanisme à forte affinité et son K_m est de l'ordre de la micromole par litre. Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence concernant les constantes cinétiques des différentes classes de taille (Test de Wilcoxon). Par ailleurs, celles-ci ont présenté d'importantes fluctuations au cours de la période étudiée.

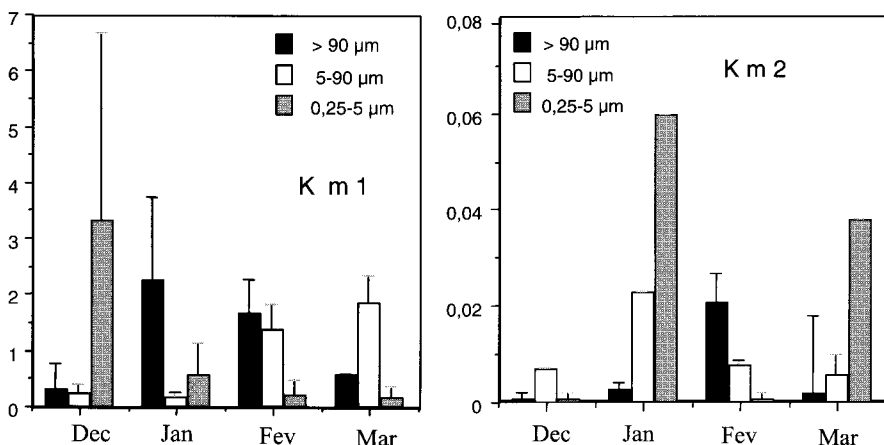


Figure 1 Évolution des K_m de l'activité phosphatasique par classe de taille. K_m en millimoles par litre ; K_{m1} : faible affinité, K_{m2} : forte affinité.

Km evolution of the phosphatase activity of the three size classes.

K_m in millimoles per liter ; K_{m1} : low affinity component, K_{m2} : high affinity component.

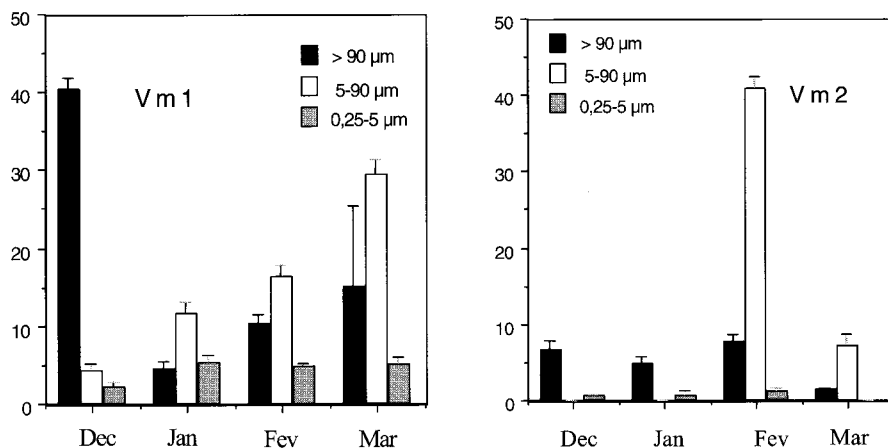


Figure 2 Évolution des V_{\max} de l'activité phosphatase par classe de taille (en nanomoles de pNP apparu par litre d'eau de mer et par heure.

V_{m1} : faible affinité, V_{m2} : forte affinité.

V_{\max} evolution of the phosphatase activity of the three size classes (in nanomoles of pNP per liter and per hour.

V_{m1} : low affinity component, V_{m2} : high affinity component.

Les différences les plus marquantes entre les classes de taille ont été observées au niveau des V_{\max} (figure 2). Pour la composante à faible affinité, ces valeurs sont en général plus élevées pour le zooplancton et le phytoplancton que pour les bactéries. En particulier, des activités très élevées ont été mesurées en décembre sur la fraction zooplanctonique. L'activité associée au phytoplancton a augmenté progressivement au cours de la saison, et, à l'exception du mois de décembre, sa contribution a été plus importante que celle du zooplancton. En revanche, l'activité de la fraction bactérienne a toujours été très faible et a peu évolué au cours de la saison.

En ce qui concerne la composante à forte affinité, la contribution majeure provient également des fractions zooplanctonique et phytoplanctonique, l'activité associée à la fraction bactérienne ayant été particulièrement faible pendant toute la durée de l'étude.

3.2 Évolution de l'activité spécifique

Afin de prendre en compte la biomasse dans l'expression de l'activité enzymatique, les activités enzymatiques spécifiques ont été calculées. Pour cela, les V_{\max} ont été rapportées à la quantité de protéines retenue sur chaque filtre. L'activité spécifique de la composante à faible affinité est en général plus forte pour les fractions zooplanctonique et phytoplanctonique que pour la fraction bactérienne, à l'exception du mois de janvier où l'activité de cette fraction a été très élevée (figure 3). Il en a été de même pour la composante à forte affinité, les activités spécifiques les plus élevées correspondant en général à la fraction zooplanctonique.

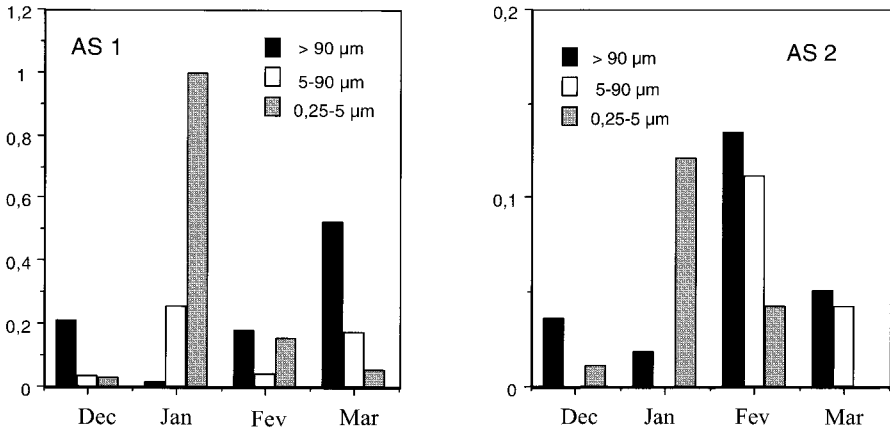


Figure 3 Évolution de l'activité spécifique par classe de taille (en nanomoles de pNP apparu par microgrammes de protéines et par heure.

AS₁ : faible affinité, AS₂ : forte affinité.

Evolution of the specific activity of the three size classes (in nanomoles of pNP per microgram protein and per hour).

AS₁ : low affinity component, AS₂ : high affinity component.

3.3 Rôle des bactéries

Pour caractériser la présence d'une activité due aux bactéries au niveau des fractions zooplanctonique et phytoplanctonique, la réaction enzymatique a été suivie pendant 24 heures à une concentration de substrat correspondant à la V_{max} (15 mM). Dans ces conditions, la présence de bactéries se traduira par une augmentation de l'activité au cours du temps liée à leur prolifération sur ce substrat. Le rapport R entre l'activité mesurée après 24 heures et l'activité initiale sera alors supérieur à l'unité.

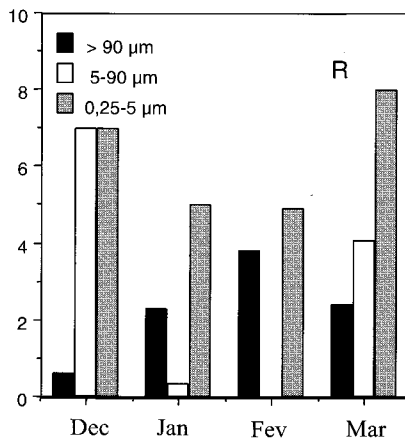


Figure 4 Évolution du rapport R entre l'activité phosphatasique mesurée après 24 heures et l'activité initiale, par classe de taille.

Evolution of the R ratio of the phosphatase activity between 24 h and 10.

Ce rapport a été déterminé pour les fractions zooplanctonique et phytoplanctonique. Il est très élevé au niveau de la fraction zooplanctonique en janvier, février et mars (*figure 4*). En revanche en décembre, l'activité a peu augmenté au cours du temps montrant une faible contribution des bactéries à l'activité totale. Une activité due aux bactéries fixées a également été caractérisée au niveau de la fraction phytoplanctonique, en particulier en décembre et en mars.

Afin d'estimer la contribution des bactéries fixées, une expérience similaire a été menée en parallèle, sur la fraction bactérienne. Cette fraction a été collectée par filtration sur une membrane de 0,25 μm , d'eau préfiltrée sur une membrane de 5 μm . Les rapports obtenus ont été comparés à ceux des fractions zooplanctonique et phytoplanctonique (*figure 4*). Dans le cas de valeurs identiques, on en déduira que 100 % de l'activité des fractions planctoniques a une origine bactérienne. La contribution des bactéries fixées à l'activité de la fraction zooplanctonique, a été estimée de la sorte, à environ 8 % de l'activité totale en décembre et à 80 % en février. Concernant la fraction phytoplanctonique, cette contribution a atteint les 100 % en décembre puis a diminué.

4 – DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que l'hydrolyse des esters phosphoriques résulte d'activités enzymatiques présentes dans les différentes fractions particulières planctoniques.

Ces activités sont dues à plusieurs classes d'enzymes qui se distinguent par leurs constantes cinétiques. Ainsi, des activités à forte et faible affinités ont été caractérisées dans la fraction contenant le zooplancton comme dans celle contenant le phytoplancton ou les bactéries. Il est vraisemblable que, dans les conditions naturelles du milieu où les concentrations en esters phosphoriques sont inférieures à la millimole par litre, l'activité à forte affinité tient un rôle prépondérant.

Les différentes classes de taille ont contribué inégalement à ces activités. Il a été observé en particulier que la contribution à l'activité totale de la fraction de taille comprise entre 5 et 0,25 μm était généralement faible. Ce résultat indique que les bactéries ne seraient pas à l'origine de l'essentiel de l'activité particulaire, ce qui est en désaccord avec ce qui est généralement reconnu, notamment par BERMAN (1990), CURRIE et KALFF (1984). Ces divergences pourraient tenir aux conditions de filtration. Ainsi, une partie de l'activité bactérienne a pu être transférée de la phase particulaire à la phase soluble en raison du vide partiel qu'il a été nécessaire de réaliser pour concentrer les bactéries. Toutefois, le calcul de l'activité spécifique qui prend en compte la biomasse réellement présente sur le filtre, a confirmé que la fraction des bactéries libres n'est responsable que d'une faible activité.

Il est également possible que ces divergences soient dues aux conditions de dosage de l'activité enzymatique. En effet, nos expériences ont été réalisées dans l'eau de mer afin de se rapprocher des conditions naturelles du milieu, et

non pas à l'optimum du pH de l'activité. Dans le cas des phosphatases acides, celui-ci est légèrement acide, tandis qu'il est très nettement basique dans le cas des phosphatases alcalines. Or, il a déjà été montré par GAMBIN *et al.* (1999) qu'une augmentation du pH du milieu d'incubation stimule les activités bactérienne et phytoplanctonique, alors que l'activité zooplanctonique y est beaucoup moins sensible.

Ces résultats ont également montré qu'à l'occasion de certains prélèvements, les activités les plus élevées provenaient de la fraction zooplanctonique. Le rôle du zooplancton dans la production d'enzymes recyclant les esters phosphoriques en orthophosphates assimilables, a souvent été débattu, notamment par JANSSON (1976), JANSSON *et al.* (1988), REICHARDT *et al.* (1967), RIVIERE (1983). Des travaux en cours montrent que ces fortes activités sont souvent corrélées à la présence de larves de cirripèdes dans le milieu, confirmant l'hypothèse de GAMBIN *et al.* (1999). Nos résultats ont également montré, en particulier en décembre, qu'elles n'ont pas d'origine bactérienne.

En revanche, pour d'autres prélèvements, il a été montré que des bactéries pourraient contribuer notablement aux activités des fractions zooplanctonique et phytoplanctonique. Concernant la fraction 0,25-5 μm , il est probable que ces bactéries pourraient avoir été retenues sur le filtre en même temps que le phytoplancton. En revanche, pour la fraction zooplanctonique, il n'a pu en être ainsi dans la mesure où la filtration a été effectuée par simple gravité, sans entraîner le colmatage du filtre. Dans ce cas, les bactéries pourraient être fixées sur la carapace, ou être concentrées dans le tube digestif.

Peu de travaux existent concernant l'association des bactéries avec les crustacés. Les modes d'interaction sont pourtant nombreux (symbiose, commensalisme, parasitisme) surtout dans les écosystèmes pollués où la densité bactérienne est souvent plus élevée, comme cela a été relevé par CARMAN et DOBBS (1997). La présence d'une activité bactérienne associée au zooplancton semble être un phénomène caractéristique de la rade. En effet, elle a rarement été observée dans des écosystèmes moins anthropisés, tels qu'il en existe à l'extérieur de la rade (observations personnelles). Elle n'a pu cependant rendre compte de la totalité de cette activité, notamment en décembre où de fortes activités ont été observées en l'absence d'une activité bactérienne notable.

En conclusion, ces travaux ont montré que lorsque les activités phosphatases sont mesurées dans l'eau de mer, la fraction contenant les bactéries libres est moins active que celle correspondant au phytoplancton et au zooplancton. Toutefois, une partie de l'activité de ces fractions est due aux bactéries associées, notamment en ce qui concerne la fraction zooplanctonique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMMERMAN J.W., AZAM F., 1985. Bacterial 5'- nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science*, 227, 1338-1340.

BERMAN T., 1990. Phosphatases revisited: an analysis of particle associated enzymatic activities in aquatic systems. *Hydrobiologia*, 207, 287-294.

- BOON P.I., 1994. Discrimination of algal and bacterial alkaline phosphatase with a differential inhibition technique. *Journal of Marine and Freshwater Research*, 45, 83-107.
- CARMAN K.A., DOBBS F.C., 1997. Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. *Microscopy research and technique*, 37, 116-135.
- COTNER J.B., AMMERMAN PEELE E.R., BENTZEN E., 1997. Phosphorus limited plankton growth in the Sargasso sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 13, 141-149.
- CURRIE D.J., KALFF J., 1984. A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnology and oceanography*, 29, 298-310.
- GAMBIN F., BOGE G., JAMET D., 1999. Alkaline phosphatase in a littoral Mediterranean marine ecosystem: role of the main plankton size classes. *Marine Environmental Research*, 47, 441-456.
- IFREMER (1993). Qualité du milieu marin littoral. Ifremer et ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, ministère de l'Agriculture et de la Pêche, ministère de l'Équipement, des Transports et du Tourisme, ministère de l'Environnement, p. 241.
- JAMET D., BOGE G., 1998. Characterisation of marine zooplankton alkaline phosphatase activity in relation to the water quality. *Hydrobiologia*, 373-374, 311-316.
- JAMET J.L., FEREC-CORBEL A.S., 1996. Seasonal variations of the zooplankton community in a littoral marine ecosystem: Toulon Bay (Var, France), *Marine Life*, 6 (1-2), 15-20.
- JANSSON M., (1976). Phosphatases in lakes water: characterisation of enzymes from phytoplankton and zooplankton by gel filtration. *Science*, 194 (2), 320-321.
- JANSSON M., OLSSON H., PETTERSON K., 1988. Phosphatases: characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia*, 170, 157-175.
- JEAN N., MAS M., BOGE G., JAMET J.-L., JAMET D., RICHARD S., 2000. Analyse des activités enzymatiques responsables de l'hydrolyse des esters phosphoriques en zone littorale de Méditerranée occidentale. In : *CNR'IUT 2000 : Recherche et Innovation*. Tome 2, Presses Universitaires d'Orléans (Ed.), 62-78.
- KOBORI H., TAGA N., 1979. Phosphatase activity and its role in the mineralization of organic phosphorus in coastal sea water. *Journal Exploration of Marine Biology and Ecology*, 36, 23-39.
- LEHNINGER A.L., 1975. Biochemistry, the molecular basis of cell structure and function, Worth Publishers, Inc.
- LI H., VELDHUIS M.J.W., POST A.F., 1998. Alkaline phosphatase activities among planktonic communities in the northern Red Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 173, 107-115.
- LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A. L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- PETTERSON K., 1980. Alkaline phosphatase activity and algal surplus phosphorus as phosphorus-deficiency indicators in Lake Erken. *Hydrobiologia*, 89, 54-87.
- REICHARDT W.J., OVERBECK J., STEUBING L., 1967. Free dissolved enzymes in lake waters. *Nature*, 216, 1345-1347.
- RIVIERE D., 1983. Comparaison biochimique de quatre espèces de copépodes planctoniques de Méditerranée nord-occidentale à partir des enzymogrammes des estérases, de la leucine aminopeptidase, de la phosphatase alcaline, de la malate déshydrogénase et de l'enzyme malique. *Marine Biology*, 75, 19-23.
- SIUDA W., 1984. Phosphatases and their role in organic phosphorus transformation in natural waters. A review. *Pol. Archiv für Hydrobiologie*, 31 (3), 207-233.
- STEWART A.G., WETZEL R.G., 1982. Phytoplankton contribution to alkaline phosphatase activity. *Arch. Hydrobiologie*, 93, 265-271.
- THINGSTAD T.F., ZWEIFEL U.L., RASSOUL-ZADEGAN F., 1998. P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the Northwest Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43 (1), 88-94.