

Annexe 1

Proposition d'étude concernant les flux d'azote Expérimentations et modélisation

Dans le cadre de
DIAPAZON

DIAzotrophie PAcifique ZONe

2002-2003

DIAPAZON

Trichodesmium et autres organismes diazotrophes marins :
Déterminisme de leur prédominance et rôle trophique

Proposition d'étude concernant les flux d'azote Expérimentations et modélisation

THEME CONCERNE du programme PROOF :

Thème 2 : Les effets respectifs du changement climatique et de la variabilité naturelle sur la structure fonctionnelle des écosystèmes marins et sur les cycles biogéochimiques.

- a) Diversité et efficacité des fonctions biologiques dont la production primaire et la fixation d'azote moléculaire (diazotrophie),
- b) Facteurs (sels nutritifs, métaux) contrôlant la fertilité océanique

Laboratoire concerné : Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie, UMR 6535–Campus de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09

Participants :

Patrick RAIMBAULT (DR2 CNRS) : Expérimentations et analyses ^{15}N et ^{13}C	20%
Nicole GARCIA (AI, CNRS) : Expérimentations et analyses ^{15}N et ^{13}C	20%
Gerd SLAWYK (DR2 CNRS) : analyses ^{15}N et ^{13}C	5%
Frédéric DIAZ (MC) : Expérimentations et modélisation	10%

RESUME DU PROJET : Quelle est la quantité effective d'azote fixé par *Trichodesmium* et les autres organismes diazotrophes ? Quelle est la part d'azote nouveau due à la fixation d'azote moléculaire (N_2) dans la production nouvelle et donc dans la quantité de carbone exportée vers les profondeurs ? Quels sont les facteurs trophiques de contrôle de la diazotrophie ? Est-il possible de répondre aux questions précédentes avec un modèle couplé physique/biogéochimie prenant en compte une représentation fine du processus de la diazotrophie ?

L'objectif ultime est de parvenir à un bilan de la diazotrophie dans le Pacifique tropical sud-ouest, et de déterminer la part respective de l'excrétion, du broutage et de la sédimentation dans le devenir de la matière totale produite par les cyanobactéries diazotrophes.

Objectifs principaux :

- 1) Etude de la diazotrophie de *Trichodesmium* aux différentes phases de développement d'une efflorescence,
- 2) Détermination de la biomasse et de la distribution spatiale de *Trichodesmium*. Evolution des rapports C/N/P dans la matière particulaire et la matière organique dissoute,
- 3) Production primaire (^{13}C), production azotée (^{15}N) de *Trichodesmium* et autres organismes diazotrophes et des populations phytoplanctoniques associées,
- 4) Effet du fer et du phosphore sur les flux d'absorption de l'azote,
- 5) Devenir de la matière produite : régénération de l'azote ; production de matière organique,
- 6) Exportation par sédimentation et sous forme dissoute de la matière photosynthétisée,

- 7) Amélioration de la paramétrisation des processus liés au métabolisme azoté de *Trichodesmium* dans les modèles biogéochimiques à partir de données expérimentales,
- 8) Modélisation réaliste des flux d'azote (fixation de N₂, excrétion d'azote organique dissous, absorption d'ammonium...) et de la biomasse de *Trichodesmium* dans la zone euphotique du Pacifique tropical sud-ouest.

DOSSIER SCIENTIFIQUE

1. ETAT DE L'ART et PROJET D'ETUDE

La disponibilité en azote est généralement considérée comme le facteur limitant la production primaire dans la majorité des zones océaniques. La principale forme d'azote étant le nitrate qui est introduit dans la couche productive de surface par l'action de processus physiques (advection verticale, diffusion turbulente). Bien que la production primaire directement soutenue par l'apport de nitrate soit considérée comme la production nouvelle (Dugdale et Goering, 1967), le gain pour le milieu est plus correctement exprimé par l'apport de sources extérieures qui sont de trois types : les apports continentaux, la fixation d'azote moléculaire (N₂), et les dépôts atmosphériques. En terme de bilan global, ces deux dernières sources ont été longtemps considérées comme peu significatives. Cependant, Jickells (1995, 2001) suggère que les apports d'azote à l'océan par les fleuves, l'atmosphère et la fixation d'azote seraient équivalents. En effet, alors que les apports par les rivières concernent essentiellement les eaux côtières, les dépôts atmosphériques et la fixation de N₂ jouent un rôle non négligeable dans les systèmes océaniques oligotrophes du large. Bien que la cyanobactérie coloniale du genre *Trichodesmium* soit depuis longtemps (Dugdale *et al.*, 1961) considérée comme l'organisme principal fixateur de N₂ en milieu océanique (Capone *et al.*, 1997), Zehr *et al.* (1998, 2001) ont mis en évidence le rôle non négligeable de cyanobactéries libres nanoplanctoniques (de taille comprise entre 3 et 10 µm). Ces auteurs ont ainsi estimé que la quantité globale de N₂ fixé par ces organismes nanoplanctoniques serait équivalente à celle fixée par *Trichodesmium*. Les mesures de fixation d'azote doivent être effectuées non seulement sur la fraction picoplanctonique reconnue pendant longtemps comme le compartiment qui devait regrouper l'essentiel des organismes (cyanobactéries) potentiellement fixateurs d'azote (*Synechococcus*, *Prochlorococcus*), mais également sur la fraction nanoplanctonique (taille > 3µm) qui pourtant représente une biomasse très faible dans les eaux oligotrophes (5 à 30% de la chlorophylle).

Malgré la reconnaissance de l'importance de la fixation de N₂ comme source de production nouvelle en milieu océanique tropical et subtropical, le devenir de cet azote "nouveau" et du carbone associé est encore peu connu. De fortes concentrations de matières organiques et inorganiques (ammonium) ont été observées au cours de floraison de *Trichodesmium* (Glibert et Bronk, 1994 ; Karl *et al.*, 1992) indiquant qu'une grande partie de l'azote introduit dans le milieu est recyclée dans la couche de surface et permet le maintien de la boucle microbienne.

En plus de l'azote, les organismes diazotrophes ont besoin de fer (Falkowski, 1997, Berman-Frank *et al.*, 2001) et de phosphore (Sanudo-Wilhelmy *et al.*, 2001) pour leur croissance. Ces deux éléments, en faible quantité dans les zones océaniques, peuvent être limitants en l'absence d'apport atmosphérique de fer en particulier.

Le présent projet se propose d'étudier le cycle de l'azote dans une région de l'océan Pacifique reconnue pour être le lieu de nombreuses floraisons de *Trichodesmium*. L'accent sera mis notamment sur la quantification directe de la fixation de N₂ (méthode à l'azote-15, Montoya *et al.*, 1996) par *Trichodesmium*, mais également par les organismes

nanoplanctoniques. La production primaire sera estimée simultanément (méthode au carbone-13) ainsi que les processus de régénération et d'excrétion afin de définir le devenir à court terme de la matière synthétisée par les différents types d'organismes fixant N₂. L'influence de la disponibilité en fer et en phosphore sur le métabolisme azoté de ces organismes sera également testée.

La mise en évidence récente de l'importance de la fixation marine de N₂ par les microorganismes diazotrophes dans l'apport d'azote "nouveau" à l'Océan tropical (Capone *et al.*, 1997 ; Falkowski, 1997 ; Karl *et al.*, 2001) a consécutivement entraîné la prise en considération de ce processus dans les modèles biogéochimiques d'écosystème pélagique. Les paramétrisations les plus simples décrivent le processus de fixation de N₂ comme une source d'azote organique dissous proportionnelle à la température et à l'irradiance sans expliciter la biomasse des organismes diazotrophes (Bissett *et al.*, 1999). Au contraire, dans le modèle de Hood *et al.* (2001), la biomasse de *Trichodesmium* est une variable d'état mais la fixation de N₂ est seulement une fonction de l'irradiance. D'autres paramétrisations prennent en compte le contrôle de la disponibilité en phosphate sur la fixation de N₂ soit de manière directe (Neumann, 2000), soit par l'intermédiaire du rapport nitrate/phosphate (Tyrrell, 1999). Les modèles les plus récents tel celui de Fennel *et al.* (2002) intègrent un contrôle du taux de croissance de *Trichodesmium* à la fois par la ressource en sels nutritifs (phosphate et nitrate) et à la fois par les paramètres physiques (température, irradiance). Ce dernier type de modèle permet notamment de reproduire le cycle saisonnier et les différences inter-annuelles de l'occurrence des organismes diazotrophes à la station ALOHA (Pacifique tropical nord) ; toutefois, certains autres résultats telle qu'une surestimation systématique de l'azote inorganique dissous dans la zone euphotique suggèrent que le processus de la fixation de N₂ est probablement contraint par d'autres facteurs que ceux pris en compte dans le modèle de Fennel *et al.* (2002).

Dans ce contexte, le volet de modélisation du présent projet, consistera à améliorer la représentation des processus liés à *Trichodesmium* dans les modèles biogéochimiques à partir de l'analyse de données expérimentales acquises au cours des campagnes DAPALIS 2002. Une première étape portera sur la paramétrisation de plusieurs processus relatifs au métabolisme azoté de *Trichodesmium* : (1) mise en place d'une co-limitation de fixation de N₂ par la disponibilité en fer/azote/phosphate, (2) représentation des migrations verticales nyctémérales (à partir des données C/N/P), et (3) excrétion d'azote et de phosphore organiques dissous. Dans un second temps, ces différentes paramétrisations seront incluses dans un modèle biogéochimique d'écosystème pélagique initialement développé au LOB (Diaz, 2000) et couplé à un modèle hydrodynamique 1D (modèle SYMPHONIE). Dans sa version actuelle, le modèle d'écosystème décrit les cycles pélagiques de l'azote et du phosphore avec notamment une co-limitation de la croissance phytoplanctonique par la disponibilité en phosphate et nitrate. Dans la version utilisée pour le programme DIAPAZON, le modèle subira un certain nombre de modifications et notamment, l'ajout de deux classes de phytoplancton dont une représentant explicitement la biomasse de *Trichodesmium* soumise, par ailleurs, à une pression de prédation spécifique. L'ensemble du modèle couplé pourra être validé grâce aux données récoltées en particulier au niveau de la station longue (4 jours, Chenal des Loyauté).

2. STRATEGIE ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Participation d'une personne (au moins) à chacune des campagnes de 10 jours prévues en 2002 et à deux campagnes en 2003 sur l'ALIS.

1) Description de l'environnement chimique et biologique

a) Matière organique dissoute (MOD)

Détermination des concentrations en matières organiques dissoutes par la méthode d'oxydation humide (Raimbault *et al.*, 1999a) permettant le dosage simultané du carbone, de l'azote et de phosphore et l'obtention des rapports C/N/P sur le même échantillon.

Volume d'eau nécessaire : 100 ml

Stockage à bord dans des flacons en verre de 50 ml; conservation au frais après empoisonnement au HgCl_2 . Dosages au laboratoire.

b) Matière organique particulaire (MOP)

Détermination des concentrations en matière organique particulaire par la méthode d'oxydation humide (Raimbault *et al.*, 1999b) permettant le dosage simultané du carbone, de l'azote et de phosphore et l'obtention des rapports C/N/P sur le même échantillon.

Volume d'eau nécessaire : 0.6 à 1.2 litres

Filtration à bord sur filtre GF/F 25 mm et/ou sur filtre Téflon 0.2 μm .

Stockage à bord dans des flacons en verre de 25 ml; conservation au frais ou congelés; dosages au laboratoire.

La technique peut être utilisée sur des colonies isolées de *Trichodesmium* si la densité de la population le permet (récupération au filet ou à la pompe).

2) Production primaire et flux d'azote

Les taux d'assimilation du carbone (production primaire) et de l'azote seront estimés par la technique du double marquage à l'aide des traceurs isotopiques stables ^{13}C et ^{15}N . Les estimations de la régénération de l'azote (ammonium et nitrate) et de l'excrétion d'azote organique dissous (NOD) seront effectuées à partir des enrichissements isotopiques mesurés sur les filtrats récupérés en fin d'incubation.

Mise en incubation

Utilisation de flacons en polycarbonate préalablement nettoyés à l'acide dilué et rincés à l'eau déionisée.

Absorption du nitrate = *production nouvelle* : 0.6 à 1.2 litre d'échantillon enrichi avec du $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ à l'état de trace (<50 nM).

Absorption de l'ammonium = *production régénérée* : 0.6 à 1.2 litre d'échantillon enrichi avec du $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ à l'état de trace (<100 nM).

Absorption d'azote moléculaire = *diazotrophie* : 0.6 à 1.2 litre d'échantillon enrichi avec du $^{15}\text{N}_2$ (10 à 20%) + 10% H^{13}CO_3 .

La technique proposée est basée sur celle développée par Montoya et al. (1991) au cours laquelle l'addition de traceur se fait sous forme gazeuse et perturbe au minimum l'échantillon. Ces mesures se feront sur la fraction totale en utilisant des filtres GF/F.

Une étude particulière portera sur la fraction nanoplanctonique (>3 μm) par l'utilisation de filtres de porosité 3 μm en argent compatibles avec une analyse au spectromètre de masse. Ceci permettra d'isoler la fraction nanoplanctonique et de réduire la dilution isotopique en éliminant les particules de petite taille qui ne seraient pas impliquées dans le processus de

fixation d'azote et donc peu ou pas enrichies en azote-15. C'est une manière d'amplifier le signal de ce processus dont les taux sont certainement très faibles et concernent un très faible nombre de cellules par litre (Zehr et al., 2001). Pour éliminer toute interférence avec *Trichodesmium*, ces échantillons seront préalablement filtrés sur une soie de 10µm. La mesure sera ainsi effectuée sur la fraction comprise entre 3 et 10µm.

L'incubation se fera *in situ* à 6 niveaux de profondeur (3 flacons à chaque niveau). Durée d'incubation : 12 ou 24 heures.

En présence de densité élevée de *Trichodesmium*, ces expérimentations pourront s'effectuer sur des colonies isolées mises en incubation dans de l'eau de mer filtrée.

Fin d'incubation

Filtration de 0.6 litre sur filtre GF/F (25 mm). Conservation des filtres à sec après séchage à l'étuve (60°C). Détermination des enrichissements isotopiques au laboratoire.

Récupération de 400 ml de filtrat sur chaque échantillon dans des flacons Schott de 500 ml pour détermination des taux de régénération de l'ammonium, de nitrification (oxydation de l'ammonium) et d'excrétion d'azote organique dissous (NOD) et de carbone organique dissous (COD) selon les protocoles de Slawyk et Raimbault (1995) et Raimbault *et al.* (1999c).

Conservation à température ambiante par empoisonnement au chlorure mercurique. Traitement et analyse au laboratoire.

Les filtres secs seront ramenés au laboratoire après chaque campagne pour analyse immédiate. Les filtrats feront l'objet d'un rapatriement global après la dernière campagne.

3) Influence du fer et du phosphore sur le cycle de l'azote

Des expériences d'enrichissement en fer et en phosphate seront effectuées au moins une fois par campagne. L'effet de ces éléments n'étant généralement détectable qu'après 24 heures d'incubation, ces expériences seront réalisées en bacs pendant 48 heures sur des échantillons prélevés en surface.

Effet du phosphate : 2 flacons de 2.8 litres enrichis en $^{15}\text{N}_2$ (10-20%) ou en nitrate (100 nM) dont un est également enrichi avec 0.1 µM de phosphate. Prélèvements (0.6 litres) et filtrations à 12-24-36 et 48 heures.

K_s phosphate : 6 flacons de 0.6 litres enrichis en $^{15}\text{N}_2$ (10-20%) et avec des concentrations croissantes de phosphate (5-10-20-50-100 et 200 nM). Filtration après 12 heures d'incubation.

Effet du fer : 2 flacons de 2.8 litres enrichis en $^{15}\text{N}_2$ (10-20%) ou en nitrate (100 nM) dont un est également enrichi avec 1nM de fer. Prélèvement (0.6 litre) et filtration à 12-24-36 et 48 heures.

K_s fer : 6 flacons de 0.6 litre enrichis en $^{15}\text{N}_2$ (10-20%) et avec des concentrations croissantes de fer (concentrations à définir). Filtration après 12 heures d'incubation.

Filtration sur filtre GF/F (25 mm). Conservation à sec après séchage à l'étuve.

Les filtres secs seront ramenés au laboratoire après chaque campagne pour analyse immédiate.

3. SCENARIO PREVISIONNEL PROPOSE POUR LES DIFFERENTES CAMPAGNES

Site océanique

Jour 1 : profil de MOP, MOD et de production-régénération (incubation in situ)

Jour 2 : Expérimentations avec phosphate (incubations en bacs)

Jour 3 : profil de MOP, MOD et de production-régénération (incubation in situ)

Jour 4 : Expérimentations avec fer (incubations en bacs)

Jour 5 : profil de MOP, MOD et de production-régénération (incubation in situ)

Jour 6 : *Expérimentations (incubations en bacs) suivant temps disponible*

Ce scénario devra être adapté en fonction des conditions rencontrées sur le site et notamment la présence ou non de floraisons de *Trichodesmium*.

4. MOYENS DONT DISPOSE LE PROPOSANT ET QUI SERONT AFFECTES A LA REALISATION DU PROJET

Equipement disponible pour la réalisation du projet

Embarqué :

Rampes à filtration

Incubateurs

Pour les analyses au laboratoire

Chaînes Technicon

autoclave

Spectromètre de masse

Références citées

Bissett W.P., Walsh J.J., Dieterle D.A., Carder K.L., 1999. Carbon cycling in the upper waters of the Sargasso Sea: I. Numerical simulation of differential carbon and nitrogen fluxes. *Deep Sea Res.*, 46: 205-269.

Fennel K., Spitz Y.H., Letelier R.M., Abbott M.R., Karl D.M., 2002. A deterministic model for N₂ fixation at stn. ALOHA in the subtropical North Pacific Ocean. *Deep-Sea Res.*, 49 : 149-174

Hood R.R., Bates N.R.A., Capone D.G., Olson D.B., 2001. Modeling the effect of nitrogen fixation on carbon and nitrogen fluxes at BATS. *Deep-Sea Res.*, 48: 1609-1648

Jickells T.D., 1995. Atmospheric inputs of metals and nutrients to the oceans: their magnitude and effects. *Mar. Chem.*, 48: 199-214

Jickells T.D., 2001. Global change open Science Conference, Amsterdam, July 2001

Neumann T., 2000. Towards a 3D-ecosystem model of the Baltic Sea. *J. Mar. systems*, 25: 405-419.

Références récentes de l'équipe

- Diaz F., Raimbault P., Conan P.**, 2000. Carbon and nitrogen utilization by phytoplankton during spring in a Mediterranean coastal zone (Gulf of Lions): evidence of small-scale variability. *Cont. shelf. Res.*, 20(9) : 975-996
- Diaz F., Raimbault P.**, 2000. Nitrogen regeneration and DON release during ^{15}N experiments during spring in a northwestern Mediterranean coastal zone (Gulf of Lions): implications on the estimations of f ratio and new production. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 197: 53-66.
- Diaz F., 2000. Evolution saisonnière de la production primaire et des processus d'assimilation – régénération de l'azote dans le golfe du Lion. Estimation d'un bilan de carbone. Approches *in situ* et modélisation. PhD thesis, University of Aix-Marseille II, France, 341 pp.
- Diaz F., Raimbault P., Garcia N., Moutin T.**, 2001 Early phosphorus limitation during spring in the gulf of Lions. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 211: 51-62
- Dufour P., Charpy L., Berland B., Bonnet S., **Garcia N.**, 1999 Phytoplankton nutrient control in oceanic water of the Tuamotu Archipelago. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*
- Dufour P., Andrefouet S., Charpy L., **Garcia N.**, 2001. Down regulation of phytoplankton by nutrients in atoll lagoons: morphology does matter. Sous presse à *Limnology and Oceanography*
- Moutin T., **Raimbault P.**, Poggiale J.C, 1999. Primary production in surface waters of the western Mediterranean Sea: calculation of daily production. *C.R. Acad. Sci.*, 322: 651-659
- Raimbault P.**, Slawyk G., Boudjellal B., Coatanoan C., Conan P., Coste B., **Garcia N.**, Moutin T., Pujo-Pay M, 1999c. Biomass, new production and export in the equatorial Pacific at 150°W : Evidence for intense nitrogen recycling. *J. Geophys. Res.* 104, 3341-3356.
- Raimbault P.**, Pouvesle W., Sempéré R., **Diaz F.**, **Garcia N.**, 1999a. A simple procedure for simultaneous analysis of total and dissolved organic forms of carbon, nitrogen and phosphorus in seawater using the wet-oxidation technic. *Mar. Chem.*, 66 : 161-169.
- Raimbault P., Diaz F.**, Boudjellal B., 1999b. Simultaneous determination of particulate forms of carbon, nitrogen and phosphorus collected on filters using a semi-automatic wet-oxidation procedure. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 180: 289-295.
- Raimbault P.**, Slawyk G., **Garcia N.**, 2000. Comparison between chemical and isotopic measurements of biological nitrate utilization: further evidence of low new production levels in the equatorial Pacific. *Mar. Biol.*, 136 :1147-115
- Slawyk G., **Raimbault P.** Garcia N., 1998. Measuring gross uptake of inorganic nitrogen by phytoplankton without particulate matter collection: examples from field and culture work. *Limnol. Oceanogr.*, 40.
- Slawyk G., **Raimbault P., Garcia N.**, 2000. Use of ^{15}N to measure dissolved organic nitrogen release by marine phytoplankton (reply to comment by Bronk and ward). *Limnol. Oceanogr.*, 45 :1884-1886.
- Stoens A., Menkes C., Radenac M.H., Dandonneau Y., Coste B., Grima N, Eldin G., Mémery L., Navarette C. Moutin T., **Raimbault P.** 1998. The coupled physical-new production system in the equatorial Pacific Ocean during the 1992-1995 El Niño. *J. Geophys. Res.* 104,
- Moran X.A.G., Taupier-Letage I., Dominguez E.V., Ruiz S., Arin L., **Raimbault P.**, Estrada M, 2001. Physical-biological coupling in the algerian Basin (SW Mediterranean) : Influence of mesoscale instabilities on the biomass and production of phytoplankton and bacterioplankton. *Deep-Sea Res.*, 48 :405-437
- Moutin T., **P. Raimbault**, 2001. Primary production, carbon export and nutrients availability in western and eastern Mediterranean Sea in early summer. *J. Mar. Systems*, sous presse
- Taupier-Letage I., I. Puillat, **P. Raimbault**, C. Millot, 2001. Biological response to mesoscales eddies in the algerian Basin. *J. Geophys. Res.*, sous presse
- Torretton J-P., Talbot V., **Garcia N.**, 2000. Nutrient limitation of bacterioplankton in Tuamotu atoll lagoons. *Aquatic Microbial Ecology*, 21 : 125-137.