

Bilan projet PROOF-SINPAS

<http://www.com.univ-mrs.fr/LMGEM/sinpas>



I RESUMES

- Résumé étendu

1. Objectifs

- 1) Quantifier les effets de l'accroissement de la pression hydrostatique sur les processus de minéralisation de la matière organique (transformation du POC en DOC) et régénération des éléments biogéniques (silicates, carbonates) dans les eaux intermédiaires et profondes.
- 2) Déterminer les effets de l'accroissement de la pression hydrostatique sur la dynamique de la structure des communautés procaryotiques (*Archaea* et *Bacteria*).
- 3) Etudier les effets de l'accroissement de la pression hydrostatique à la fois sur la composition et les activités procaryotiques.

2. Stratégies

Puisqu'il est difficile de suivre la dégradation de la matière organique et la régénération des éléments biogènes (comme les silicates ou les carbonates), nous avons développé des expérimentations permettant la simulation de la chute de particules avec l'équipement hyperbare déjà disponible au laboratoire. En collaboration avec une société privée (Métro-Mesures SA), nous avons développé un système semi-automatisé (SPP: *Simulateur de Plongée des Particules*) nous permettant de simuler de manière linéaire¹ l'accroissement de la pression hydrostatique jusqu'à 4000 m de profondeur (ainsi que la diminution de la température). A l'aide du SPP, nous pouvons maintenir la pression hydrostatique tout au long de l'expérimentation lors des sous-échantillonnage ou lors des transferts pour la mesure d'activités.

3. Résultats

Nous avons réalisés les premières expérimentations en utilisant les bouteilles hyperbares disponibles au laboratoire pour étudier la dégradation d'une diatomée (culture pure axénique de *Thalassiosira weissflogii*) et la régénération des silicates dans les eaux intermédiaires et profondes. Nos résultats ont montré que l'accroissement de la pression hydrostatique induit une inhibition de l'activité aminopeptidasique (impliquée dans la régénération des silicates). Ceci a pour conséquence, au moins dans les 800 premiers mètres, une diminution de la vitesse de dissolution des silicates. Aucun changement de la communauté des procaryotes n'est observé dû à l'accroissement de la pression hydrostatique. Par contre, l'ajout de particules fraîches induit un changement de la composition de la communauté où le cluster *Cytopflaga-Flavobacter* et le groupe des γ -*Proteobacteria* sont les groupes les plus dominants. La pression hydrostatique semble affecter la fonction plutôt que la structure des communautés procaryotiques.

¹ L'incrémentation peut être par exemple de 0.000017 MPa s⁻¹ pour simuler une vitesse de chute de 150 m d⁻¹

D'autres expérimentations ont été réalisées en utilisant des agrégats de diatomées et des particules fraîchement prélevées afin de tester l'ensemble des équipements du simulateur de plongée des particules. Les analyses sont en cours mais cette expérimentation nous a permis d'ajuster la stratégie expérimentale notamment lors des sous-prélèvements des aliquotes afin d'obtenir la meilleure homogénéisation possible.

L'analyse des paramètres chimiques (concentration des silicates ou des carbonates, POC, DOC, lipides,...) concomitante à l'utilisation d'outils moléculaire (empreinte génétique, sondes pour 16S rDNA – FISH) avec notre stratégie expérimentale originale nous permettra de mieux comprendre (et donc d'enrichir les modèles) de dégradation de la matière organique et la régénération des éléments biogènes dans les zones méso- et bathypélagiques.

- **Extended abstract**

1. Objectives

- 1) To quantify effects of increasing hydrostatic pressure on microbiological processes of organic matter mineralization (POC→DOC transformation) and regeneration of biogenic elements (silicic acid, carbonates) within intermediate and deep-sea waters.
- 2) To determine effects of hydrostatic pressure on prokaryotic species composition (*Bacteria and Archaea*) during sinking simulation experiments and in "neutrally buoyant floc" (atmospheric pressure) experiments.
- 3) To study effects of hydrostatic pressure both on the dynamics of prokaryotic community composition and activities.

2. Implementation plan

Because it is difficult to follow *in situ* degradation of organic matter and regeneration of biogenic elements considered as mineral ballast (e.g. silica, calcium carbonates and dust), we designed an experiment to simulate the sinking of diatom detritus using high-pressure equipments available in our lab. Then, sinking particle simulation experiments have driven us to a new technological development. Thanks to a collaboration with a private company (Metro-Mesures S.A.), we developed a new experimental device (PASS: *P*ARTICLES *S*INKING *S*IMULATOR) created to simulate particle sinking down to 4,000 m deep. This semi-automated equipment allow us to sample aliquots without decompression of the main culture, nor of the aliquot fractions, so measurements of microbial activities will be processed without decompression at any stage of the experiment. Moreover, we are able to increase pressure linearly² and decrease concomitantly the temperature.

3. Results

First, we examined the mineralization of fresh diatom detritus (with an axenic culture of *Thalassiosira weissflogii*) and regeneration of silicic acid by natural prokaryotic assemblages during sinking particle simulation. Our results indicate that the increase of hydrostatic pressure does induce an inhibition of aminopeptidase activity rates and consequently influences, at least in the first 800 m depth, the silica dissolution. Increasing pressure in sterile controls alone did not lead to biogenic silica dissolution. No changes in community structure were observed due to the pressure. In contrast, input of fresh diatom

² Increment of the hydrostatic pressure can be adjusted, for example, to 0.000017 MPa s⁻¹ to simulate a sinking rate of 150 m d⁻¹

detritus did induce a change in community structure composition where *Cytopflaga-Flavobacter* cluster and γ -*Proteobacteria* were the most abundant groups. Pressure effect seems to be effective into the function of prokaryotes instead of the structure of the community.

Another experiments have been performed using aggregates of diatoms and fresh collected particles permitting in the same time to test the whole new instruments designed. Analyses are in course but this experiment lead us to adjust some experimental strategy in particular during sub-sample of aliquots (to obtain the best homogenization of the main culture).

Combination of chemical parameter analyses (silicic acid concentration, carbonates concentration, POC, DOC, lipids,...) with molecular tools (FISH, DGGE) with new high-pressure equipments will lead to a best knowledge of degradation of POC and regeneration processes and in order to enrich corresponding models within the meso- and bathypelagic zones.

II BILAN FACTUEL

- **Moyens humains** (en Equivalents Temps Plein)

	2002	2003	2004	2005 (prévu)	Total
Chercheurs			600	800	1400
ITA			500	280	780
Thésitifs				20	20
Post-doc					
Participation étrangère			50	50	100

- **Budget complémentaire**

Origine	2002	2003	2004	2005 (demandé)	Total
Régional					
National*					
CSOA			10 K€		10 K€
SDV			10 K€		10 K€
Programme ANTARES			30 K€		30 K€
Soutien campagne					
Européen *					
Autres *					

* Le budget complémentaire a été obtenu pour le développement de l'équipement hyperbare nécessaire pour ces expérimentations.

- **Nombre de jours en mer**

Bateau	2002	2003	2004	2005 (effectué)	Total
Endeavour (USA)				8 jours	8 jours

- **Utilisation des SO/ORE** : Votre projet s'est-il appuyé sur un service d'observation ou un ORE ? Quel(s) avantage(s) en avez-vous retiré ? non.

- **Intégration internationale** :

- Votre projet PROOF s'intègre-t-il dans un cadre plus général (projet européen, projet labellisé par un programme international...)

Ce projet s'insère dans un programme américain MedFlux étudiant le rôle des minéraux ballasts impliqués dans le flux particulaire et la préservation de la matière organique (<http://www.msrb.sunysb.edu/MedFlux/>). Une attention particulière est portée sur la "twilight zone" (ou zone mésopélagique).

- Votre projet a-t-il permis de démarrer des collaborations internationales ?

Ce projet a permis de démarrer une collaboration effective avec David L. Kirchman chez qui C. Tamburini a réalisé un séjour d'un mois en 2004 notamment pour traiter les échantillons (FISH et DGGE) d'une expérimentation. D. L. Kirchman fera un séjour en tant que Professeur associé en novembre 2005.

Ce projet contribue à maintenir différents liens internationaux avec C. Lee et collaborateurs (USA) et L. Giuliano et M. Yakimov (CNR, Italie).

- **Interaction avec le service base de données PROOF** :

- L'ensemble des données générées par le projet sont-elles sur la BD PROOF ?
Non
- Sinon, quelle proportion reste à transmettre ?
L'ensemble des données obtenues lors des différentes expérimentations.
- Avez-vous été confronté à des problèmes de transmission ?

- **Liste des publications**

Tamburini C., Garcin J., Grégori G., Leblanc K., Rimmelin P., Kirchman D.L. (2006). Pressure effects on surface Mediterranean prokaryotes and biogenic silica dissolution during a diatom sinking experiment. *Aquatic Microbial Ecology* **43**(3): 267-276 

- **Liste des communications à des colloques internationaux**

Tamburini C.; Garcin, J.; Grégori, G.; Leblanc, K.; Rimmelin, P.; Kirchman, D.L. *Role of hydrostatic pressure on surface marine prokaryotes responsible for biogenic silica dissolution during a simulated diatom sinking experiment*. European Geosciences Union General Assembly 2005, Vienne, Autriche, 24-29 avril 2005. **Sollicited speaker**.

Tamburini C.; Garcin, J.; Dao M.; Kirchman, D.L. *Experimental strategies to study effect of pressure on prokaryotes: experimental and in situ device*. 9th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, Helsinki, Finlande, 21-26 Août 2005.

- **Nombre de thèses en relation avec le projet : (Nom, université de rattachement, titre de la thèse)**

Première collaboration réalisée avec B. Moriceau (LEMAR, Brest) sur la dégradation et la régénération des silicates des agrégats de diatomées.

- **Retombées du projet vers le privé (brevet, développement technique....)**

III BILAN SCIENTIFIQUE [2 pages maximum (Times 12 pt), figure incluse]

La minéralisation par une communauté procaryotique naturelle et la dissolution des silicates de détritiques frais de diatomée (culture pure axénique de *Thalassiosira weissflogii*) ont été analysées lors d'expérimentations simulant la chute de ces détritiques le long de la colonne d'eau entre 200 et 1400 m de profondeur. A l'aide des bouteilles et de l'équipement hyperbare déjà disponible au laboratoire, nous avons simulé une chute des diatomées en augmentant la pression hydrostatique de 1.5 MPa chaque jour. Les résultats obtenus ont été comparés à des incubations réalisées à pression atmosphérique. Des contrôles sans ajout de détritiques de diatomées ou sans procaryotes ont été également réalisés. Nous avons démontré que l'accroissement de la pression hydrostatique était toujours plus faible à pression hydrostatique croissante qu'à pression atmosphérique. Par exemple, lors des incubations en présence de détritiques de diatomées et d'assemblage naturel de procaryotes, la vitesse d'activités aminopeptidasiques étaient de $1.1 \mu\text{mol AMC hydrolyzé L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ au jour 4 quand la pression hydrostatique était de 8 MPa correspondant à une profondeur de 800 m alors que la vitesse à pression atmosphérique était de $2.5 \mu\text{mol AMC hydrolyzé L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. La diminution de l'activité aminopeptidasique lorsque la pression hydrostatique augmente semble affecter la dissolution de la silice biogénique au moins au début de l'incubation, i.e dans les 800 premiers mètres. En effet, la régénération de l'acide silicilique était très faible ($0.07 \pm 0.02 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) sous pression hydrostatique croissante durant les 4 premiers jours (i.e. entre 200 et 800 m de profondeur) alors que les vitesses de régénération de l'acide silicilique était beaucoup plus important à pression atmosphérique ($0.32 \pm 0.05 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). L'accroissement de la pression hydrostatique seule (cf. contrôle stérile, figure 1 rapport 2004) ne conduisait pas à la dissolution de la silice biogénique ce qui semble montrer que c'est l'action concomitante de la dégradation par les activités aminopeptidasiques dans les 800 premiers mètres et l'action physique de la pression hydrostatique qui provoquent une dissolution de la silice biogénique à une vitesse comparable de celle réaliser à pression atmosphérique. Au contraire, l'apport de matériel frais de détritiques de diatomées induit un changement de la structure de la communauté procaryotique où le cluster des *Cytopflaga-Flavobacter* et le groupe des *γ-Proteobacteria* représentaient les groupes dominants des procaryotes (figure 1).

Un développement technologique a été réalisé afin d'affiner les expérimentations de simulation de la chute des particules ; le simulateur de plongée des particules (SPP) comprend :

- un générateur de pression piloté (GPP) nous permet d'augmenter la pression hydrostatique de manière linéaire et permet d'améliorer le transfert et le sous-échantillonnage des aliquotes.
- un système d'agitation spécialement conçu pour les bouteilles hyperbares permettant de maintenir en suspension les particules ajoutés.
- un système de refroidisseur permettant une diminution de la température lors de la chute des particules.

De plus, le besoin de mesurer *in situ*, la respiration des procaryotes à l'intérieur des bouteilles hyperbares pour étudier l'effet de la pression hydrostatique sur la consommation de l'oxygène nous a conduit au développement de nouveau prototype hyperbare en cours de conception et réalisation.

Au cours de notre participation à la campagne MedFlux (du 7 au 15 mars 2005), nous avons réalisé la simulation de la chute de particules fraîchement prélevées et séparées selon leur vitesse de chute de manière concomitante à des analyses *in situ*. Les analyses de la

concentration des silicates, du POC, du DOC, des lipides, de la structure et de l'activité des procaryotes durant 8-10 jours d'incubation est en cours de réalisation³.

Nous espérons que ce type d'expérimentations permettront d'enrichir les modèles de minéralisation de la matière organique et de régénération d'éléments biogènes (comme les silicates, carbonates,...) dans les zones méso- et bathypélagiques.

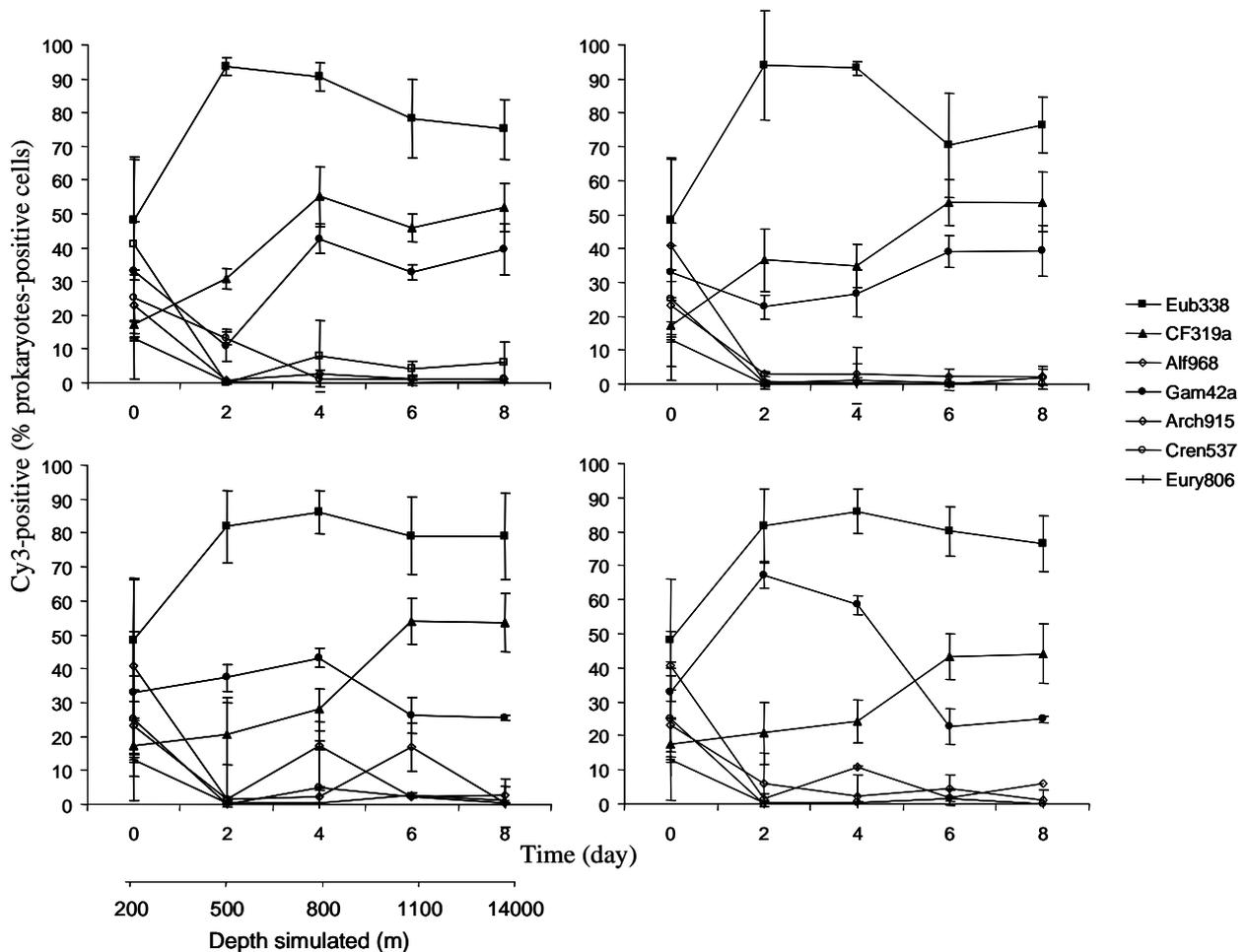


Figure 1. Percent of total prokaryotes (DAPI stained cells) detected by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) over time.

Pourcentage de cellules détectées par sondes fluorescentes in situ (FISH) par rapport aux procaryotes totaux (cellules colorées au DAPI).

Detritus – High pressure: incubation with Fresh Diatom (*Thalassiosira weissflogii*) Detritus under increasing hydrostatic pressure conditions (1.5 MPa d⁻¹ in order to simulate a sinking fall of 150 m per day); Detritus – Atmospheric: incubation with detritus at atmospheric pressure; Control – High pressure: incubation without detritus under increasing hydrostatic pressure conditions (1.5 MPa d⁻¹); Control – Atmospheric: incubation without detritus at atmospheric pressure. Sequences of Cy3-labeled probes used are listed in table 1. Eub338: *Bacteria* ; CF319a: *Cytophaga-Flavobacter* cluster of the *Cytophaga-Flavobacter-Bactroides* division ; Alf968, Gam42a : α -subclass and γ -subclass of *Proteobacteria* ; Arch915: *Archaea*; Cren537: *Crenobacteria* ; Eury806: *Eurybacteria*.

³ au moment de l'écriture de ce bilan

IV REMARQUES

Le programme [SINPAS](#) a permis de poser les bases d'une nouvelle thématique et a ainsi permis de valider une nouvelle méthodologie. La suite logique de SINPAS a été le programme [ANR POTES](#) (Pressure effects On marine prokaryoTES, 2005-2008) qui porte sur l'effet de la pression sur les procaryotes dont les axes principaux sont ceux du programme SINPAS à une plus large envergure.

- **Appréciation éventuelle du rôle du CS PROOF dans la conduite de votre projet**

Le rôle du CS PROOF dans la conduite du projet est bien entendu bénéfique dans le sens où des critiques constructives sont formulées permettant des ajustements ou recadrage du projet.