

MESURE DE LA PRODUCTION PHOTOSYNTHETIQUE PARTICULAIRE ET DISSOUTE

Ch. VAN BEVEREN

INTRODUCTION

Le carbone fixé photosynthétiquement par le phytoplancton accroît sa biomasse cellulaire (production particulaire) mais peut être excrété dans le milieu sous forme de petites molécules organiques (production dissoute). L'importance relative de ces deux flux varie suivant les conditions de croissance des cellules phytoplanctoniques et suivant leur état physiologique. On ne peut nier l'intérêt écologique de quantifier ces deux flux pour différents types de milieu si l'on sait que le premier alimente la chaîne trophique classique phytoplancton → herbivore → carnivore et que le second contribue au développement des bactéries hétérotrophes qui elles-mêmes assurent un recyclage rapide des nutriments. Ce travail consiste en une estimation des taux de production particulaire et dissoute dans 3 milieux différents : 1 milieu riche (point côtier de la mer du Nord, devant Ostende), 1 milieu oligotrophe (Manche) et 1 milieu estuarien (Escaut au niveau de Hansweert).

MATERIEL ET METHODES

1° Problèmes méthodologiques

Les vitesses d'assimilation photosynthétique du carbone sont estimées par la méthode d'incorporation du ^{14}C de Steeman Nielsen. Production particulaire et production dissoute sont estimées après filtration de l'échantillon incubé. De nombreux problèmes méthodologiques sont associés à la mesure de l'excrétion :

a) Temps d'incubation

La mesure du flux de production dissoute selon la méthode classique de l'incorporation de ^{14}C inorganique est compliquée par la présence de bactéries dans l'échantillon incubé. Ces dernières utilisent sélectivement les produit excrétés suivant les besoins de leur croissance et modifient ainsi la mesure de la quantité et de la composition biochimique des produits excrétés si le temps d'incubation choisi pour effectuer la mesure est trop long. Nalewajko et alii (1976) ont montré à l'aide de cinétiques effectuées d'une part sur des cultures axéniques et non axéniques et d'autre part en eau douce que les temps d'incubation habituellement utilisés pour mesurer la production primaire (2 à 4 h.) ne donnent qu'une valeur nette de l'excrétion. Dans les expériences précitées, le temps de réponse des bactéries est de l'ordre de 20 min. De même, un temps d'incubation trop court peut donner lieu à une sousestimation de la production dissoute si les pools carbonés du phytoplancton ne sont pas uniformément marqués. En conséquence les vitesses initiales d'excrétion caractéristiques des 3 milieux choisis pourront être estimées le mieux grâce à des cinétiques rapides (temps d'incubation très courts) de fixation particulaire et d'excrétion.

b) Définition de la matière particulaire et dissoute

- choix du filtre :

Ce travail faisant partie d'un programme plus vaste où stocks et flux de matières organiques particulaires et dissoutes (POM et DOM) sont mesurés, des filtres identiques seront utilisés. Pour les besoins de l'analyse chimique, des filtres en fibres

de verre (GF/C) ont été choisis. Il est probable que des filtres d'une telle porosité (0.8 à 1 μ) laissent passer les bactéries libres ce qui complique l'interprétation des résultats. A titre de comparaison des filtres de différentes porosités (1, 0.45 et 0.2 μ) ont été testés dans la Manche.

-filtration des échantillons :

Le vide utilisé pour la filtration des échantillons doit être très faible ($\ll$ 50 mm Hg) afin d'éviter la lyse des cellules, ce qui donnerait lieu à une surestimation des produits excrétés.

c) Impuretés organiques présentes dans la solution commerciale de bicarbonate marqué

Des tests effectués sur nos ampoules (^{14}C Agency Denmark) montrent que le taux des impuretés organiques est de l'ordre de 0.001 %. Néanmoins un temps zéro contrôle sera effectué lors de chaque expérience.

d) Mesure de la production dissoute

La mesure du ^{14}C organique présent dans le filtrat nécessite l'élimination du bicarbonate marqué non utilisé par le phytoplancton. Celle-ci est obtenue par acidification de l'échantillon et déplacement du CO_2 par un courant gazeux ("bullage"). Il est à remarquer qu'un tel processus élimine tout le $^{14}\text{CO}_2$ y compris celui résultant de la respiration du phytoplancton et des bactéries et dont l'information est perdue. Dans le processus utilisé, la pression du gaz et le temps de bullage sont fonction de l'échantillon et de la géométrie de l'appareil utilisé. En conséquence, les conditions d'élimination du ^{14}C inorganique doivent être précisées pour chaque échantillon.

2° Processus experimental

La profondeur d'échantillonnage a été fixée à 3 m pour les 3 milieux étudiés.

Les mesures de production primaire sont réalisées dans des bouteilles Sovirel (100 ml pour la cinétique, 200 ml pour l'incubation "in situ") auxquelles 12 μ Ci de bicarbonate ^{14}C sont ajoutés.

Les bouteilles destinées à la cinétique sont incubées sur le pont dans un bassin à circulation ($\rightarrow$ 100% lumière). Les temps de cinétique sont 0, 10, 20, 30 min., 1, 2, 3, 4 h. D'une manière générale, il est préférable de toujours se rapprocher le plus possible des conditions de croissance de l'échantillon prélevé et donc d'effectuer les incubations "in situ". Les temps très courts de cinétique ne permettent pas une telle expérience, mais, à titre de comparaison un échantillon a été incubé "in situ" pendant 4 h. Directement après l'incubation, chaque échantillon est filtré sur filtre GF/C 25 mm $\varnothing$. Le filtre est rincé avec de l'eau de mer filtrée de la profondeur. Filtres et filtrats sont immédiatement congelés jusqu'au moment de l'analyse.

- mesure de la production particulaire :

La radioactivité est mesurée par scintillation liquide.

Le milieu scintillant utilisé est :

lumasolve / H_2O_2 //	30 min	// lumagel / ac. ascorbique 15%
1 ml 100 μ l		10 ml 40 μ l

Temps de comptage : 10 min.

Erreur demandée : 1%

N.B. pour chaque milieu scintillant utilisé, l'efficacité du comptage est calculée à l'aide d'une solution étalon d'hexadécane ^{14}C

- mesure de la production dissoute :

L'élimination du bicarbonate marqué s'obtient par acidification du filtrat avec H_2SO_4 ($\rightarrow$ pH 2 à 3) et déplacement du CO_2 formé par un courant d'air. Le gaz carbonique chassé est piégé dans une solution de NaOH 5M

La radioactivité du filtrat est mesurée par scintillation liquide 5 ml du filtrat traité sont ajoutés à 10ml de lumagel.

Temps de comptage : 20 min. pour une erreur de 1%.

Dans le processus décrit ci-dessus, la pression du gaz et le temps de bullage sont critiques. Il s'agit donc d'optimiser les conditions expérimentales afin que celles-ci n'entraînent pas la perte de molécules organiques volatiles et/ou la modification du milieu au point que l'élimination du bicarbonate marqué soit plus complexe. A titre d'exemple, les ions CO_3^{--} formés peuvent complexer les ions NH_4^+ du milieu et former un carbamate. Les tests préliminaires suivant ont donc été effectués :

1) Estimation des pertes de molécules organiques

Des cinétiques de bullage ont été appliquées à des solutions de glycollate ^{14}C et d'acétate ^{14}C dans de l'eau de mer synthétique, traitées de manière identique aux filtrats de production primaire. La perte de radioactivité enregistrée après 15 min. de bullage est peu importante :

glycollate : 1%, acétate : 2%

2) Cinétiques d'élimination du bicarbonate marqué dans différents

milieux : eau de mer synthétique

eau de mer filtrée (Nieuport)

eau de mer filtrée stérile (Nieuport)

éch. incubé "in situ" (Ostende)

+ 12 μCi

éch. incubé "in situ" (Manche 1 et 2) }
 temps de cinétique (Ostende) } + 12 μCi

Résultats : graphiques I et II

A l'exception de l'échantillon "Manche 1", l'élimination du bicarbonate est rapide et complète après 5 min. de bullage. Il convient cependant de rechercher pour chaque milieu utilisé les meilleures conditions d'élimination du bicarbonate afin d'éviter tout artéfact dû à la composition du milieu comme cela semble être le cas pour l'échantillon "Manche 1".

Des cinétiques de bullage ont été effectuées pour chaque échantillon prélevé à Ostende (graphiques II) et à Hansweert. Il n'a malheureusement pas été possible de le faire dans la Manche où les temps de bullage ont été fixés à 15 min.

- étalonnage des ampoules ^{14}C

Immédiatement après l'addition du ^{14}C dans eau de mer, 1 ml de l'eau de mer marquée est transvasé dans un flacon à scintillation contenant 500 μl de NaOH 0.1 N pour éviter tout dégagement de $^{14}\text{CO}_2$. Le milieu scintillant utilisé pour mesurer la radioactivité est le lumagel

RESULTATS

1° Productions particulières et dissoutes mesurées dans la zone côtière située devant Ostende (181077)

Incubations :

cinétique (100% lumière) : 11 h 01 à 15 h 01

incubation "in situ" (16% lumière) : 11 h 20 à 15 h 20

$\text{CO}_2 = 22344 \mu\text{g/l}$

Résultats : tableau I et Graphique III

- fixation particulière :

La fixation particulière croît linéairement en fonction du temps pendant les 3 premières heures de la croissance ($v = 9 \mu\text{g/lh}$)
A partir de la 4^{ème} heure d'incubation, on observe un ralentissement de la croissance qui pourrait être dû à une diminution de l'énergie lumineuse disponible.

- production dissoute :

L'examen du graphique III conduit à 2 interprétations et donc à 2 estimations de la vitesse d'excrétion selon que le point de cinétique "1 h." est considéré ou non. En effet, la constance remarquable des taux d'excrétion pourrait suggérer un doute quant à la faible production dissoute mesurée après 1 h d'incubation.

3) la production dissoute mesurée après 1 h est réelle :

l'examen du graphique met en évidence 2 phases dans le processus d'excrétion dont les vitesses sont respectivement :

$0.79 \mu\text{gC/lh}$ et $7.29 \mu\text{gC/lh}$

L'augmentation de la vitesses d'excrétion, après 1 h. d'incubation pourrait correspondre à l'apparition de molécules organiques marquées plus tard dans la séquence métabolique. Au plateau, production dissoute et consommation par les hétérotrophes μ sont en équilibre. Par extrapolation, on peut estimer cette activité hétérotrophe à $5.4 \mu\text{gC/lh}$. Ce chiffre est du même ordre de grandeur que celui estimé à partir de la respiration anaérobie ($\rightarrow 2 \text{ à } 8 \mu\text{gC/lh}$). Cette dernière doit cependant être considérée avec beaucoup de précautions car calculée pour une incubation de 4 h.

b) la production dissoute mesurée après 1h est erronée :

Dans ce cas la production dissoute varie linéairement en fonction du temps d'incubation et quelle que soit la production particulière, elle représente toujours 40 à 45% de celle-ci (du moins pendant les 4 premières heures de l'incubation).

La vitesse d'excrétion est estimée dans ce cas à 6.2 $\mu\text{gC/lh}$.

- comparaison entre un échantillon prélevé à 3m et incubé 4h à 3m (16% lumière) et un échantillon prélevé à 3m incubé 4h à 100% lumière.:

	Prod. part. $\mu\text{gC/lh}$	Prod. dis. $\mu\text{gC/lh}$	% excrétion
100% lumière	7.28	6.2 à 6.8	46%
16% lumière	7.88	2.56	25%

L'échantillon prélevé à 3m et incubé à 100% de lumière fixe photosynthétiquement plus de carbone que celui incubé à 16% de lumière. Cet accroissement de carbone est totalement libéré dans le milieu puisque les productions particulières restent inchangées.

2° Productions particulières et dissoutes mesurées dans la zone estuarienne au niveau de Hansweert (211077)

Incubations :

cinétique (100% lumière) : 09 h 50 à 13 h 50

incubation "in situ" ($\angle$ 6% lumière) : 09 h 40 à 13 h 45

$\text{CO}_2 = 26906 \mu\text{gC/l}$

Resultats : tableau I et graphique IV

L'examen du graphique met en évidence une croissance linéaire de la fixation particulière et de la production dissoute après 30 min. d'incubation et pendant au moins 4 h.

La vitesse de fixation particulaire est estimée à 13.91 $\mu\text{gC/lh}$ et la vitesse de production dissoute à 0.48 $\mu\text{gC/lh}$ ce qui fixe le taux d'excrétion à 4%

Comparaison entre un échantillon prélevé à 3m et incubé 4h à 3m et 1 échantillon prélevé à 3m incubé à 100% lumière :

	Prod. part. $\mu\text{gC/lh}$	Prod. dis. $\mu\text{gC/lh}$	% excrétion
100% lumière	11.98	0.53	4%
< 6% lumière	2.95	0.57	16%

A l'inverse du phytoplancton d'Ostende, l'augmentation de l'énergie lumineuse conduit à Hansweert à un accroissement considérable de la fixation particulaire sans accroître la production dissoute. Une telle différence, pour des populations de biomasse semblable (3.45 $\mu\text{g chl.a/l}$ à Ostende et 3.79 à Hansweert) pourrait s'expliquer par la différence d'ensoleillement des deux journées de prélèvement (181077 : temps ensoleillé et incubation autour de midi; 211077 : temps gris et incubation avant midi).

3° Productions particulaires et dissoutes mesurées dans la Manche (191077)

Incubations :

cinétique (100% lumière) : 11 h 45 à 15 h 45

incubation "in situ" (35% lumière) : 11 h 25 à 15 h 25

$\text{CO}_2 = 20275 \mu\text{gC/l}$

Résultats : tableaux I et II, graphique V

La cinétique de fixation particulaire montre un ralentissement de la croissance dès la deuxième heure d'incubation.

L'examen de la courbe de production dissoute suggère ici

également un processus d'excrétion en deux phases dont les vitesses sont respectivement 4.35 et 0.50 $\mu\text{gC/lh}$.

Il faut toutefois rappeler qu'il n'a pas été fait de cinétique de bullage pour chaque point de la cinétique ainsi qu'il l'a été fait pour les autres stations. Il peut donc y avoir eu des complications au niveau de l'élimination du ^{14}C inorganique d'autant plus importantes que le bicarbonate à éliminer est plus grand et donc que les temps d'incubations sont plus courts.

Une vitesse initiale d'excrétion de 4.35 $\mu\text{gC/lh}$ est-elle compatible avec d'autres résultats observés?

Une excrétion initiale aussi importante peut s'expliquer par le choc crée par un changement brusque des conditions lumineuses (Sharp, 1977). Cependant la disparition rapide des molécules excrétées suppose un uptake par les hétérotrophes supérieurs à 1 μ de 3.85 $\mu\text{gC/L}$ en 30 min.

La vitesse de fixation de quelques substrats organiques par les hétérotrophes totaux est estimée très inférieure à 3.85 $\mu\text{gC/l}$ (G. Billen). Il est toutefois évident que des substrats organiques autres que ceux testés peuvent avoir été libérés dans le milieu en grandes quantités.

Il ya donc lieu de répéter soigneusement cette cinétique de production dissoute à des temps très courts et d'examiner de manière plus rationnelle l'effet des chocs lumineux.

Estimation de l'activité hétérotrophe des bactéries libres :

Le tableau II montre que la radioactivité des filtrats est similaire pour les porosités 0.45 et 0.2 μ ce qui implique l'obtention d'un filtrat stérile avec un filtre de 0.45 μ .

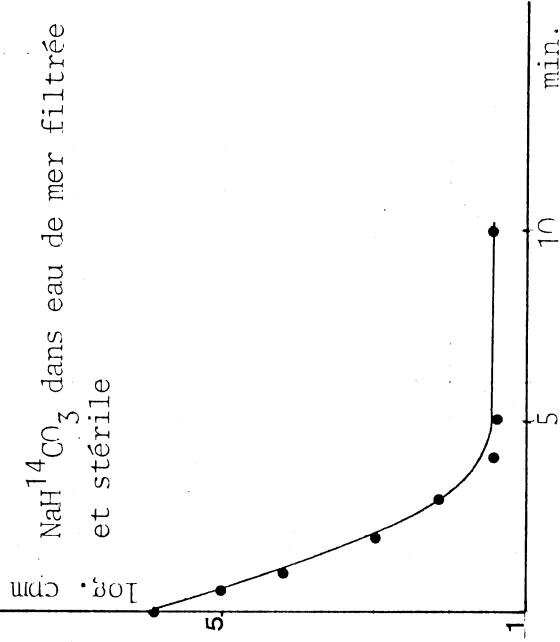
La radioactivité des particules inférieures à 0.2μ est en fait celle des molécules excrétées par le phytoplancton et non consommées par les hétérotrophes.

Ici également deux interprétations sont possibles pour l'estimation de l'activité hétérotrophe :

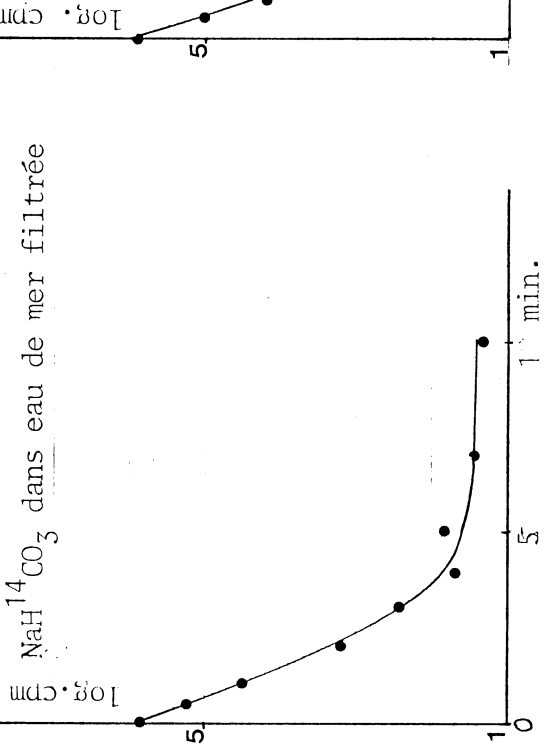
- les résultats obtenus pendant la première $1/2$ h d'incubation ne sont pas erronés et la vitesse initiale de fixation par les hétérotrophes est de $4.35 \mu\text{gC/lh}$
- si les mesures effectuées avant la première heure d'incubation sont erronées, l'activité hétérotrophe des bactéries libres est estimée à $0.27 \mu\text{gC/lh}$

Graphique I : CINÉTIQUES DE BULLAGE

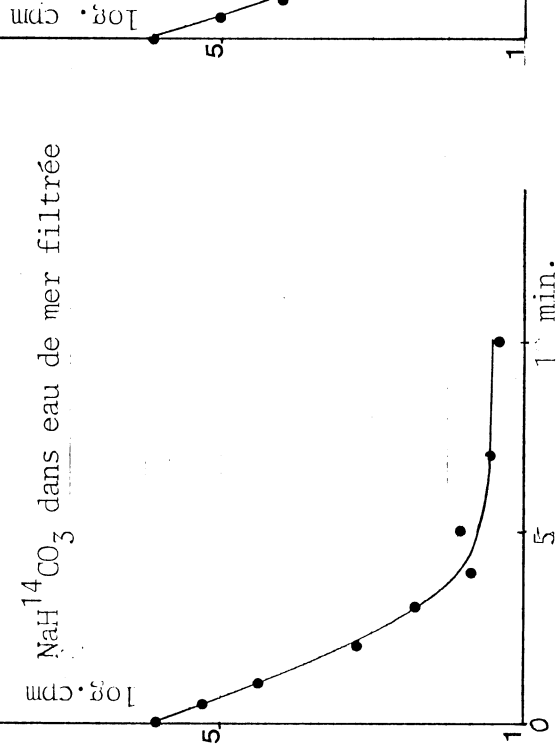
$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ dans eau de mer synthétique



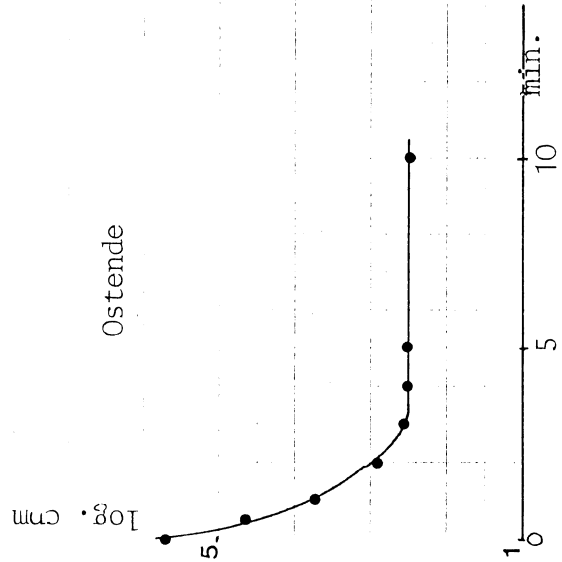
$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ dans eau de mer filtrée



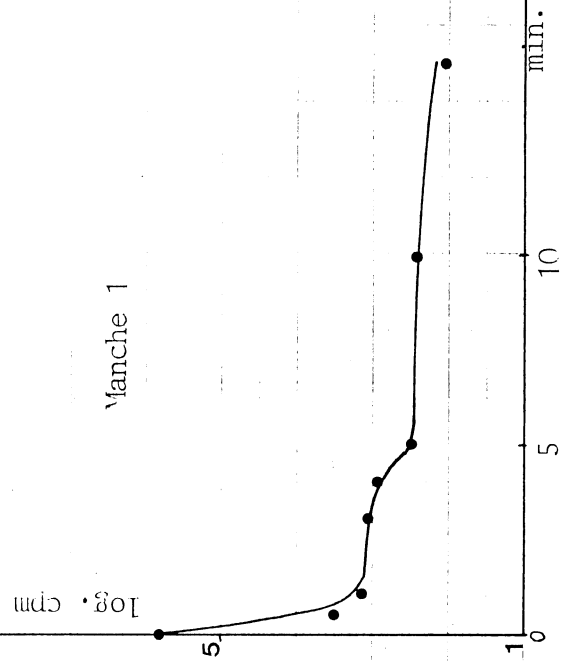
$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ dans eau de mer filtrée et stérile



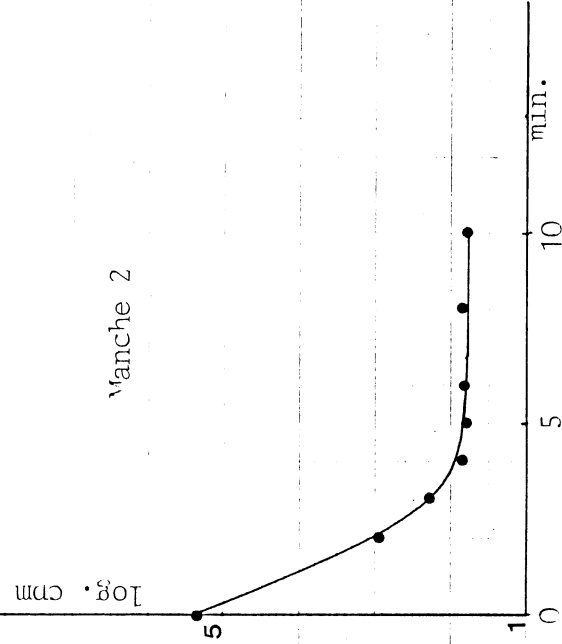
Ostende



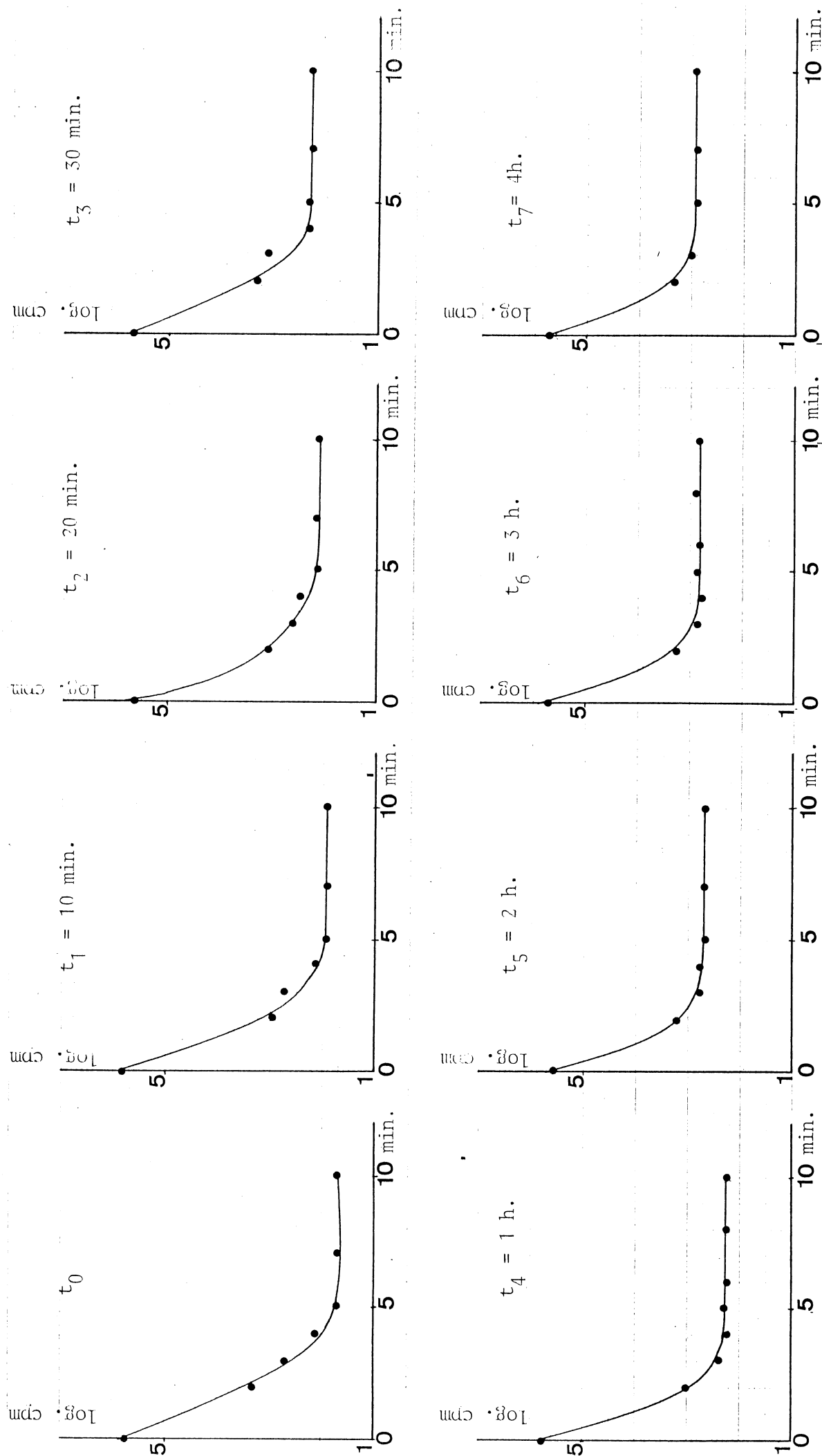
Manche 1



Manche 2

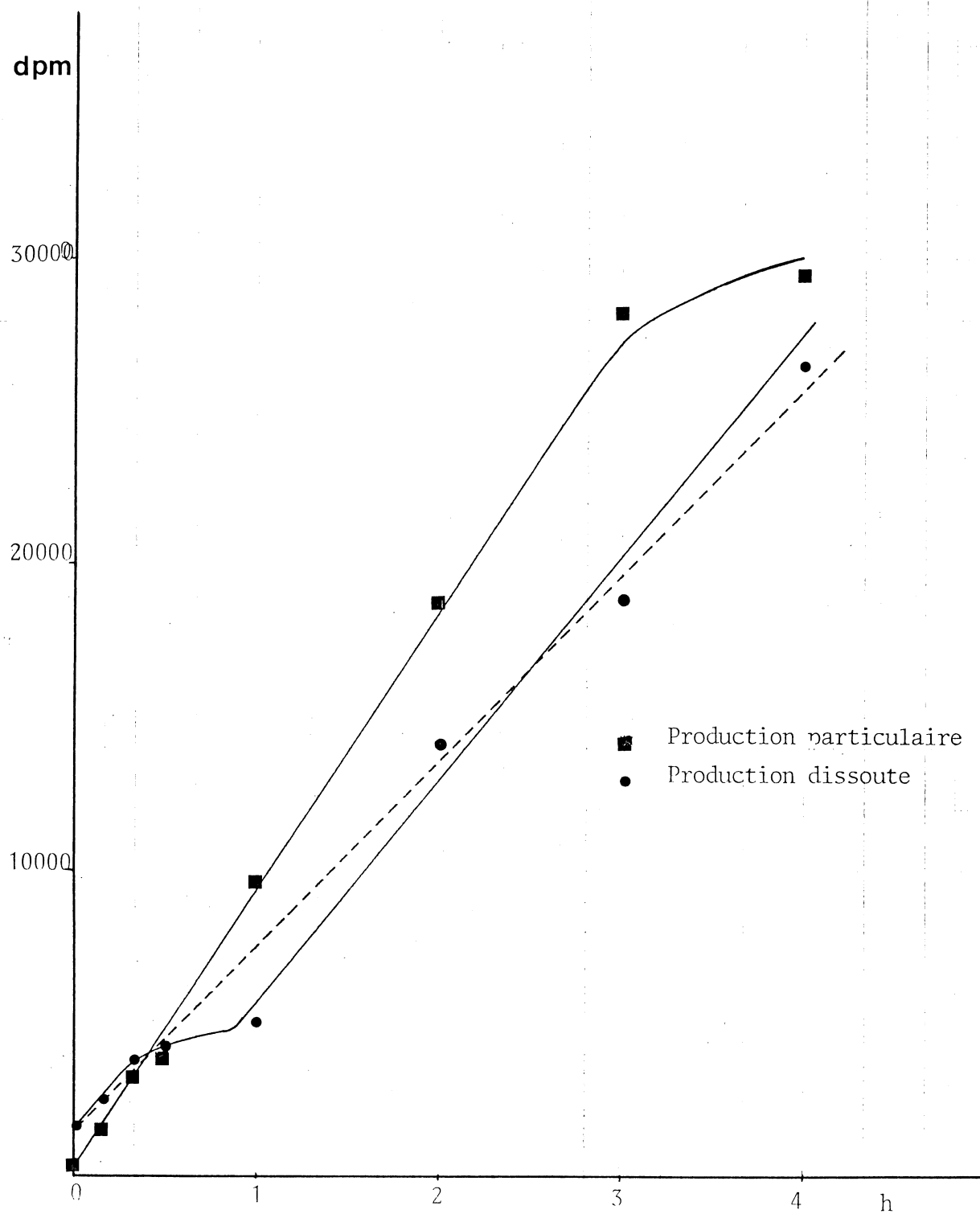


Graphique II : CINETIQUES DE BULLAGE

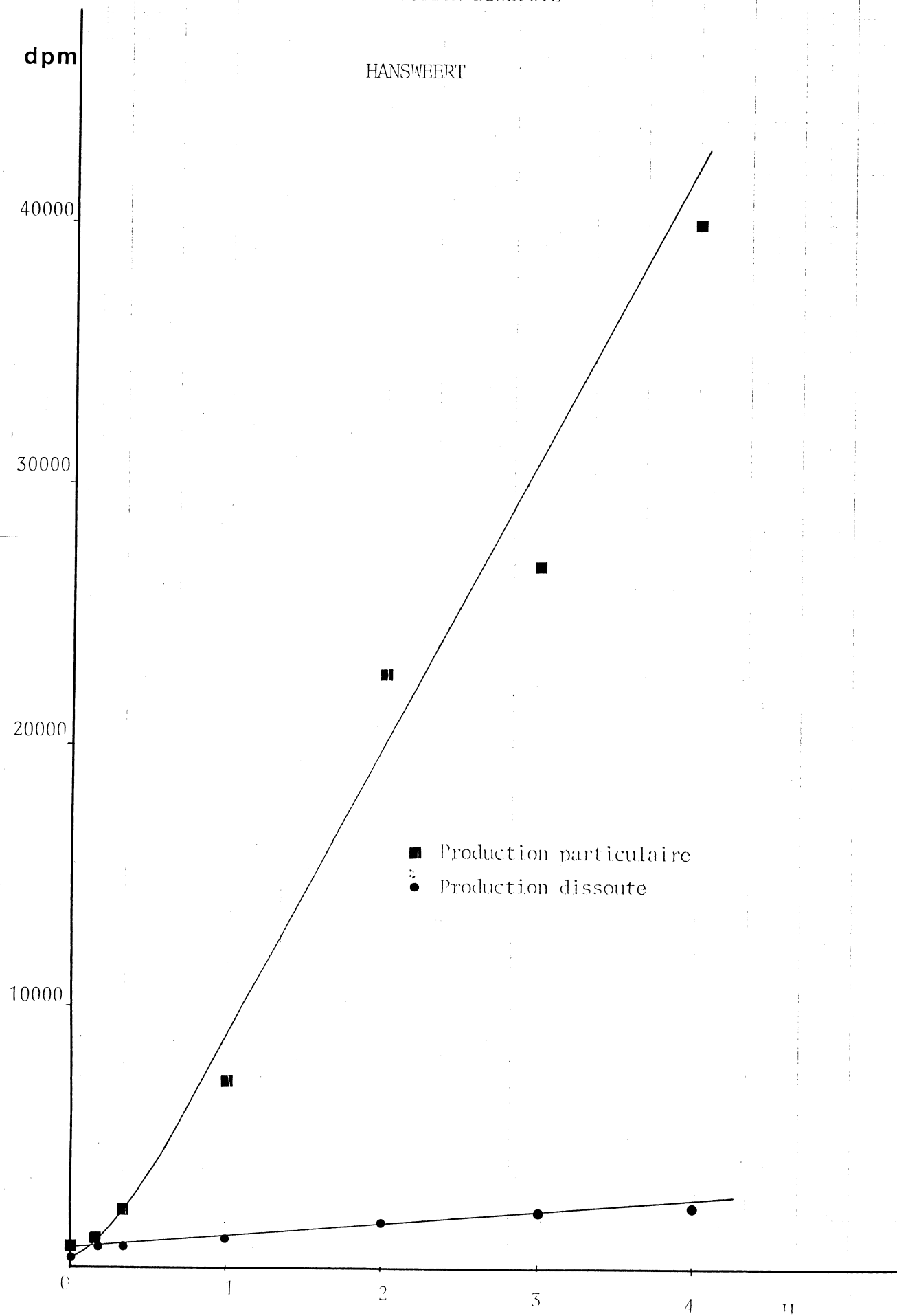


Graphique III : CINETIQUE DE FIXATION PARTICULAIRE ET DE
PRODUCTION DISSOUE

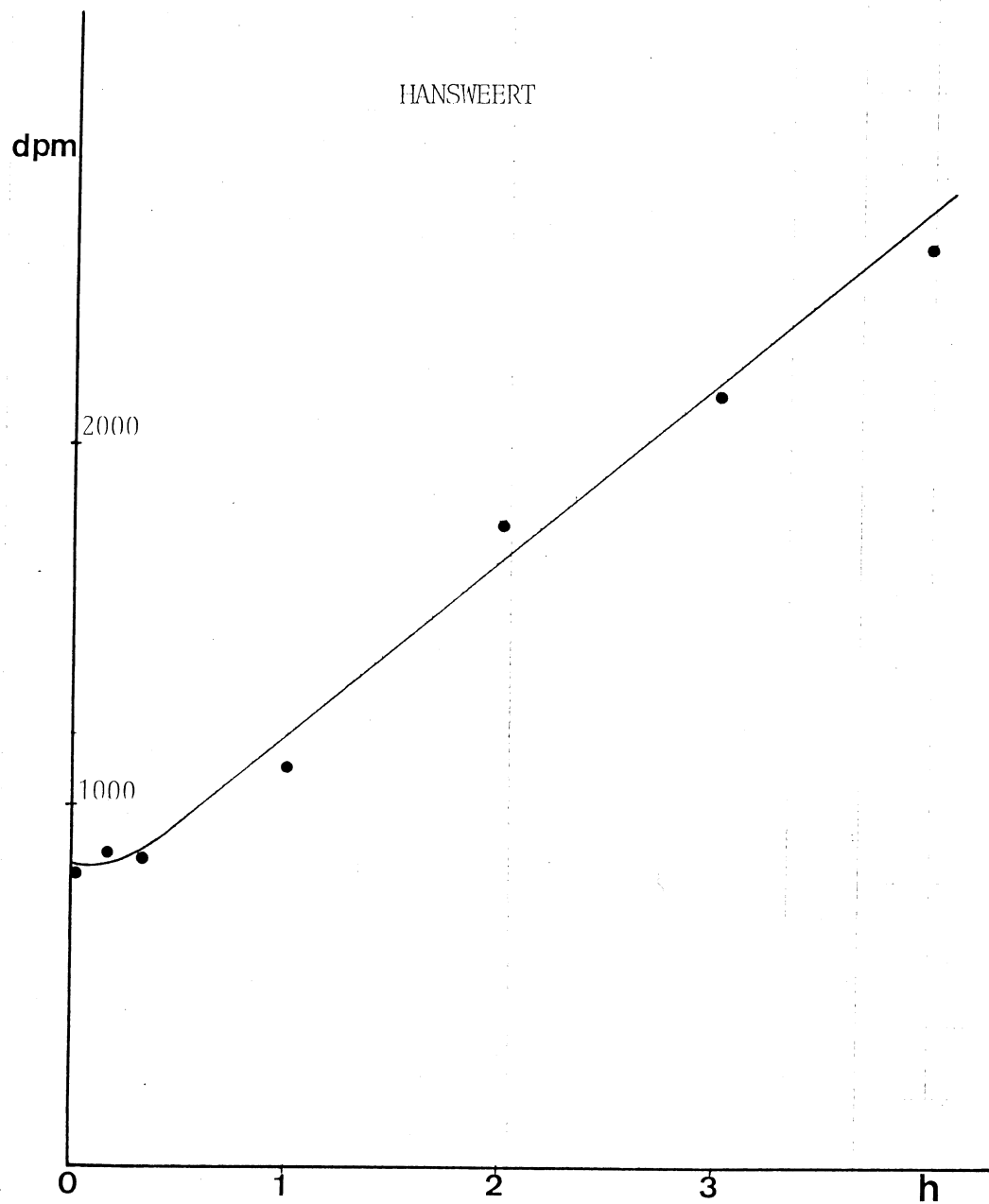
OSTENDE



Graphique IV : CINETIQUE DE FIXATION PARTICULAIRE ET DE PRODUCTION DISSOUE



Graphique IV_b CINETIQUE DE PRODUCTION DISSOUTE



Graphique V : CINETIQUE DE FIXATION PARTICULAIRE ET DE PRODUCTION DISSOUTE

MANCHE

- Production particulaire
- Production dissoute particules $<1\mu$
- ▲ PARTICULES $<0.2\mu$

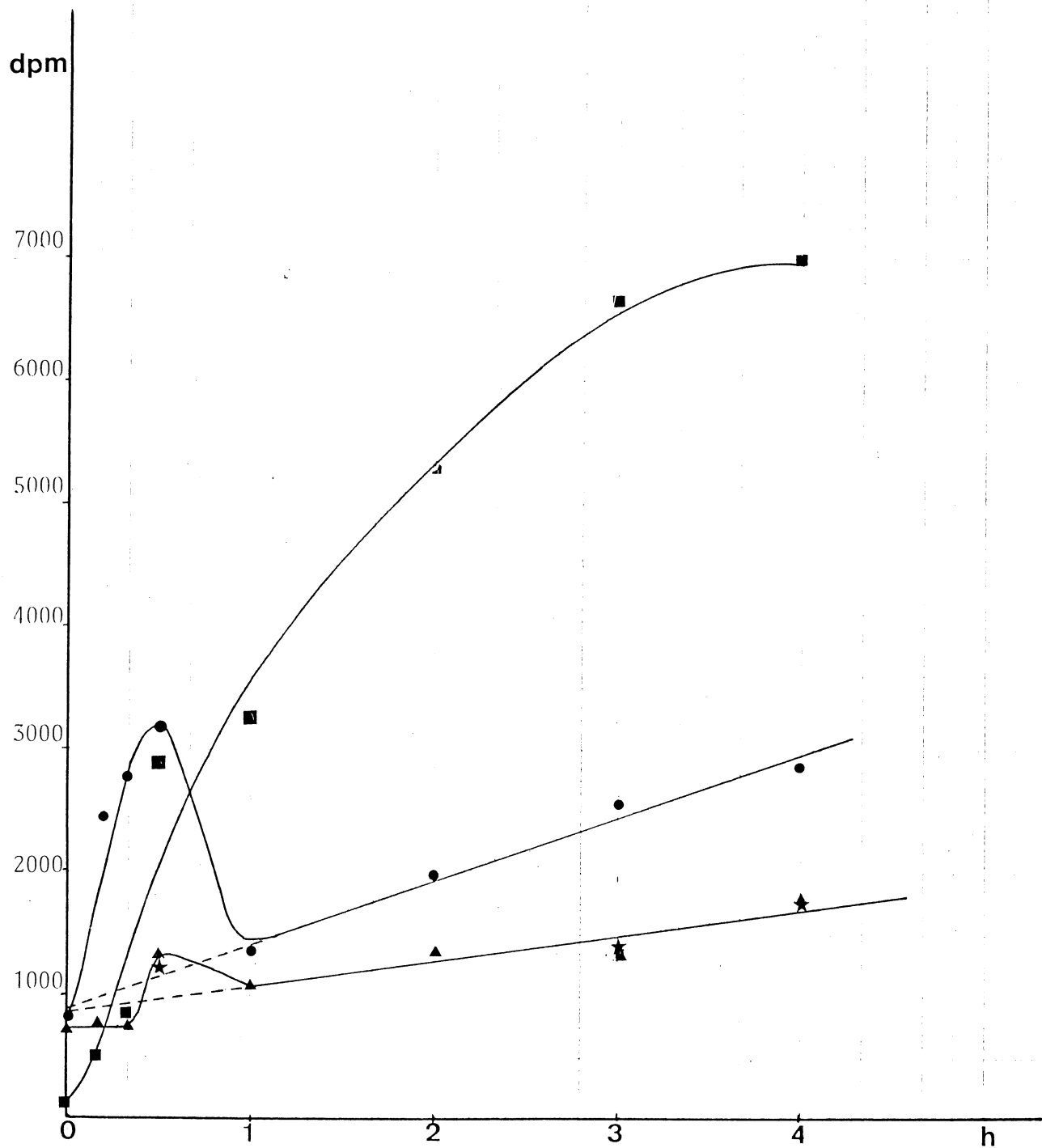


Tableau I

CINETIQUE DE FIXATION PARTICULAIRE ET DE PRODUCTION DISSOUTE

Tps. incubation	Fix. part. dpm	Prod. dis. dpm	Taux excrétion fixation totale
Ostende 181077 :			
0	408	1611	
10 min.	1534	2500	44%
20 min.	3256	3833	44%
30 min.	3923	4138	42%
1 h.	9779	5000	27%
2 h.	18841	14139	40%
3 h.	28363	18944	38%
4 h.	29572	26583	46%
Hansweert 211077 :			
0	364	819	
10 min.	1079	875	7%
20 min.	2237	861	2%
30 min.	3781	—	—
1 h.	7210	1111	4%
2 h.	22779	1792	4%
3 h.	26956	2153	4%
4 h.	40004	2569	4%
Manche 191077 :			
0	102	819	
10 min.	516	2486	78%
20 min.	872	2792	33%
30 min.	2934	3292	44%
1 h.	3260	1375	14%
2 h.	5337	1973	16%
3 h.	6648	2569	19%
4 h.	6991	2889	20%

Tableau II

PRODUCTIONS DISSOUTES MESUREES DANS LA MANCHE : TESTS DE FILTRES
DE POROSITES DIFFERENTES

Tps. incubation	Prod. dis. 1μ dpm	Prod. dis. $.45\mu$ dpm	Prod. dis. $.2\mu$ dpm
0	819	667	750
10 min.	2486	778	833
20 min.	2792	778	847
30 min.	3292	1333	1264
1 h.	1375	1069	—
2 h.	1972	1347	1444
3 h.	2569	1333	1388
4 h.	2889	1795	1750

Tableau III : MESURES "IN SITU" DE PRODUCTION PRIMAIRE PARTICULAIRE ET DISSOLUE ET DE RESPIRATION ANAPLEROTIQUE

Stations	date	h. incubation	prod. part. $\mu\text{gC/lh}$	prod. dis. $\mu\text{gC/lh}$	total $\mu\text{gC/lh}$	% exc.	resp. ana. $\mu\text{gC/lh}$
Ostende	180777	11h55 à 16h10	85.3	3	88.3	3%	1.40
Hansweert	190777	11h00 à 14h50	5.24	0.70	5.94	12%	0.10
Manche			0.83	2.81	3.64	72%	0.13
Ostende	181077	11h20 à 15h20	7.88	2.56	10.44	25%	0.16
Hansweert	211077	09h40 à 13h45	2.95	0.57	3.52	16%	0.10
Manche	191077	11h25 à 15h25	1.58	0.64	2.22	29%	0.01

REFERENCE

C. Nalewajko, T.G. Dunstall & H. Shear 1976

Kinetics of extracellular release in axenic algae and in mixed algal bacterial cultures : significance in estimation of total (gross) phytoplankton excretion rates.

J. Phycol. 12, 1-5