

MESURES DE LA PRODUCTION PRIMAIRE TRANSITION DES PROTOCOLES ^{14}C - ^{13}C

MEASUREMENTS OF PRIMARY PRODUCTION TRANSITION OF THE ^{14}C – ^{13}C PROTOCOLS

CAMPAGNE 2013 ET COMPLÉMENTS 2014

PAR

Marie-Elodie PERGA, Remy TADONLEKE et Pascal PERNEY

STATION D'HYDROBIOLOGIE LACUSTRE (INRA), BP 511, F - 74203 THONON LES BAINS CEDEX

1. OBJECTIFS

Jusqu'en 2012, les mesures de production primaire en milieu pélagique ont été réalisées, au CARTEL, par des procédures d'incubation avec du ^{14}C -bicarbonate de sodium et des mesures d'incorporation de la radioactivité par scintillation. La manipulation de la radioactivité exige des habilitations à renouveler régulièrement, des installations dédiées, des procédures exigeantes, et génère un coût important de traitement de grande quantité de déchets radioactifs. En 2012, il a été décidé de modifier le protocole de mesure en passant à l'incubation avec de ^{13}C -bicarbonate de sodium dont l'incorporation dans la biomasse est mesurée par spectrométrie de masse isotopique. Globalement, le principe de la méthode est similaire et la mesure de la production primaire au

^{13}C -bicarbonate de sodium est une procédure assez courante notamment dans les études océanologiques (Hama *et al.* 1983). Néanmoins, pour assurer la continuité des séries de données de l'Observatoire OLA (sur les lacs Léman, le Bourget et Annecy, et financées respectivement par la CIPEL, le CISALB et le SILA), et en raison de cette transition méthodologique, les protocoles ^{14}C et ^{13}C ont été réalisés conjointement dans la première moitié de l'année 2013. Ce rapport présente les bilans des tests comparatifs réalisés en 2013, soulève les difficultés rencontrées et présente les solutions testées en 2014.

Comparaison des deux protocoles en 2013

Les deux méthodologies diffèrent en plusieurs points qui avaient été identifiés, *a priori*, comme susceptibles de générer des différences dans les valeurs de production primaire mesurées par les deux méthodes.

- a) **Nature des filtres.** Dans le protocole initial (^{14}C), la matière organique particulaire était retenue, en fin d'incubation, sur des filtres de nitrate de cellulose (taille de pore nominale 0.8 μm). Dans le nouveau protocole, les filtres utilisés, qui ne doivent pas contenir de carbone, sont en fibre de verre (GF/F), avec une taille nominale de pore qui peut être un peu plus faible (0.7 μm). Des tests préliminaires ont démontré que la quantité de matière retenue sur les filtres en fibre de verre est ainsi d'environ 15% supérieure à celle retenue sur les filtres polycarbonate.
- b) **Sensibilité de la méthode et limites de détection.** La méthode ^{13}C est moins sensible que la méthode ^{14}C , et les mesures en spectrométrie de masse isotopique nécessitent une masse minimale de 100 μgC , parfois difficile à atteindre en fonction de la saison et des volumes d'incubation.

Au final, les modifications des volumes d'incubations et de la sensibilité des méthodes pourraient introduire un biais systématique à estimer.

Les mesures d'incorporation ^{14}C et ^{13}C ont été réalisées conjointement en 2013 pour 7 campagnes CIPEL, complétées par 3 campagnes sur le lac d'Annecy et 4 sur le lac du Bourget. Chaque mesure couplée a été réalisée à 4 profondeurs et pour chaque point 2 volumes d'incubations (120 et 290 ml) ont été testés.

L'intercalibration a toutefois rencontré un certain nombre de difficultés. Le protocole ^{13}C implique un nombre d'échantillons (4 incubations ; i.e. 3 filtres blancs et 1 filtre noir ; par profondeur X 2 volumes) et de manipulations (filtrations avant **et** après incubations) supérieur à celui basé sur le ^{14}C (3 incubations par profondeur, filtration après incubation). La réalisation conjointe, sur le bateau, des deux protocoles a triplé la quantité de travail pour les techniciens de prélèvement. Cette surcharge, ajoutée à la nouveauté du protocole, a généré des confusions dans les échantillons sur le terrain. En terme d'analyses, le laboratoire prestataire des analyses isotopiques, basé en Californie, a rendu les résultats avec parfois plus de 6 mois de délai, ce qui a fortement limité la réactivité dans l'ajustement du protocole.

Pour les séries pour lesquelles les confusions ont été éliminées (6 campagnes * 4 profondeurs), il existe toutefois des **corrélations fortes entre les mesures réalisées en ^{13}C et ^{14}C** ($r^2=0.74$, $p<0.05$; figure 1).

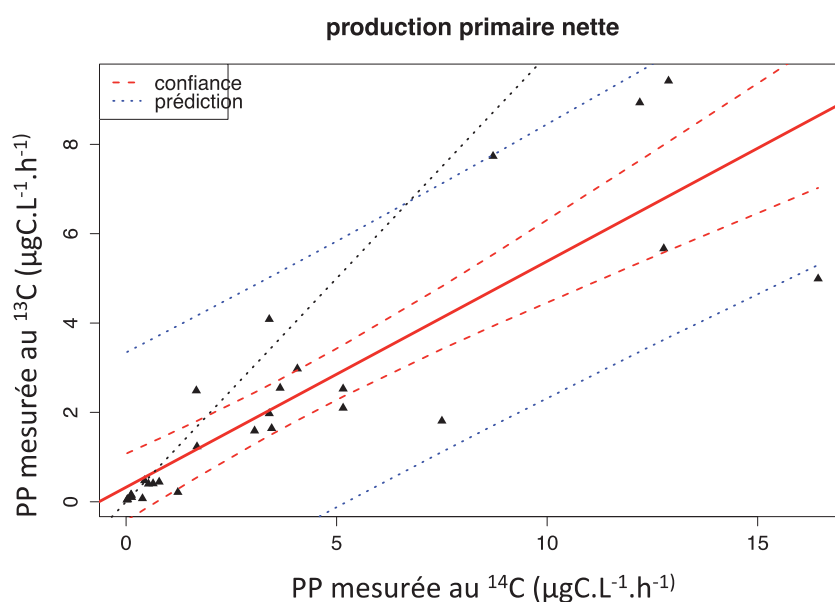


Figure 1 : Comparaison des mesures de production primaire avec les méthodes ^{14}C et ^{13}C pour la campagne d'intercalibration de 2013 et modèles de régression linéaire avec intervalle de confiance (ligne pointillée rouge) et de prédiction (ligne pointillées bleue) associés. La ligne pointillée noire correspond à une égalité stricte dans les résultats des deux méthodes (1:1). Les modèles sont similaires pour les trois lacs.

Figure 1 : Comparison of the primary production measurements with the ^{14}C and ^{13}C methods for the 2013 inter-calibration campaign and linear regression models with associated confidence (dotted red line) and prediction (dotted blue line) intervals. The dotted black line corresponds to a strict equality in the results of both methods (1:1). The models are similar for the three lakes.

Si les mesures réalisées au ^{13}C peuvent être reliées de façon prédictive à celles réalisées selon l'ancien protocole au ^{14}C , elles ont toutefois tendance à sous-estimer la production primaire (d'environ 40%) pour des valeurs supérieures à $10 \mu\text{gC.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (soit 18% des valeurs mesurées avec la méthode ^{14}C en 2013).

Cette sous-estimation systématique exclut le possible biais dû à la taille des pores du filtre (qui aurait dû conduire au contraire à des valeurs surestimées). Cette sous-estimation s'observe quel que soit le volume d'incubation. Les mesures réalisées sur des incubations dans 290 ml posent toutefois moins de problème analytique au prestataire.

En novembre 2013, des tests supplémentaires avec différentes conditions d'incubations et différentes origines des échantillons ont été réalisés, pour créer une gamme élargie de production primaire (figure 2). Ils ont permis d'exclure un biais potentiel causé par l'utilisation ou non de fixateur après incubation (sans préservation, lugol sans acétate ou formol ; résultats non présentés). Ils confirment toutefois la sous-estimation quasi systématique de la méthode ^{13}C par rapport à la méthode des radio-isotopes (figure 2).

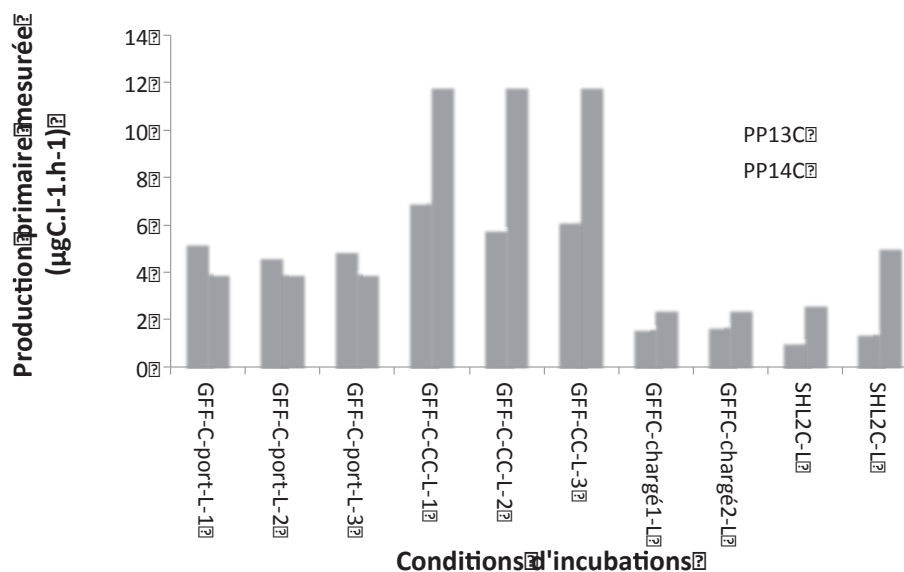


Figure 2 : Résultats des tests comparatifs de novembre 2013 : Comparaison des mesures de production primaire par les deux méthodes dans différentes conditions d'incubations (dans le port ou en chambre climatisée (« CC ») et pour différentes origines (eaux du point de référence SHL2 ou issues de milieux chargés en matière organique).

Figure 2 : Results of the comparative tests from November 2013: Comparison of primary production measurements using both methods in different incubation conditions (in the port or in an air-conditioned room and for different origins (water from the reference point SHL2 or from environments loaded with organic matter)).

Tests réalisés en 2014

Au fur et à mesure des tests de l'année 2014, le protocole a pu être réajusté (volumes d'incubation, élimination de mesures couteuses et inutiles, nombre de répliquats nécessaires, rinçages des échantillons). Mi-2014, nous avons aussi changé de laboratoire prestataire des analyses isotopiques et opté pour le GEOTOP (Montréal) qui fournit une meilleure réactivité et des délais plus courts (de l'ordre de 2 mois). Les coûts sont toutefois légèrement plus élevés. Le poste de travail du technicien sur le terrain et au laboratoire a été réorganisé pour éliminer tout problème de confusion d'échantillon et la traçabilité a été considérablement améliorée.

L'habilitation à la manipulation et au stockage de matériel radioactif au CARTEL a été échue fin 2013. Les tests supplémentaires devaient par conséquent résoudre le problème de la sous-estimation systématique des valeurs de PP par le protocole ^{13}C sans avoir recours aux comparaisons des deux méthodes.

L'article à l'origine du protocole de transition entre mesures de la production primaire $^{13}\text{C}/^{14}\text{C}$ date d'une trentaine d'année (Hama *et al.* 1983). Il est fondée sur 25 points de comparaison entre les deux protocoles et l'ajustement est quasi-parfait (aucune sous-estimation).

Une relecture du papier fondateur identifie des différences nettes entre le protocole que nous avons appliqué et celui recommandé, ce qui pourrait expliquer la sous estimation de PP avec le protocole utilisé en 2013.

L'enrichissement isotopique recommandé dans le papier de référence (Hama *et al.* 1983) est de 4-14% (ratio isotopique nominal en ^{13}C inorganique dans les incubations). L'abondance naturelle en ^{13}C dans les eaux du Léman est de l'ordre de 1,09%, et les proportions atteintes dans les incubations enrichies ne sont que de 1,8%. L'enrichissement réalisé est donc trop faible pour satisfaire à la demande photosynthétique et l'incorporation du ^{13}C -bicarbonate de sodium lorsque la PP > 10 $\mu\text{gC.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (ou environ 40 $\mu\text{gC.l}^{-1}$ sur la durée totale d'incubation) est limitée par la quantité en substrat marqué, suite à la présence d'équilibre chimique (effet plateau). Il faut donc augmenter les ajouts de ^{13}C -bicarbonate de sodium afin d'atteindre un marquage suffisant ($\%^{13}\text{C}=4-7\%$) en augmentant les concentrations en carbone inorganique dissous total (CID) (au delà de 7-8%, les ajouts de CID pourraient stimuler la production primaire (Hama *et al.* 1983)).

Des tests supplémentaires ont été réalisées en octobre 2014, afin d'ajuster la concentration optimale nécessaire en substrat.

Des échantillons d'eau du lac ont été incubés en chambre de culture pendant 2h30, 5h10 et 7h40, avec ajout de ^{13}C -bicarbonate de sodium à enrichissement de 1,8% (ajout similaire à celui utilisé pendant la campagne 2013), 5,0% (ajout 5 fois supérieur à celui de 2013) et 8,7% (ajout 10 fois supérieur à celui de 2013). Les quantités de C fixé pendant les phases d'incubations ont été calculées pour détecter les effets seuil.

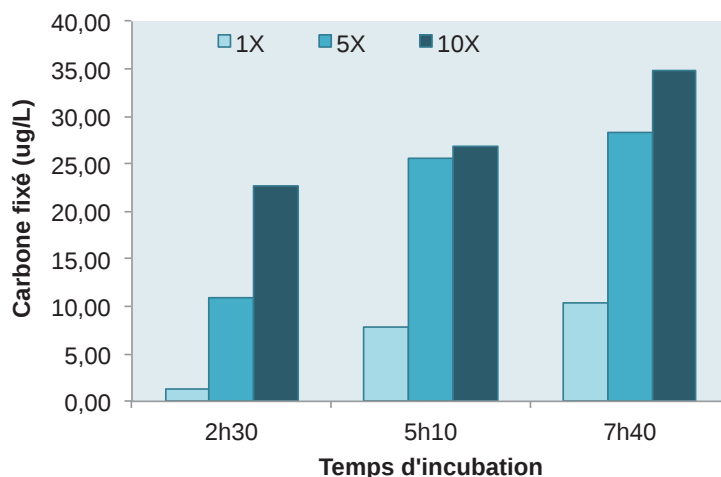


Figure 3 : Résultats des tests de mesures de carbone fixé de 2014, avec augmentation des temps d'incubations et pour des ajouts dosés de substrat marqué (1X : identique au protocole 2013 ; 5X : 5 fois et 10X : 10 fois supérieur au protocole 2013).

Figure 3 : Results of the 2014 measurement tests for fixed carbon, with increase in incubation periods and for dosed additions of labeled substrate (1X: identical to 2013 protocol; 5X: 5 times and 10X: 10 times higher than the 2013 protocol).

Les mesures de carbone fixé pour un ajout faible de ^{13}C (1,8% ou 1X le dosage utilisé en 2013) sont toujours très inférieures à celles estimées par des ajouts plus proches des valeurs recommandées par Hama et al (1983). Les valeurs mesurées n'augmentent pas significativement entre les temps d'incubation de 5h10 et 7h40 (10 $\mu\text{gC.l}^{-1}$) pour le dosage 1X, confirmant ainsi l'existence d'un effet plateau pour cette valeur d'ajout de substrat marqué. Les valeurs mesurées lors des ajouts marqués 10 X supérieures à la valeur initiale sont toujours supérieures à celles mesurées par des ajouts 5 fois supérieurs. Les valeurs mesurées avec un ajout 10X à des temps d'incubation court (2h30) pourraient résulter d'une stimulation de la production primaire par des ajouts de bicarbonate trop élevés (Hama et al, 1983). Par contre, la différence entre des ajouts 5X et 10X est négligeable pour des temps d'incubation de 5h10, proches de ceux réalisés sur le terrain, et de l'ordre de 20% pour des temps d'incubation supérieurs (figure 3).

2. CONCLUSION

L'ajout de ^{13}C -bicarbonate de sodium à une valeur 5X supérieure à celle utilisée lors du protocole 2013 (5,0% de ^{13}C en concentration nominale, soit 2 mg de ^{13}C /fioule de 290 ml) semble donc le meilleur compromis, limitant à la fois l'effet plateau et la stimulation artificielle de la production primaire. Il s'agit donc du dosage pour lequel nous avons opté pour la campagne de suivi 2015, dont le protocole final est présenté dans l'annexe.

BIBLIOGRAPHIE

HAMA, T.; MIYAZAKI, T.; OGAWA, Y.; IWAKUMA, T.; TAKAHASHI, M.; OTSUKI, A.; ICHIMURA, S., Measurement of Photosynthetic Production of a Marine-Phytoplankton Population Using a Stable C-13 Isotope. *Mar Biol* **1983**, 73, (1), 31-36.

MA-Prel-01v1	Mesure de la production primaire (production du phytoplancton) par la méthode au carbone 13	UMR CARTEL Station d'hydrobiologie lacustre Université de savoie 75 avenue de Corzent BP 511 74203 Thonon-les Bains cedex tel : 04.50.26.78.00 / fax 07.60
Création : 17.02.2014 Maj : 26.09.2014 Page : - 167 / 4 -		

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Ce mode opératoire a pour but d'expliquer les différentes étapes permettant de mesurer et d'estimer la production primaire par le phytoplancton dans les lacs à partir de la méthode au carbone 13 (isotope stable). La production primaire du phytoplancton est la synthèse de matière par unité de temps réalisée par les micro-algues vivant dans la colonne d'eau des écosystèmes aquatiques, principalement à partir de la matière minérale et d'une source d'énergie qui est la lumière. Ce processus, réalisé par les organismes autotrophes (micro- et macro-algues, plantes terrestres) en générale, est attribué à la photosynthèse. Ces organismes constituent les premiers maillons de la chaîne trophique traditionnelle, et cette matière qu'ils synthétisent par photosynthèse est une source de nourriture majeure pour les organismes des niveaux trophiques supérieurs.

2. DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

Hama et al. 1983, Marine Biology 73 : 31-36

3. LISTE DE DIFFUSION ET SI NÉCESSAIRE NIVEAU DE CONFIDENTIALITÉ

Néant

4. HYGIÈNE ET SÉCURITÉ

Prévoir une poubelle pour l'élimination des déchets liquides et solides.

5. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode consiste à prélever des échantillons à des profondeurs définies, inoculer ces échantillons avec un volume précis d'une solution de traceur isotopique (ici un isotope stable, le carbone 13), et à mettre en incubation in situ ces échantillons pendant une certaine durée pour évaluer la vitesse de production du carbone par les micro-algues dans le lac.

6. MATÉRIELS ET PRODUITS NÉCESSAIRES

Pour le terrain :

- 1 flacon de lugol sans acétate
- Solution de ZnCl_2 à 50% weight/volume
- HCl 2 %
- ampoules contenant la solution de bicarbonate- ^{13}C (5ml)
- micro-pipette distributrice (5 et 50 ml) avec les embouts adaptés
- flacons 20 ml avec bouchons, et capsules à sertir
- ligne d'incubation
- corde (pour attacher la bouée au bateau)
- bouée & mousquetons
- glacière réservée à la production primaire et pack de glace (si nécessaire)
- 5 (Annecy, Bourget) ou 9 (Léman) kits d'incubation complets : comprenant chacun 4 flacons de 290 ml (dont 3 clairs et 1 noir) et le support muni d'un mousqueton
- flacons de 290 ml supplémentaires par profondeur (pour le POC *Carbone particulaire organique*)
- Egaliser les niveaux avec la tige en verre qui se trouve dans la glacière de matériel
- poubelle / essuie-tout
- L'abaque de calcul du tiers médian de la journée solaire ou incubation minimale de 4 heures
- boîtes multi puits (6 trous) identifiées pour stocker les filtres après filtration sans risque de contamination.
- Unité de filtration 12 puits avec des rehausses, et pompe à vide
- filtres membrane GF/F 25 mm (whatmann), préalablement calcinés 4 heures à 400 °C

Au laboratoire (matériel à préparer et travail à faire avant tout départ sur le terrain) :

- filtres membrane GF/F 25 mm (whatmann), préalablement calcinés 4 heures à 400 °C
- Unité de filtration 12 puits avec des rehausses, et pompe à vide
- Capsules en étain 10 X 10 (ref : D5216 chez SYLAB)

Préalable : préparer la solution de bicarbonate ^{13}C de Na, mettre en ampoules et sceller

Matériel nécessaire à la préparation de la solution de travail :

- Bicarbonate de sodium marqué au ^{13}C (sigma-Aldrich)
- Eau Ultrapure stérile sans carbone (filtrée sur filtre porosité 0.2 μm , puis autoclavée)
- Fioles jaugées de 100 mL préalablement autoclavées
- Ampoules en verre autocassables pour conservation de la solution
- Pipettes 50-5000 μL
- Bec Bunsen

Préparation de la solution de travail :

- Peser 1570 mg de bicarbonate de sodium- ^{13}C
- Mettre dans la fiole jaugée et compléter à 100 ml avec de l'eau ultrapure stérile sans carbone

- Bien dissoudre, aliquoter et placer dans les ampoules, puis sceller. Identifier individuellement chaque Ampoule (étiquette et n°, fichier documents de référence)

Pour l'analyse du carbone inorganique dissous (DIC), remplir le flacon de 20 ml, ajouter 100 µL de ZnCl₂, sertir.

Pour l'analyse du carbone organique particulaire (POC) initial dans les échantillons :

- 2 flacons de 290 ml identiques à ceux utilisés pour l'incubation
- Filtres GF/F, Ø 25 mm, préalablement calciné à 400°C pendant 4h (2 par profondeur)
- Solution HCl 2 % (dans une pissette), préparée avec de l'eau ultrapure autoclavée
- Matériel de filtration (pompe à vide, rosette de filtration avec ouverture de filtration de 25 mm)
- Plusieurs boîtes multi puits
- Glacière + ice packs

Pour l'identification des échantillons :

Ouvrir le dossier (voir lien hypertexte dans documents de références), ajouter à la liste les échantillons à venir (en commençant par le plus profond) le DIC, le POC, et les échantillons du portoir (en commençant par celui à l'obscurité pour chaque profondeur). Le numéro dans la première colonne sert de référence à chaque échantillon, il sera noté sur l'étiquette des flacons de DIC et on notera pour les filtres la position dans les boîtes d'envoi.

7. CONTRAINTES DE LA MÉTHODE

Contraintes liées aux conditions de travail sur le terrain (déplacement de matériel), aux conditions météorologiques, à la durée d'incubation. Après « calcination » des filtres, ne jamais les toucher avec les doigts, utiliser des pinces stérilisées, veiller aux problèmes de contamination.

8. CONTENU DU MODE OPÉRATOIRE

Sur le terrain :

Sur le point (station) de prélèvement :

- remplir le portoir avec ces 4 flacons (3 clairs et 1 noir) et le flacon de 20 ml (pour le DIC) prévus pour chaque profondeur, avec des échantillons d'eau prélevés à cette profondeur
- ajuster les niveaux d'eau dans les 4 flacons avec le système prévu à cet effet, et les ranger dans la glacière à l'obscurité durant la phase de prélèvement. Rappel des profondeurs 0,1,2.5,3.5,5,7.5,10,15,20 m sur le Léman ; 2, 6,10,15,20 m (sur Annecy) et 3, 6,10,15,20 m (sur le Bourget ?)
- dans les 4 flacons du portoir injecter 100µl de la solution de bicarbonate-13C
- mettre les « portoirs » en incubation in situ pendant le tiers médian de la journée solaire ou 4 heures, (noter sur le cahier de terrain le temps d'incubation, le numéro de l'ampoule, ces données serviront pour le calcul de la production primaire. Mettre un lest au bout de la ligne d'incubation, puis accrocher les portoirs en commençant par le plus profond, puis attacher la ligne à la bouée et le collier GPS à la bouée.

Pendant l'incubation de la production :

- filtrer sur la rosette, les échantillons du POC, rincer chaque filtration avec 15 ml d'HCl 2% et stocker les filtres dans les boîtes 6 trous (position 1 et 2) correspondant à la profondeur.
- injecter dans les échantillons DIC 100 µL de ZnCl₂ à 50%, sertir et conserver au froid et à l'obscurité.

Au terme de l'incubation de la production :

- si la filtration ne peut avoir lieu immédiatement, ajouter 1 ml (à l'aide de l'embout 50ml) de lugol sans acétate pour stopper l'activité photosynthétique, agiter légèrement pour bien mélanger.

Au retour au laboratoire (ou sur le bateau) :

- dès que possible, filtrer les échantillons issus de l'incubation sur des filtres GF/F 25 mm calcinés,
- rincer avec 15 ml d' HCl 2%, stocker dans les plaques 6 trous (l'obscur en position 3 les autres en 4, 5, 6) dans un dessiccateur.
- pour l'envoi à l'analyse, plier les filtres (POC et sample) en 8 avec des pinces et insérer la boulette obtenue dans une capsule en étain, replier celle-ci pour obtenir une boulette sans aspérités. Ranger dans une plaque multipuits 24 trous identifiée, repérer chaque boulette/emplacement dans le fichier d'identification. Lorsque la boîte ou la série est finie, scotcher le couvercle, cette boîte sera envoyée en l'état, en même temps que les échantillons prélevés dans les flacons de 20 ml pour l'analyse du DIC.
- lavage des flacons transparent en machine sans lessive (programme 5), les noirs, les portoirs, et les boîtes 6 trous sont rincés à l'eau déminéralisée intérieur/extérieur.

Expédition :

- Lorsque la série est prête (DIC et filtres), remplir les documents destinés au laboratoire d'analyse :
 - La liste d'identification des échantillons
 - facture pro forma (pour le transporteur)
 - le bon de commande préalablement établi
- enregistrer tout ces documents dans un même dossier, nommé : aa/mm/jj-C13-nom et N° du/des lacs
- préparer l'expédition en protégeant les flacons de DIC individuellement, emballer l'ensemble proprement, inscrire l'adresse sur le colis (joindre tout les documents précédemment cités à l'envoi)
- remplir le formulaire d'envoi UPS, et les contacter pour fixer la date d'enlèvement
- contacter le laboratoire pour signaler l'envoi et joindre tous les documents précédemment cités en format informatique
- attendre la réception des résultats, c'est pourquoi l'identification doit être très précise.

9. CALCULS ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

Le calcul des résultats s'établit grâce à un tableau (voir documents de référence) et est exprimé en $\mu\text{g C/L/heure}$.

H218								
	A	B	C	D	E	F	G	H
	n°	analysis	depth	lake	point	results	position box	commentés
101		DIC	2	Bourget02-2014	B		-	
102		DIC + 13C	20	Bourget02-2014	B		-	
103		DIC + 13C	15	Bourget02-2014	B		-	
104		DIC + 13C	10	Bourget02-2014	B		-	
105		DIC + 13C	6	Bourget02-2014	B		-	
106		DIC + 13C	2	Bourget02-2014	B		-	
107		POC 1	20	Bourget02-2014	B	une serie a ur	B4A1	POC filtré sur le bateau
108		POC 2	20	Bourget02-2014	B		B4A2	
109		POC 1	15	Bourget02-2014	B		B4A3	
110		POC 2	15	Bourget02-2014	B		B4A4	
111		POC 1	10	Bourget02-2014	B		B4A5	
112		POC 2	10	Bourget02-2014	B		B4A6	
113		POC 1	6	Bourget02-2014	B		B4B1	
114		POC 2	6	Bourget02-2014	B		B4B2	
115		POC 1	2	Bourget02-2014	B		B4B3	
116		POC 2	2	Bourget02-2014	B		B4B4	
117		filter B	20	Bourget02-2014	B	pas fixé	B4B5	filtration a J+2 (14/02)
118		filter 1	20	Bourget02-2014	B		B4B6	
119		filter 2	20	Bourget02-2014	B		B4C1	
120		filter 3	20	Bourget02-2014	B		B4C2	
121		filter B	15	Bourget02-2014	B		B4C3	
122		filter 1	15	Bourget02-2014	B		B4C4	
123		filter 2	15	Bourget02-2014	B		B4C5	
124		filter 3	15	Bourget02-2014	B		B4C6	
125		filter B	10	Bourget02-2014	B		B4D1	

Numéro
d'identification